

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ ТА НАУКИ УКРАЇНИ  
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ІЩЕНКО ОЛЬГА ОЛЕГІВНА**

УДК 577.21/57.065/ 582.542.1

**ДИСЕРТАЦІЯ**

МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ТАКСОНОМІЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ 5S  
РИБОСОМНОЇ ДНК ПРЕДСТАВНИКІВ ТРИБИ РОЕАЕ (РОДИНА РОАСЕАЕ)

091 Біологія

09 Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD). Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

**Ольга ІЩЕНКО**

Науковий керівник:

**Роман ВОЛКОВ**

доктор біологічних наук, професор

Чернівці – 2021

## АНОТАЦІЯ

*Ищенко О.О.* «Молекулярна організація та таксономічне застосування 5S рибосомної ДНК представників триби *Роеае* (родина *Роасеае*)».– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD) за спеціальністю 091 – Біологія. – Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, Чернівці, 2021.

Дисертаційна робота присвячена вивченню молекулярної організації та еволюції 5S рибосомної ДНК представників триби *Роеае* (родина *Роасеае*) та таксономічному використанню цього молекулярного маркера.

У першому розділі роботи представлений аналіз літературних даних щодо систематики родини *Роасеае*. Зокрема, описано сучасні підходи, які застосовуються у таксономії цієї родини, та наведено приклади використання як молекулярного маркера ділянок геному, що кодують 5S рибосомну РНК (або 5S рДНК). Ці ділянки належать до класу тандемно організованих повторних послідовностей і складаються з еволюційно консервативних кодувальних ділянок та мінливих спейсерів, що їх розділяють. Завдяки присутності в геномах усіх еукаріотичних організмів та наявності у її складі мінливих спейсерних ділянок, 5S рДНК з успіхом використовується для вивчення еволюції повторних послідовностей та у філогенетичних дослідженнях. Проте, молекулярна організація 5S рДНК такої великої і важливої групи рослин як родина Злакові все ще залишається вивченою дуже фрагментарно. Тому метою роботи було проаналізувати молекулярну організацію, поліморфізм та еволюцію 5S рДНК у представників найбільшої у родині *Роасеае* триби *Роеае* та оцінити можливість використання цієї ділянки геному у таксономічних дослідженнях.

Для досягнення мети потрібно було вирішити наступні завдання:

- Клонувати та сиквенувати 5S рДНК представників різних родів триби *Роеае*.

- Дослідити поліморфізм та розкрити характер мінливості 5S рДНК у популяціях антарктичної рослини *Deschampsia antarctica* та інших видів цього роду.

- Проаналізувати будову та еволюцію первинної нуклеотидної послідовності 5S рДНК представників різних родів триби Pooae.

- Вивчити можливість застосування 5S рДНК в молекулярній таксономії триби Pooae.

- За допомогою отриманих даних уточнити філогенетичні зв'язки представників триби Pooae.

Об'єкт дослідження - структурно-функціональна організація та еволюція 5S рДНК у рослин. При виконанні дисертації застосовано набір сучасних молекулярно-генетичних та біоінформатичних методів дослідження.

У роботі вперше клоновано, сиквеновано та проаналізовано молекулярну організацію, поліморфізм та еволюцію 5S рДНК у 4 видів роду *Deschampsia* та 14 інших представників триби Pooae. Зокрема, детально досліджено поліморфізм 5S рДНК у рослин з 19 популяцій антарктичного виду *Deschampsia antarctica*. Показано, що в геномі видів роду *Deschampsia* наявні три структурні класи 5S рДНК, два з яких мають підкласи. Три структурні класи 5S рДНК з'явилися на ранній стадії видоутворення у роді, ще до дивергенції сучасних видів від спільного предку, тоді як підкласи виникли пізніше і частково є видоспецифічними. Транскрипти більшості повторів 5S рДНК всіх структурних класів роду *Deschampsia* здатні формувати канонічну вторинну структуру, що вказує на їх функціональну активність. Проте, деякі повтори 5S рДНК демонструють ознаки перетворення у псевдогени. Високий внутрішньогеномний поліморфізм 5S рДНК є унікальною особливістю роду *Deschampsia*, на відміну від високої подібності повторів 5S рДНК у геномах інших досліджених у роботі рослин. Отримані дані підтверджують гіпотези щодо виключення із складу роду *Deschampsia* двох видів – *Avenula flexuosa* та *Vahlodea atropurpurea*. На загал отримані результати

свідчать про доцільність використання 5S рДНК для уточнення філогенетичних відносин між видами та родами триби *Роеае*.

Результати роботи можуть бути використані для розкриття механізмів еволюції рослин в екстремальних умовах довкілля та для генотипування рослин при розробці стратегій збереження генетичного різноманіття у природоохоронній діяльності.

Дослідження, представлені у дисертації, є частиною науково-дослідної роботи кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету. Частина результатів отримана в рамках співпраці із Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ) та Інститутом екології Карпат НАН України (м. Львів). Ці результати впроваджені у наукову роботу згаданих наукових закладів. По матеріалам дисертації оприлюднено вісім наукових праць, з яких дві статті у періодичному науковому виданні, що включено до бібліометричних баз даних Scopus та Web of Science, три статті у фахових виданнях України та троє тез доповідей на міжнародних біологічних конференціях.

Дисертацію викладено на 154 сторінках машинописного тексту. Вона складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел літератури. Робота містить 16 таблиць та 31 рисунок. Бібліографічний список складається з 188 літературних джерел.

Ключові слова: організація повторюваних послідовностей, молекулярна еволюція та таксономія рослин, 5S рибосомна ДНК, міжгенний спейсер, триба *Роеае*, родина *Роасеае*.

## ABSTRACT

*Ishchenko O.O.* "Molecular organization and taxonomic application of 5S ribosomal DNA of the Poeae tribe representatives (family Poaceae)". Manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in speciality 091 - Biology. - Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Chernivtsi, 2021.

The thesis is aimed at the study of the molecular organization and evolution of 5S ribosomal DNA of the Poeae tribe members (family Poaceae) and the taxonomic application of this molecular marker.

The first section of the study presents the analysis of the published information regarding the taxonomy of the Poaceae family. In particular, it describes the current approaches used in the taxonomy of this family, and provides the examples of application as a molecular marker of the genomic regions encoding 5S ribosomal RNA (or 5S rDNA). These regions belong to the class of the tandemly arranged repeated sequences and consist of evolutionarily conservative coding regions and variable spacers that separate them. Due to the occurrence of all eukaryotic organisms in the genomes and the presence of variable spacer regions in its composition, 5S rDNA has been successfully used for the investigation of the evolution of repeated sequences as well as in phylogenetic studies. However, the molecular organization of 5S rDNA of such a large and important group of plants as the family Poaceae still remains poorly investigated. Therefore, the aim of the study was to analyze the molecular organization, polymorphism and evolution of 5S rDNA in the members of the Poeae tribe, the largest one in the Poaceae family, and to evaluate the possibility of using this genomic region in taxonomic research.

To achieve the aim it was necessary to solve the following tasks:

- To clone and sequence 5S rDNA of different genera of the Poeae tribe.
- To evaluate polymorphism and to elucidate the nature of 5S rDNA variability in populations of the Antarctic plant *Deschampsia antarctica* and other species of this genus.
- To analyze the structure and evolution of 5S rDNA sequence in different genera of the Poeae tribe.

- To assess the possibility of 5S rDNA usage in the molecular taxonomy of the Poeae tribe.
- To use the obtained data for the clarification of the phylogenetic relationships in the Poeae tribe.

The object of research is the structural and functional organization and evolution of 5S rDNA in plants. A set of modern molecular genetics and bioinformatics methods were used in the thesis.

For the first time, the 5S rDNA repeated units were cloned and sequenced and their molecular organization, polymorphism and evolution were analyzed for 4 species of the genus *Deschampsia* and 14 other members of the Poeae tribe. In particular, the 5S rDNA polymorphism in plants from 19 populations of the Antarctic species *Deschampsia antarctica* was studied in detail. It was shown that three structural classes of 5S rDNA, two of which include subclasses, are present in the genomes of *Deschampsia* species. Three structural classes of 5S rDNA appeared at an early stage of speciation in the genus, before the divergence of modern species from a common ancestor, whereas the subclasses emerged later and are partially species-specific. In the genus *Deschampsia*, transcripts of 5S rDNA repeats of all structural classes are mostly able to form a canonical secondary structure, indicating their functional activity. However, some 5S rDNA repeats show transformation into pseudogenes. High intragenomic 5S rDNA polymorphism is a unique feature of the genus *Deschampsia*, in contrast to the high similarity of 5S rDNA repeats in the genomes of other studied plants. The obtained data confirms the hypotheses about the exclusion of two species, namely *Avenela flexuosa* and *Vahlodea atropurpurea*, from the genus *Deschampsia*. Taking everything into account, the results demonstrate the feasibility of using 5S rDNA to clarify the phylogenetic relationships between the species and the genera of the tribe Poeae.

The results of the study can be used to reveal the mechanisms of plant evolution in extreme environmental conditions and in environment protection practice for plant genotyping in the development of strategies for the conservation of genetic diversity.

The research presented in the thesis is a part of the research of the Department of Molecular Genetics and Biotechnology of Chernivtsi National University. Some results were obtained in cooperation with the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv) and the Institute of Ecology of the Carpathians of the National Academy of Sciences of Ukraine (Lviv). These results are implemented in the scientific work of the mentioned scientific institutions. Based on the dissertation materials, eight scientific papers were published, including two articles in the scientific journals, which are referred to the bibliometric databases Scopus and Web of Science, three articles published in scientific professional editions and three abstracts presented at international biological conferences.

The thesis is presented on 154 pages of typewritten text. It consists of the introduction, the literature review, the description of research materials and methods, the results of own research and their discussion, the conclusions, the list of references. The work contains 16 tables and 31 figures. The references consist of 188 literature sources.

Key words: repetitive sequence organization, molecular evolution and taxonomy of plants, 5S ribosomal DNA, intergenic spacer, Poeae tribe, Poaceae family.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА:

### Публікації у періодичних наукових виданнях:

Видання, що входять до науко-метричної бази Scopus та наукових фахових видань України з присвоєнням категорії «А»:

1. Ishchenko, O. O., Panchuk, I. I., Andreev, I. O., Kunakh, V. A., & Volkov, R. A. (2018). Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol Genet*, 52(6), 416-421. <https://doi.org/10.3103/S0095452718060105>

2. Ishchenko, O. O., Mel'nyk, V. M., Parnikoza I. Y., Budzhak, V. V., Panchuk, I. I., Kunach, V. A., & Volkov, R. A. (2020). Molecular organization of 5S ribosomal DNA and taxonomic status of *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (Poaceae). *Cytol Genet*, 54(6), 505-513. <https://doi.org/10.3103/S0095452720060055>

### Наукові фахові видання:

1. Іщенко, О. О., & Панчук, І. І. (2018) Молекулярна організація 5S рДНК пажитниці багаторічної *Lolium perenne* L. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*, 16(2), 166-173. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.16.2.1054>

2. Іщенко, О. О., Деревенко, Т. О., & Панчук, І. І. (2018). 5S рДНК тимофіївки лучної *Phleum pratense*. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 10(2), 107-112. <https://doi.org/10.31861/biosystems2018.02>

3. Іщенко, О. О., & Волков, Р. А. (2020) Організація 5S рибосомної ДНК *Poa pratensis* L. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12(2), 135-140. <https://doi.org/10.31861/biosystems2020.02.135>

### Тези доповідей на конференціях:

1. Ishchenko, O. O., Mel'nyk, V. M., Kunakh, V. A., & Volkov, R. A.: Application of 5S rDNA for clarification of taxonomic status of *Avenella flexuosa*. *Біологічна секція «Важливість ідей Г. Гамова для біології 21-ого століття»*: зб. матеріалів XX Міжнародної Гамовської конференції-школи. Одеса. 2020. С. 198

2. Ishchenko, O. O., Poburyan, O. M., & Volkov, R. A.: Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia cespitosa*. *Генетика и биотехнология XXI века*:



*проблемы, достижения, перспективы*: материалы IV Международной научной конференции к 55-летию основания Института генетики и цитологии НАН Беларуси. Минск. 2020. С. 83.

3. Андреев, I. O., Ищенко, O. O., Волков, P. A., & Кунах, B. A. Молекулярна організація та поліморфізм генів 5S рРНК *Deschampsia antarctica* E. Desv. *Фактори експериментальної еволюції організмів*: Вибрані тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції та VII з'їзді Всеукраїнської асоціації біологів рослин. Київ. 2019. С. 373.

#### **Патенти:**

1. Спосіб оцінки генетичної мінливості у популяціях видів роду *Deschampsia*: пат. 143793 Україна: МПК C12N 15/11, C12N 15/29; заявл. 10.03.2020; опубл. 10.08.2020, Бюл. № 15.

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	12
ВСТУП .....	13
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	18
1.1. СИСТЕМАТИКА РОДИНИ РОАСЕАЕ.....	18
1.2.ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ ЕВОЛЮЦІЇ ЗЛАКОВИХ.....	20
1.3.ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЛОГЕНІЇ РОДИНИ РОАСЕАЕ.....	23
1.4.ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ У ФІЛОГЕНЕТИЦІ РОСЛИН.....	29
1.4.1.Молекулярна організація 5S рДНК.....	29
1.4.2.5S рДНК як філогенетичний маркер у покритонасінних рослин.....	31
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	45
2.1. МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	45
2.2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	49
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	64
3.1.ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК <i>DESCHAMPSIA</i> <i>ANTARCTICA</i> .....	64
3.1.1.Молекулярна організація міжгенного спейсера (IGS) 5S рДНК.....	65
3.1.2.Відносний вміст структурних класів 5S рДНК у геномі <i>D. antarctica</i> .....	79
3.1.3. Організація кодувальної ділянки 5S рДНК <i>D. antarctica</i> .....	83
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.1.....	93
3.2.ПОХОДЖЕННЯ ТА ЕВОЛЮЦІЯ СТРУКТУРНИХ КЛАСІВ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ВИДІВ РОДУ <i>DESCHAMPSIA</i> .....	94
3.2.1.ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНИХ КЛАСІВ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ВИДІВ РОДУ <i>DESCHAMPSIA</i> .....	94
3.2.2.ТАКСОНОМІЧНЕ ПОЛОЖЕННЯ <i>A. FLEXUOSA</i> ТА <i>V. ATROPURPUREA</i> .....	109
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.2.....	113

3.3.МОЛЕКУЛЯРНЕ РІЗНОМАНІТТЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ТА ВИКОРИСТАННЯ У ДОСЛІДЖЕННІ ФІОЛОГЕНІЇ ТРИБИ РОЕАЕ.....	115
3.3.1.СТРУКТУРА ТА ПОЛІМОРФІЗМ 5S рДНК В МЕЖАХ ТРИБИ РОЕАЕ.....	115
3.3.2.ОРГАНІЗАЦІЯ IGS 5S рДНК ДЛЯ ОКРЕМИХ КЛАД ТРИБИ РОЕАЕ.....	122
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.3.....	131
ВИСНОВКИ ДО РОБОТИ.....	132
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ.....	134

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

5S рДНК	– ділянки геному, що кодують 5S рибосомну РНК
35S (45S) рДНК	ділянка геному, що складається з послідовностей, які кодують 18S, 5,8S і 25S рРНК та некодуючих ділянок між ними
ЕДТА- Na <sub>2</sub>	– натрієва сіль етилендіамінтетраацетата
Індели	– вставки чи делеції в нуклеотидній послідовності
нп	– нуклеотидні пари
оліго-dT	– ділянка нуклеотидної послідовності, яка складається з кількох тимінів
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
плДНК	– плазмідна ДНК
хпДНК	– хлоропластна ДНК
AFLP	– amplified fragment length polymorphism (поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів)
CAPS	– cleaved amplified polymorphic sequence (метод розщеплення ампліфікованої поліморфної послідовності)
FISH	– fluorescence <i>in situ</i> hybridization (флюоресцентна гібридизація <i>in situ</i> )
GISH	Genomic <i>in situ</i> hybridization (геномна гібридизація <i>in situ</i> )
GPWG	– Grass Phylogeny Working Group (професійне співтовариство вчених ботанічної спільноти)
IGS	– intergenic spacer (міжгенний спейсер) рДНК
ITS1-2	– internal transcribed spacer (внутрішні транскрибовані спейсери) 35S (45S)
Pol III	– РНК-полімераза III
RAPD	– random amplification of polymorphic DNA (аналіз випадково ампліфікованої поліморфної ДНК)
RFLP	– restriction fragment length polymorphism (аналіз поліморфізму довжини рестриктних фрагментів ДНК)
SNP	– single nucleotide polymorphisms (технологія з використанням маркера на основі поліморфізму по одиничному нуклеотиду)

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Характерною особливістю геномів насінних рослин є високий вміст повторюваних послідовностей (Kubis et al., 1998; Lee & Kim, 2014). Значну частину цієї фракції геному становлять транспозони та сателітні ДНК, які здебільше не виконують певних функцій та еволюціонують з великою швидкістю. Крім того, до середньо повторюваних послідовностей належать ділянки, які кодуєть 5S та 35S (18S+5,8S+26S) рРНК (так звана рДНК). На відміну від більшості повторюваних послідовностей, рДНК присутня у геномах всіх еукаріотичних організмів, а її функція добре відома.

У еукаріот 5S рДНК представлена тисячами копій повторюваних одиниць (повторів), які організовані тандемно, за принципом «голова-хвіст» та утворюють кластери, розташовані на одній чи кількох хромосомах (Cloix et al., 2000; Garcia et al., 2020). Кожний повтор складається з еволюційно консервативної ділянки, яка кодує 5S рРНК та варіабельного міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS). Висока еволюційна консервативність кодувальної ділянки 5S рДНК є необхідною для збереження функцій 5S рРНК у складі великої субодиниці рибосоми (Barciszewska et al., 2001).

На відміну від кодувальної ділянки, IGS є еволюційно мінливим, оскільки більша його частина не транскрибується та, імовірно, не має будь-яких функцій. Відповідно, слід очікувати, що мутації у IGS не будуть призводити до негативних наслідків, і тому еволюція IGS не має обмежуватись стабілізуючим природним добром. Тим не менш, у IGS рослин виявлені відносно консервативні елементи, які потрібні для ініціації (зовнішні елементи промотора) та термінації (термінатор) транскрипції (Venkateswarlu et al., 1991; Matyasek et al., 2002; Cloix et al., 2003; de Souza et al., 2020).

Завдяки присутності у геномах всіх еукаріот 5S рДНК являє собою універсальну модель для вивчення закономірностей молекулярної еволюції повторюваних послідовностей. Крім того, еволюційно мінливі ділянки IGS можуть використовуватись як молекулярний маркер у філогенетичних та

таксономічних дослідженнях, особливо для таксонів низького рангу (Baum & Feldman, 2010a; Tynkevich & Volkov, 2019). Проте, молекулярна організація 5S рДНК все ще залишається недостатньо вивченою для багатьох груп рослин, серед яких і така велика та економічно важлива родина, як Злакові (Poaceae). Зокрема, майже нічого невідомо про організацію та еволюцію 5S рДНК представників триби Poae (Röser et al., 2001; Volkov & Panchuk, 2014), яка є найбільшою у цій родині (Soreng et al., 2017).

**Мета і завдання дослідження.** *Мета роботи* – проаналізувати молекулярну організацію, поліморфізм та еволюцію 5S рибосомної ДНК у представників триби Poae (родина Poaceae) та оцінити можливість використання цієї ділянки геному у таксономічних дослідженнях.

Для досягнення мети у роботі було сформульовані наступні *завдання*:

- Клонувати та сиквенувати 5S рДНК представників різних родів триби Poae.
- Дослідити поліморфізм та розкрити характер мінливості 5S рДНК у популяціях антарктичної рослини *Deschampsia antarctica* та інших видів цього роду.
- Проаналізувати будову та еволюцію первинної нуклеотидної послідовності 5S рДНК представників різних родів триби Poae.
- Вивчити можливість застосування 5S рДНК в молекулярній таксономії триби Poae.
- За допомогою отриманих даних уточнити філогенетичні зв'язки представників триби Poae.

*Об'єкт дослідження* – структурно-функціональна організація та еволюція 5S рДНК у представників родини Poaceae.

*Предмет дослідження* – види 13 родів триби Poae.

*Методи дослідження* – молекулярно-генетичні (виділення геномної та плазмідної ДНК, гель-електрофорез, квантифікація ДНК, ПЛР-ампліфікація, клонування фрагментів ДНК у плазмідний вектор, трансформація рекомбінантних плазмід у клітини *E. coli* методом електропорації, рестриктне

картування, сиквенування), біоінформатичні (комп'ютерний аналіз послідовностей, робота з базами даних, побудова філодендрограм).

**Наукова новизна роботи.** Вперше клоновано та сиквеновано 5S рДНК 18 видів триби Pooae; детально проаналізовано та описано поліморфізм 5S рДНК у популяціях антарктичного виду *Deschampsia antarctica*. Зокрема, вперше продемонстровано, що в геномі покритонасінних рослин можуть одночасно існувати 3 структурні класи 5S рДНК, які суттєво відрізняються між собою. Прослідковано етапи молекулярної еволюції цих структурних класів, наведено дані про поступове перетворення частини повторів 5S рДНК у псевдогени. Встановлено суттєву відмінність 5S рДНК *Avenella flexuosa*, *Vahlodea atropurpurea* та видів роду *Deschampsia*, що свідчить на користь виділення *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* в окремі роди; показано, що 5S рДНК можна використовувати у молекулярній таксономії триби Pooae, з'ясовано філогенетичні відносини досліджуваних представників цієї триби.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація – самостійна наукова праця, в якій викладені власні ідеї і розробки дисертантки, що дозволили виконати поставлені завдання. Основні результати дисертаційної роботи одержані авторкою самостійно. Дисертантка здійснила пошук та аналіз наукової літератури за тематикою дослідження, виконала експериментальну частину роботи та біоінформатичний аналіз отриманих даних. Планування етапів роботи та аналіз результатів проводились спільно із науковим керівником проф. Р.А. Волковим. В обговоренні результатів та написанні статей приймали участь співавтори відповідних публікацій.

**Апробація матеріалів дисертації.** Результати дисертаційної роботи представлені на міжнародних конференціях: Біологічній секції XX Міжнародної Гамовської конференції-школи «Важливість ідей Г. Гамова для біології 21-ого століття» (Одеса, 2020), Міжнародній науковій конференції «Генетика і біотехнологія XXI століття: проблеми, досягнення, перспективи» (Мінськ, 2020), XIV Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» та VII з'їзді Всеукраїнської асоціації

біологів рослин (Київ, 2019). Також результати представлені в конкурсній роботі «Наукові засади збереження біорізноманіття рослин, що зростають в екстремальних умовах Антарктики та високогірних Карпат», яка отримала Премію Верховної Ради України молодим ученим за 2019 рік.

**Публікації.** Основні результати дисертації оприлюднені у 5 наукових статтях, з яких дві статті у періодичному науковому виданні, що включено до науково-метричних баз даних Scopus та Web of Science, три статті у фахових виданнях України.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертацію викладено на 154 сторінках машинописного тексту. Робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел літератури і додатків. Дисертація містить 16 таблиць, 31 рисунок та додаток. Бібліографічний список складається з 188 літературних джерел.

У *вступі* представлена загальна характеристика роботи, зокрема, актуальність дисертаційного дослідження, мета, завдання, об'єкт та предмет дослідження, методи дослідження, які використовувались у роботі, описано новизну отриманих результатів та їх практичне значення. Наведено особистий внесок дисертантки та конференції, на яких були апробовані результати роботи.

У *розділі 1*, який містить чотири підрозділи, наведено аналіз літератури за проблематикою дисертаційного дослідження. Зокрема, обговорюються актуальні проблеми систематики родини Злакові, описано молекулярні маркери, які використовуються у таксономії рослин та, зокрема, 5S рДНК, наводяться приклади застосування цієї ділянки у дослідженні філогенії вищих рослин.

*Розділ 2* присвячений опису методів, які були використані у дисертаційному дослідженні, зокрема молекулярно-генетичних та біоінформатичних методів.

У *розділі 3*, який складається з трьох підрозділів, представлено результати, отримані при виконанні дисертаційного дослідження. У підрозділі



3.1. детально охарактеризовано будову та поліморфізм міжгенного спейсеру та кодувальної ділянки 5S рДНК *D. antarctica*. У підрозділі 3.2. розглянуто особливості молекулярної організації та еволюції 5S рДНК різних видів роду *Deschampsia*, викладено аргументи щодо необхідності виключення двох видів, *Avenella flexuosa* та *Vahlodea atropurpurea* зі складу цього роду. В підрозділі 3.3 наведено результати клонування та сиквенування 5S рДНК представників різних підтриб триби Pooae, показано можливість застосування цього маркеру у таксономії досліджуваної триби та представлено дендрограму, яка відображає філогенетичні відносини між дослідженими видами.

**Практичне значення отриманих результатів.** Результати роботи можуть бути використані у природоохоронній діяльності для генотипування рослин та для розкриття механізмів, які забезпечують адаптацію рослин до екстремальних умов довкілля. Результати роботи впроваджено в навчальний процес на кафедрі молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича при читанні лекцій та проведенні практичних і лабораторних занять з курсів «Теорія еволюції», «Лабораторні спеціалізації» та спецкурсу «Генетична інженерія та генетично модифіковані організми». Частина результатів дисертації отримана в рамках співпраці із Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ) та Інститутом екології Карпат НАН України (м. Львів). Ці результати впроваджені у наукову роботу згаданих наукових закладів.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Тема дисертаційної роботи відповідає науковій тематиці кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету в рамках кафедральної теми: «Генетичне різноманіття та адаптація еукаріотичних організмів» (номер державної реєстрації 0116U007048, 2016 – 2020 рр.) та держбюджетної теми «5S рибосомальна ДНК: молекулярна організація та еволюція за зміни умов довкілля» (номер державної реєстрації 0118U000137, 2018 – 2020 рр.).

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. СИСТЕМАТИКА РОДИНИ РОАСЕАЕ

Однією з найбільших родин покритонасінних рослин є родина Злакові (Poaceae, порядок Poales – Накаї (1930)), до якої відносять такі економічно важливі культури, як пшениця (*Triticum aestivum*), кукурудза (*Zea mays*), рис (*Oryza sativa*) та ін. Родина Злакові налічує приблизно 12 000 видів, які групуються у 780 родів, що робить її п'ятою родиною за кількістю видів серед Покритонасінних рослин (Christenhusz & Byng, 2016). Антуан Лоран де Жуссьє виділяв цю групу рослин під назвою Gramineae в 1789 році, а назва Poaceae запропонована в 1895 році Барнгартом (Takhtajan, 1966).

Злакові включають в себе рослини, які пристосувалися до різних умов середовища (помірні умови та тропіки, пустелі та холодні умови Антарктики) і домінують у більшості наземних екосистем. Це багаторічні, двохрічні або однорічні трави або вторинно деревовидні рослини зі здерев'янілою соломиною (більшість бамбукових) (Takhtajan, 1966).

Безпосередніми предками сучасних Злакових рослин вважаються неіснуючі в наш час первинні однодольні рослини, що за зовнішніми ознаками є близькими до Commelinales, Restionales надпорядку Commelinanae Тахтаджяна (Takhtajan, 1980). Вважається, що еволюція злакових відбувалася в напрямку від ентомофілії до анемофілії. Цвельов пропонує дві основні гіпотези виникнення Злакових: (1) формування під час росту гір під час одного з орогенезів, вище верхньої межі лісу, потім розповсюдження до рівнин; (2) формування на рівнинах під час аридизації, в результаті якої ліси замінилися на саваноподібне групування рослин. При цьому, все ж першу теорію він розглядає більш ймовірною (Tsvelev, 1987).

З початком розвитку ботанічної систематики для створення класифікації рослин дослідниками використовувалися порівняльні морфологічні методи, які і в наш час не втратили актуальності. Велику кількість видів рослин, в тому числі - і деякі види родини Злакові, були описані та систематизовані Карлом

Ліннеєм (Linnaeus 1753). Перші системи злаків базувалися на ознаках макроструктури, зокрема на будові колосків та суцвіть. Так, спираючись на морфологію, Браун показав різницю в колосках між підродинами *Panicoideae* та *Pooideae* (Brown, 1814). Пізніше Бентам спираючись на морфологічні дослідження попередніх років розділив родину на 14 триб, об'єднавши їх у дві підродини (Bentham, 1881). Одна з найпоширеніших на той час була систематика Гаккеля, що базувалася в основному на попередніх роботах Бентама. Роди в цій системі розташовувалися за принципом ускладнення колосків: від одноквіткових до багатоквіткових колосків, а на перше місце системи була винесена найбільш спеціалізована триба злаків *Andropogoneae* (Bentham, 1881; Bentham & Hooker 1883; Hackel, 1887). Також дослідниками використовувалися й ознаки мікроструктури рослин, щоб систематизувати їх. Зокрема, Дюваль-Жув запропонував систему, яка базувалася на порівняльній анатомії листових пластинок (Duval-Jouve, 1875). На початку ХХ століття великий внесок у систематику родини зробив Краус (Krause, 1909, 1910), розділивши родину на сім триб, а всередині ХХ століття Хітчкок та Чейс, описуючи різноманіття родини Злакових у США, виділяли вже 14 триб, об'єднавши їх в дві підродини - *Festucoideae* та *Panicoideae* (Hitchcock, 1935; Hitchcock & Chase, 1951).

В кінці ХХ ст. система Злаків була повністю перебудована, з використанням ознак мікроструктури. Такими ознаками є анатомія стебла та листків (зокрема і форма клітин продихів), анатомія трихом та епідермісу, будова квіткових плівок, зародків насіння, будова крохмальних зерен, форма і положення першого листка проростків, а також хромосомні числа та морфологія хромосом. На основі цих ознак виділяли 6 основних груп (пізніше – підродин): *Vambugoideae*, *Festucoideae*, *Oryzoideae*, *Arundinoideae*, *Eragrostideae*, *Panicoideae*. Пізніше до них додавалися ще інші підродини в ході дослідження тих чи інших ознак. Найбільшу кількість підродин, а саме – 13, описав Каро (Caro, 1982). В подальших дослідженнях класифікація родини тільки

удосконалювалася: в кінці ХХ ст. Клайтон та Ренвойз описали 6 підродин та 40 триб (Clayton & Renvoize, 1986).

Цвельов, обговорюючи ознаки макро- та мікроструктури зазначав, що їх важливість є перебільшеною, оскільки всі вони є пристосуванням до певних екологічних умов і могли утворюватися паралельно в ході еволюції у різних груп рослин. Також, у кожній підродині, що характеризується певними ознаками, є роди, які «не вписуються» і мають свої особливості, тобто є винятками. Наприклад, ознака переходу до С4 шляху фотосинтезу та, відповідно, інша анатомічна будова листка виникла незалежно і паралельно у різних груп Злакових. Отже, будувати класифікацію за цією ознакою, як пропонували раніше, є недоречним (Tsvelev, 1976, 1987). Тому, класифікуючи злаки, Цвельов виділяє лише 2 підродини – бамбуковидні злаки: *Vamusoide* та справжні Злаки: *Pooideae*, які в свою чергу поділені на триби (що раніше вважалися підродинами) – 14 та 41, відповідно. В той же час вчений зазначає, що в межах підродини тяжко правильно розмістити триби по найбільшій спорідненості внаслідок мозаїчної еволюції та імовірного гібридного походження деяких триб (Tsvelev, 1976, 1987).

## 1.2. ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ ЕВОЛЮЦІЇ ЗЛАКОВИХ

Використання хромосомного числа як таксономічної характеристики стало можливим на початку ХХ ст. І однією з перших робіт по каріосистематиці родини Злакових є роботи Авдулова, що звів разом різні дослідження (Avdulov, 1931). Проте, широкий діапазон хромосомних чисел ( $x = 2-18$ ) та поширеність поліплоїдії і гібридизації призводять до ще більших протиріч стосовно уявлень про еволюцію цієї групи рослин. Вважається, що близько  $\frac{2}{3}$  усіх видів родини Злакові мають гібридне походження, а в деяких випадках - і цілі роди, як, наприклад, *Stipa* та *Calamagrostis* (Dewey, 1984). Стабілізація гібридів у Злакових проходила в основному за допомогою амфіплоїдизації. Встановлено, що первинні диплоїдні види (як фестукоїдні), не дивлячись на їх розірвані та широкі ареали, майже позбавлені спадкової мінливості. Гібридні види, які

мають великі хромосомні числа і містять в геномі більше надлишкової інформації, є навпаки високо мінливими – особливо види з неодноразовою гібридизацією (як пирій повзучий, стоколос безостий). Вони відрізняються надзвичайно високою мінливістю, що сприяє швидкій еволюції. Зниження фертильності гібридних видів часто компенсується переходом до вегетативного розмноження або апоміксису, як у випадку з очеретом, який майже втратив здатність до генеративного розмноження (Tsvelev, 1987).

Існує кілька гіпотез щодо предкового числа хромосом у Злакових. Редукційна гіпотеза Авдулова передбачає, що предкове базове хромосомне число – це  $x = 12$ , з якого утворилися менші числа, шляхом редукції та низхідної анеуплоїдії (Avdulov, 1931). Одним з підтверджень цієї гіпотези є хромосомне число триби *Vambusoideae*, представників якої вважають найбільш давніми видами злаків (Raven, 1975). На противагу цієї гіпотези Стебінсоном було висунуто «гіпотезу вторинної поліплоїдії», за якої предковими формами вважається  $x = 5$  та  $6$ , з яких в подальшому внаслідок поліплоїдизації утворилися  $x = 11$  та  $12$ . Основним аргументом стала наявність хромосомних чисел  $x = 6$  та  $7$  у найбільш примітивних родів кількох триб - *Danthonia* і *Pentastachis* триби *Danthonieae* та *Sorghum* триби *Andropogoneae* (Stebbins, 1982, 1985). Цвельов вважав предковим хромосомним числом  $x = 7$ , яке в подальшому або кратно збільшувалося внаслідок поліплоїдії, або зменшувалося внаслідок втрати 1, 2 чи більше хромосом гаплоїдного набору, або змінювалося внаслідок гібридизації видів з різним набором хромосом (Tsvelev, 1987).

Цитогенетичні методи часто використовуються і сьогодні. Так, на початку ХХІ ст. була висунута третя гіпотеза – «хромосомної парсимонії», згідно якої: (1) еволюція ліній *Joinvilleaceae*/*Ecdeiocoleaceae*/*Poaceae* бере свій початок від предків *Restionaceae* ( $x = 9$ ); (2) *Ecdeiocoleaceae* та *Poaceae* (*Streptochaeta*, *Anomochlooideae*), що мають  $x = 11$  характеризуються анеуплоїдним походженням; (3) редукція числа хромосом до  $x = 9$  з подальшим подвоєнням в межах групи *Anomochlooideae* привела до появи  $x = 18$  в *Anomochloa*; (4) у *Pharagoideae* та *Puelioideae* відбулось анеуплоїдне збільшення числа хромосом від

$x = 11$  до  $12$  з подальшою диверсифікацією в інші таксони. Загалом ця гіпотеза спростовує гіпотезу вторинної поліплоїдії, але лише частково підтримує редукційну гіпотезу (Hilu, 2004).

Загалом сучасні методи хромосомного аналізу, особливо картування специфічних ділянок хромосом, є хорошим інструментом для вивчення еволюційних процесів у таксонів низького рангу. Так, при детальному вивченні хромосом видів роду *Brachypodium* запропоновано кілька варіантів еволюції каріотипу. Для дослідження були обрані диплоїдні та алотетраплоїдні види і два види з невідомою плоїдністю. Відповідно до першої гіпотези, геном диплоїдного виду *B. distachyon* ( $2n = 10$ ) бере свій початок від виду невідомої плоїдності *B. mexicanum* ( $2n = 40$ ) або від диплоїдного виду *B. stacei* ( $2n = 20$ ) внаслідок низхідної анеуплоїдії, а інші диплоїдні види *B. sylvaticum* ( $2n = 16$ ;  $2n = 18$ ), *B. pinnatum* ( $2n = 28$ ), *B. arbuscular* ( $2n = 18$ ) утворилися з *B. distachyon* внаслідок висхідної анеуплоїдії. Алотетраплоїди утворилися внаслідок міжвидової гібридизації між *B. distachyon* та іншими диплоїдними видами. Друга гіпотеза передбачає наявність проміжних видів з  $2n = 18$  між родоначальниками *B. mexicanum* або *B. stacei* та анеуплоїдним *B. distachyon* (Betekhtin et al., 2014).

Після підрахунку хромосом та географічного картування різних цитотипів виду *Paspalum stellatum* були досліджені філогенетичні взаємозв'язки між цитотипами, щоб зробити висновок про походження та еволюцію поліплоїдного комплексу *P. stellatum* та суміжних видів. Показано, що батьківськими формами для цитотипу *P. stellatum* з  $2n = 32$ , могли бути *P. schesslii* та диплоїдний цитотип *P. stellatum* (Bonasora et al., 2018).

Також, при дослідженні каріотипу роду *Phalaris* було показано, що для рослин цього роду характерні три геноми: (1) геном А – характерний лише для Середземномор'я з хромосомним числом  $x = 6$ , (2) геном В, що є космополітом з  $x = 7$  та (3) геном С з хромосомним числом  $x = 7$ , поширений у Середземномор'ї та середньому Сході. Передбачається, що тетраплоїдні види

утворилися в наслідок аутоплоїдії та аллополіплоїдії із залученням В та С геномів.

Незважаючи на інтенсивне застосування морфолого-анатомічних та цитогенетичних підходів, багато питань стосовно еволюції, філогенії та систематики родини Злакових все ще залишаються невирішеними. Подальший прогрес у їх розв'язанні можливий із залученням молекулярних методів.

### 1.3. ВИКОРИСТАННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЛОГЕНІЇ РОДИНИ РОАСЕАЕ

На сьогодні не вдалося створити єдиної класифікації злакових рослин та встановити філогенетичні зв'язки, які б не викликали питань або суперечностей. Вважається, що систематика родини Роасеае ускладнена через високу морфологічну подібність видів, тому все частіше дослідниками застосовуються молекулярні методи дослідження, зокрема – різні молекулярні маркери (Wolfe & Liston, 1998). Молекулярний маркер – це послідовність ДНК, що може бути використана для виявлення різниці на молекулярному рівні між індивідуумами, популяціями чи таксонами різного рангу. Є багато різних підходів щодо класифікації молекулярних маркерів. Один з них – це класифікація на основі методів, які використовують у дослідженні. За цим критерієм розрізняють маркери, які (1) засновані на блот-гібридизації; (2) базуються на полімеразно-ланцюговій реакції (ПЛР); (3) використовують сиквенування певної ділянки ДНК чи цілого геному. У вивчені молекулярної еволюції та таксономії Злакових використовуються багато методів та молекулярних маркерів. У цій роботі як приклади проілюстровані кілька з них.

Одним з перших методів дослідження на основі блот-гібридизації є аналіз поліморфізму довжини рестриктних фрагментів ДНК (restriction fragment length polymorphism – RFLP). RFLP аналіз був використаний для перевірки гіпотези щодо походження одомашненої кукурудзи в результаті гібридизації між багаторічним теосинте (*Zea diploperennis*) та *Tripsacum*. В результаті було показано, що обидва види мають спільні з культурною кукурудзою алелі, які

успадковуюються і у другому поколінні гібридів теосинте та *Tripsacum* (Eubanks, 1997).

Кілька методів на основі ПЛР-реакції було використано і для вивчення поширення та еволюції антарктичного виду *Deschampsia antarctica* (родина Poaceae) – однієї з двох покритонасінних рослин, що населяють Антарктику. AFLP-маркери (amplified fragment length polymorphism - поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів) було застосовано для прояснення питання, чи фенотипова мінливість у популяціях *D. antarctica* визначається спадковими факторами, або ж залежить від впливу довкілля. Автори стверджують, що фенотипові відмінності різних локацій є результатом адаптації до певних умов середовища (Chwedorzewska et al., 2004). Час та шлях поширення видів до Антарктиди також є дискусійним питанням (Mosyakin et al., 2007; Parnikoza et al., 2007). За вивченням різноманітності AFLP показано наявність градієнту генетичної різноманітності, що йде від Фолклендських островів на південь до Антарктики. Цей градієнт різноманітності спостерігався також на Антарктичному півострові: різноманітність знижувалась у напрямку з півночі на південь. Використовуючи RAPD-маркери (аналіз випадково ампліфікованої поліморфної ДНК – random amplification of polymorphic DNA) було охарактеризовано *D. antarctica* з двох регіонів: о-ва Кінг-Джордж та о-вів району Аргентинського архіпелагу. Показано різницю між досліджуваними популяціями на молекулярному рівні, обмеження в обміні генетичною інформацією між ними та існування географічного градієнту генетичного поліморфізму *D. antarctica* в Прибережній Антарктиці зі зниженням цього показника в напрямі з півночі на південь (Andreev et al., 2010, 2012).

Ще одним з молекулярних маркерів, які використовуються для дослідження еволюції Злакових, є послідовності мікросателітної ДНК. Наприклад встановлено, що колонізація Антарктики щучником антарктичним супроводжувалась змінами у хромосомній організації повторюваних послідовностей сателітної ДНК (González et al., 2017). Досліджувалася сателітна ДНК і у роду *Poa*. В результаті ідентифіковано та описано 4



мікросателітні маркери для роду, які можна застосовувати у філогенетичних дослідженнях (Wei et al., 2020).

Проте, часто ПЛР-методи ґрунтуються на ампліфікації на так званих «анонімних» послідовностях, що є недоліком. У більшості випадків їх застосування підходить для аналізу таксонів низького рангу. Тому, все частіше застосовуються методи сиквенування ДНК окремо, або у поєднанні з іншими методами.

Наприклад, для генотипування рослин та їх сортів використовується метод SNP (технологія з використанням маркера на основі поліморфізму по одиничному нуклеотиду – single nucleotide polymorphisms): створенню такого маркера передують генетипування сиквенуванням. Наприклад, було виявлено 2692 специфічні SNP маркери, завдяки яким було детально описано філогенію роду *Triticum*. За допомогою цих SNP маркерів можна ідентифікувати та розрізнити сорти та місцеві форми звичайної (*T. aestivum*) та твердої (*T. turgidum*) пшениці. Також це дозволило класифікувати види та підвиди роду, які дуже важко розрізнити за морфологічними ознаками. Створена дендрограма показала, що поліплоїдні види пшениці можна розділити на групи за наявністю геномів A, B, D та G (Hyun et al., 2020). В іншому дослідженні для кількісної оцінки алелей роду *Lolium* були розроблені SNP маркери, які дозволяють розрізняти *L. perenne* та *L. multiflorum* і є корисним інструментом для управління колекціями зародкової плазми (Rajčić et al., 2015).

Крім того, за клітинною локалізацією маркерних послідовностей ДНК, виділяють ядерні та позахромосомні молекулярні маркери (мітохондріальні і хлоропластні). Для вивчення таксонів високого рангу рослин часто застосовують ділянки саме хлоропластні ДНК.

Наприклад, з використанням CAPS маркерів (метод розщеплення ампліфікованої поліморфної послідовності – cleaved amplified polymorphic sequence) на основі хпДНК розроблено ДНК-баркодинг для польової лабораторної ідентифікації видів трав (за приклад взято британські види злакових). У дослідженні представлені CAPS маркери, які можуть бути

використані для вивчення походження видів, визначення батьківських видів для рослин гібридного походження, філогенетичних досліджень між родами, тощо. Проте, вони не можуть бути використаними для філогенетичних досліджень на видовому рівні або дослідженні поліморфізму між підвидами чи сортами (Haider & Wilkinson, 2020).

Загалом, значний прогрес у філогенетиці родини Poaceae було досягнуто завдяки порівняльному вивченню сиквенованої хлоропластної ДНК (Quintanar et al., 2007; Givnish et al., 2010; Saarela et al., 2010; Ding & Dong, 2019). Зокрема, для встановлення філогенетичних зв'язків в межах родини було використано ген хпДНК – *matK*. Показано, що *Streptochaeta* та *Anomochloa* формують дві основні лінії Злакових. Інші групи групуються наступним шляхом: (1) підродина *Vamusoideae* (крім *Brachyelytrum*) плюс *Pooideae*; (2) *Oryzoideae*; та (3) підродина *Panicoideae*. *Arundinoideae*, *Centothecoideae*, and *Chloridoideae* (РАСС). Тим не менш, взаємозв'язки між підродинами були не до кінця з'ясовані або мали низьку статистичну підтримку (Hilu et al., 1999).

Важливий внесок у дослідженні еволюції рослин зробило професійне співтовариство вчених ботанічної спільноти – Grass Phylogeny Working Group (GPWG), яка була заснована в 1996 році з метою поглиблення знань в галузі систематики та еволюції Злакових. Основною метою цієї робочої групи є дослідження філогенії родини Poaceae шляхом аналізу послідовностей ДНК, як хлоропластних, так і ядерних генів, а також морфології рослин. На основі цих даних було виділено дві клади в родині – РАССAD (РАСМАД) та ВЕР (Grass Phylogeny Working Group et al., 2001).

Також, GPWG з'ясували, що більшість представників клади РАСМАД характеризуються С4-типом фотосинтезу. Філогенетичні групи в межах даної клади мають анатомічні та біохімічні особливості, пов'язані із С4 шляхом фотосинтезу. Також підтвердилась гіпотеза походження С4-рослин від предкової форми С3-рослин. Дані висновки були отримані на основі використання трьох пластидних маркерів. Вважають, що саме приналежність

більшості представників родини Злакові до C4-рослин дозволила їм зайняти панівне положення серед інших рослин (Grass Phylogeny Working Group, 2012).

Базуючись на останніх молекулярних дослідженнях, а саме генів хпДНК *matK* та *ndhF*, та морфологічних дослідженнях було запропоновано сучасну класифікацію приблизно 12000 видів родини Злакових з 771 роду, які були згруповані в 12 підродин, 6 супертриб, 51 трибу та 81 підтрибу (Soreng et al., 2015). В свою чергу 12 підродин поділяють у дві клади: PACMAD та BOP. Однією з найбільших триб клади BOP є триба Pooideae, яку в свою чергу поділяють на дві великі групи: Chloroplast group 1 (Aveneae type) та Chloroplast group 2 (Poeae type).

З використанням маркерів ділянок хлоропластної ДНК були прояснені філогенетичні відносини роду *Paspalum*, більшість з представників якого виникли внаслідок гібридизації. Дослідження показали, що рід є монофілетичним, якщо *P. inaequalve* (гексаплоїд) виключити з роду, а маленький рід *Thrasypsis* об'єднати з *Paspalum* (Rua et al., 2010). Три ділянки хпДНК (*matK*, *rbcL* та *trnH-psbA*) були використані для аналізу філогенетичних взаємозв'язків та «материнського виду» роду *Kengyilia* та їх близьких видів. Показано наявність трьох монофілетичних груп роду та імовірна наявність як мінімум двох розбіжних «материнських донорів» в межах роду (Luo et al., 2012).

Незважаючи на велику кількість досліджень, все ще є ряд нерозкритих питань у систематиці родини Злакових. Зокрема у деяких випадках показано, що філогенетичні дерева, отримані для хпДНК, не відповідають таким для ділянки ядерного геному. Це можна пояснити широким розповсюдженням міжвидової гібридизації та сітчастої еволюції (Gaut et al., 2000; Catalán et al., 2004; Inda et al., 2014; Cheng et al., 2016; Tkach et al., 2019). Також було встановлено, що порівняння морфологічних ознак є малоінформативним, оскільки вони, як правило, демонструють дуже високий ступінь гомоплазії та здатні змінюватися протягом порівняно короткого еволюційного часу (Döring et

al., 2007; Duvall et al., 2007; Quintanar et al., 2007; Soreng et al., 2007; Saarela et al., 2010; Tkach et al., 2019).

Тому досить часто для досліджень використовують хпДНК у поєднанні з ядерними генами (Davis & Soreng, 2007; Volkov et al., 2010,). Наприклад, для дослідження еволюційних взаємозв'язків між видами *Trisetum* та іншими представниками підтриби було застосовано послідовності ДНК з чотирьох генних областей (ITS-внутрішній транскрибований спейсер 35S рДНК), спейсер *rpl32-trnL*, спейсер *rps16-trnK* та інтрон *rps16*) та запропоновано деякі зміни до систематики Злакових, зокрема виділення нового роду *Sibirotrisetum* (Barberá et al., 2020).

Одними з найбільш інформативних ядерних молекулярних маркерів вважаються повторювані послідовності, зокрема гени рибосомної РНК (рДНК) – 35S (45S) та 5S рДНК.

Кожна повторювана одиниця 35S рДНК включає в себе послідовності, які кодують 18S, 5,8S та 25S рРНК, і кілька суміжних спейсерних послідовностей, частина яких транскрибується, а інша – ні. ITS1 та ITS2 розміщені з двох боків гена 5,8S рРНК, а міжгенний спейсер (IGS) знаходиться між 3' кінцем гена 25S рРНК та 5' кінцем гена 18S рРНК. Найбільш консервативними є кодувальні ділянки, ITS1-2 є більш мінливими, а IGS відзначається високою варіабельністю навіть у близькоспоріднених видів. Саме ця особливість 35S рДНК дала можливість використовувати її як молекулярно-генетичний маркер для вивчення молекулярної еволюції вищих рослин та для вивчення питань систематики та філогенії (Volkov et al., 2003, 2004).

Ділянки 35S рДНК було використано і для дослідження молекулярної еволюції родини Poaceae. На основі послідовностей ITS вивчено філогенетичні відносини родини і підтверджено існування основних підродин: Bambusoideae, Pooideae, Arundinoideae, Centothecoideae, Chloridoideae та Panicoideae. Також визначено, що базальною групою всіх трав є *Streptochaeta* та *Pharus* (Hsiao et al., 1998).

Філогенетичне дерево, побудоване на основі послідовності IGS 35S рДНК відображає філогенетичні відносини між видами роду *Saccharum*, *Erianthus arundinaceus*, *Imperata cylindrica* та *Miscanthus sinensis var. glaber*. Показано, що *M. sinensis var. glaber* є генетично ближчим до видів роду *Saccharum*, в той час як *E. arundinaceus* – до *I. cylindrical* (Hu et al., 2019). А за допомогою клонування повторів ITS1-2 видів роду *Helictotrichon* було підтверджено, що диплоїдний вид *H. bromoides* є єдиним донором геному всіх поліплоїдів (Winterfeld et al., 2009).

При дослідженні рибосомальних генів 35S рРНК *D. antarctica* показано присутність в антарктичних популяціях кількох варіантів спейсерної ділянки ITS1-2, які відрізняються специфічними мутаціями від рослин, що зростають за межами Антарктики (Volkov et al., 2010; Andreev et al., 2012). Також відмінність між популяціями *D. antarctica* з Патагонії і Антарктики показано з використанням молекулярної цитогенетики та порівнянням некодувальних ділянок хлоропластної ДНК та ITS1-2 35S рДНК. Було встановлено, що популяції *D. antarctica* з Патагонії демонструють більшу мінливість хромосомних і молекулярних ознак порівняно з антарктичними популяціями (González et al., 2016; Fasanella et al., 2017). Ці дані добре узгоджуються з гіпотезою про Південноамериканське походження *D. antarctica*.

Гени, що кодують 5S рРНК також є досить інформативним молекулярним маркером і їх часто використовують у дослідженні еволюції рослин.

## **1.4. ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ У ФІЛОГЕНЕТИЦІ РОСЛИН**

### **1.4.1. Молекулярна організація 5S рДНК**

Характерною особливістю геномів насінних рослин є високий вміст повторюваних послідовностей (Kubis et al., 1998; Lee & Kim, 2014). Значну частину цієї фракції геному становлять транспозони та сателітні ДНК, які здебільше не виконують певних функцій та еволюціонують з великою швидкістю. Крім того, до середньо повторюваних послідовностей належать

ділянки, які кодують 5S та 35S (18S+5,8S+26S) рРНК (так звана рДНК). На відміну від більшості повторюваних послідовностей, рДНК присутня у геномах всіх еукаріотичних організмів, а її функція добре відома.

У еукаріот 5S рДНК представлена тисячами копій повторюваних одиниць (повторів), які організовані тандемно, за принципом «голова-хвіст» та утворюють кластери, розташовані на одній чи кількох хромосомах (Cloix & Tutois, 2000; Garcia et al., 2020). Кожний повтор складається з еволюційно консервативної ділянки, яка кодує 5S рРНК, та варіабельного міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS). Висока еволюційна консервативність кодувальної ділянки 5S рДНК є необхідною для збереження функцій 5S рРНК у складі великої субодиниці рибосоми (Barciszewska et al., 2001).

Транскрипцію 5S рДНК забезпечує РНК-полімераза III (Pol III) та відповідні транскрипційні фактори (TF). Особливістю Pol III є будова її промотора, який складається з внутрішніх та зовнішніх елементів. Внутрішні елементи промотора – А-бокс, ІЕ (internal element) та С-бокс – є частиною кодувальної ділянки (Douet et al., 2007; Layat et al., 2012). Ці елементи промотора є мішенню для приєднання TF. Зокрема, до специфічного для 5S рДНК С-боксу послідовно приєднуються TFІІА і TFІІС. Після цього з 5S рДНК зв'язується TFІІВ (Paule & White, 2000), який забезпечує плавлення подвійної спіралі ДНК перед кодувальною ділянкою, а також взаємодію комплексу ініціації транскрипції з РНК-полімеразою (Kassavetis et al., 2001; Vaillant et al., 2007). Отже, мутації у внутрішніх елементах промотора мають не тільки впливати на структуру 5S рРНК та будову рибосоми, але й позначатись на експресії 5S рДНК.

На відміну від кодувальної ділянки, IGS є еволюційно мінливим, оскільки більша його частина не транскрибується та, імовірно, не має будь-яких функцій. Більше того, існує точка зору, що для ініціації транскрипції 5S рДНК зовнішні елементи промотору взагалі непотрібні (Geiduschek, 1988; Orioli et al., 2012). Відповідно, виникнення мутацій у IGS не повинно мати негативних наслідків. Тим не менш, у IGS рослин виявлені відносно консервативні

елементи, які беруть участь у ініціації (зовнішні елементи промотора) та термінації (термінатор) транскрипції (Venkateswarlu et al., 1991; Fulneček et al., 2002; Cloix et al., 2003; Douet & Tourmente 2007; de Souza et al., 2020). Найбільш детально значення зовнішніх елементів промотора для транскрипції 5S рДНК досліджено для арабідопсису (Cloix et al., 2003), тоді як для інших видів рослин це питання все ще потребує подальшого вивчення.

Транскрипційна активність 5S рДНК регулюється також із залученням епігенетичних механізмів. Так, для арабідопсису було показано, що РНК-спрямоване ДНК метилування (RdDM) по несиметричним сайтам СНН викликає репресію транскрипції частини копій 5S рДНК, обумовлюючи явище дозової компенсації (Douet et al. 2009; Layat et al., 2012). Метилування цитозину по симетричним сайтам, як і модифікації гістонів (деацетилювання), також беруть участь у епігенетичному контролі активності 5S рДНК (Vaillant et al. 2007; Layat et al., 2012).

Для 5S рДНК характерна узгоджена (концертна) еволюція, яка полягає у гомогенізації повторюваних послідовностей, що призводить до зменшення внутрішньогеномної і, як наслідок, міжвидової та внутрішньо популяційної гетерогенності (Cloix et al., 2003). Оскільки мутації, що виникають в IGS, мають переважно нейтральний характер, то вони демонструють тенденцію до накопичення. Завдяки цьому IGS еволюціонує з більшою швидкістю, ніж інші ділянки геному, що призводить до появи відмінностей у послідовності IGS тісно споріднених видів або в деяких випадках окремих популяцій. Саме тому, IGS широко використовується як молекулярний маркер для ідентифікації видів та у філогенетичних дослідженнях.

#### **1.4.2. 5S рДНК як філогенетичний маркер у покритонасінних рослин**

Однією з перших покритонасінних рослин, для якої було детально охарактеризована структура та організація 5S рДНК, є модельний об'єкт генетичних досліджень *Arabidopsis thaliana* з родини Капустяні (Brassicaceae), яка є належить до класу Суперрозиди (Superrosids). Для чотирьох екотипів

*A. thaliana* була показана наявність близько 1000 копій 5S рДНК у гаполоїдному геномі. Це становить приблизно 0,7% від загального розміру геному. Також встановлено існування двох структурних класів, які відрізняються за довжиною (Campell et al., 1992, Cloix et al., 2000). У іншого представника родини Brassicaceae, *Brassica campestris* знайдено лише один клас IGS 5S рДНК довжиною 376 нп, а розмір кодувальної ділянки становить 119 нп (Bhatia et al., 1993).

За допомогою аналізу 5S рДНК досліджували також філогенетичні відносини представників родини Миртові (Myrtaceae). Аналіз 25 видів родини показав, що у цій родині 5S рДНК представлена двома основними класами, а розмір повтору лежить у межах від 308 до 413 нп. Показано, що камедевмісні рослини роду *Eucalyptus* (підроди *Blakella* та *Corymbia*) є більш спорідненими до роду *Angophora*, ніж до інших Евкаліптових, що не місять камедь (Udovicic et al., 1995).

При вивченні молекулярної організації 5S рДНК льону *Linum usitatissimum* (родина Linaceae) було показано, що у представників цього виду існує як мінімум 5 груп 5S рДНК, які мають довжину повторювальної ділянки 350 нп, але відрізняються між собою за послідовностями (Schneeberger et al., 1989). Пізніше для характеристики 5S рДНК цього роду було застосовано метод FISH-гібридації. У більшості випадків 5S рДНК розташовується на кількох парах хромосом. Для видів, які мають 30 пар хромосом, сайти 5S рДНК знаходяться на трьох парах: 3, 8 та 13. У видів із 16 хромосомами знайдено лише 1 сайт на хромосомній парі 3, а у видів з 18 хромосомами – лише на парі 1. Отримані результати дозволяють висунути припущення, що види з  $2n = 16$ , 18 та 30 походять від спільного предка з  $2n = 16$  (Muravenko et al., 2004, 2009).

У представників роду *Populus* (родина Salicaceae) було охарактеризовано два класи 5S рДНК: клас 1 (розмір повтору – 634 нп), який містить мікросателітні повтори GAA у IGS, і клас 2 (543 нп), який не містить таких повторів. IGS класу 1 демонструє поліморфізм за мікросателітними



послідовностями: два клони містять по 10 повторюваних одиниць GAA, а один клон - 16 таких одиниць (Negi et al., 2002).

Порівняльний аналіз 5S рДНК виявився інформативним і при вивченні представників родини Бобові (Fabaceae). Дослідження десяти видів роду *Vigna* підроду *Ceratotropis* показали, що наявність чотирьох типів 5S рДНК, довжина повтору у яких варіює від 214 до 342 нп. У IGS *V. radiata* знайдено делецію розміром 100 нп. Види роду *Vigna* відрізняються швидкістю еволюції та характером мінливості 5S рДНК. Зокрема, для восьми досліджених видів (*V. trilobata*, *V. mungo* та ін.) притаманна низька внутрішньовидова дивергенція цієї ділянки геному, тоді як у *V. nakashimae* та *V. riukiensis* присутні різноманітні внутрішньогеномні варіанти, що імовірно свідчить про неповну гомогенізацію повторів 5S рДНК. Крім того, за допомогою цього молекулярного маркера було зроблено крок до розуміння походження тетраплоїдного виду *V. glabrescens*. Раніше вважалося, що цей вид походить або від диплоїдних видів секції *Angulares*, *V. angularis* та *V. umbellata*, або від тетраплоїдного виду *V. reflexo-pilosa*, який в свою чергу походить від *V. hirtella* та *V. trinervia* (секції *Angulares*). Проте з використанням 5S рДНК показано, що предкові види *V. glabrescens* ймовірно не належать до секції *Angulares*, а один з предкових видів належить до секції *Ceratotropis*. Другий предковий вид можливо втрапився (Saini & Jawali, 2009).

Аналіз послідовностей IGS 5S рДНК показав єдине походження шести різновидів культурного арахісу. Дикий вид *Arachis monticola* (родина Fabaceae) розглядається як безпосередній тетраплоїдний предок, від якого в ході одомашнення виник культурний *A. hypogaea*. В ході дослідження з'ясовано, що є два типи послідовностей 5S рДНК (довжиною приблизно 470 нп), що належать до А або В геному арахісу. (Grabiele et. al., 2012).

У геномі винограду *Vitis vinifera* (родина Vitaceae) було знайдено три варіанти 5S рДНК. Два варіанти – основний довгий (609 нп) та короткий (549 нп) – знайдено у всіх досліджених генотипах. Ці два варіанти різняться між собою не тільки за довжиною, а й нуклеотидними замінами в ділянці IGS.

Третій варіант – DEL short repeat (489 нп) – знайдений лише в одному генотипі. Він є найкоротшим та відрізняється від другого (короткого) варіанту делецією в 60 нуклеотидних пар. Показано також, що всі три варіанти локалізовані в одному локусі (Falistocco et al., 2007).

5S рДНК була досліджена й для кількох представників класу Суперастериди (Superasterids). Прикладом використання 5S рДНК як молекулярного маркеру у філогенетиці є дослідження родини Пасльонових (Solanaceae). Було встановлено, що у більше 60 видів роду *Nicotiana* довжина повторів 5S рДНК складає від 220 до 1055 нп. Наявність одного класу повторів характерно для 37 видів роду, а для 29 видів особливістю є наявність двох класів повторів 5S рДНК. Саме диплоїдні види роду *Nicotiana* (n=12) переважно характеризуються одним класом 5S рДНК, тоді як тетраплоїдні (n=24) – переважно двома класами, успадкованими від обох диплоїдних предків. Для культурного виду *Nicotiana tabacum* знайдено два структурні класи 5S рДНК, довжиною приблизно 646 та 430 нп, що відрізняються між собою довжиною міжгенного спейсера. У IGS вісімнадцяти видів роду *Nicotiana* знайдена GC-багата ділянка, яка відсутня як у двох видів цього роду (*N. sylvestris*, *N. longiflora*), так і у представників споріднених родів *Solanum* та *Petunia* (Komarnytsky & Komarnytsky, 2000; Matyasek et al., 2002).

Нуклеотидні послідовності 5S рДНК чотирьох ліній картоплі *Solanum tuberosum*, 26 диких видів роду *Solanum* (сек. *Petota*), томату *Solanum lycopersicon* (= *Lycopersicon esculentum*) були порівняні між собою та з 5S рДНК дикого європейського виду *S. dulcamara* (сект. *Dulcamara*). Встановлено, що довжина повтору коливається від 285 до 349 нп. Центральна частина IGS є високо мінливою завдяки чисельним делеціям/дуплікаціям короткого мотиву, який демонструє схожість з кодувальною ділянкою. Структурні перебудови знайдені в IGS були використані для реконструкції філогенетичних зв'язків досліджуваних видів. Зокрема встановлено, що томат є близько спорідненим з видами *Solanum*, які належать до секції *Petota* (Volkov et al., 2001).

При вивченні 5S рДНК представників родини Айстрові (Asteraceae) встановлено, що приблизно у 25% представників родини спостерігається однакова локалізація 5S та 35S рДНК на хромосомах. Це пояснюється тим, що послідовності цих двох рДНК об'єднані у комбіновані повтори, які містять кодувальні ділянки для всіх чотирьох рРНК. Аналіз послідовності 26–18S IGS *Artemisia absinthium* показав, що в цьому спейсері присутні дві ділянки 5S рДНК: одна, більш консервативна знаходиться ближче до кінця гену 26S (5SrDNA-1), а друга, менш консервативна – ближче до центру IGS (5SrDNA-2). В той час, як 5SrDNA-1 виявляє усі структурні ознаки функціонального гена, 5SrDNA-2 містить делецію у внутрішньому промоторі і, швидше за все, є псевдогеном. Інсерція 5S рДНК у спейсер 35S рДНК, імовірно, відбулась до того як *Artemisia* відділилася від інших представників Asteraceae (Garcia et al., 2009, 2010; Mazzella et al., 2010). Можливо, у цьому процесі були залучені ретротранспозони (Kalendar et al., 2008) або така перебудова відбулася за рахунок негомологічної рекомбінації 5S та 35S рДНК, що знаходилися на одній хромосомі (Garcia et al., 2009). Ще одним можливим механізмом є позахромосомна рекомбінація кільцевої копії 5S рДНК та хромосомного локусу 35S рДНК (Drouin & de Sá 1995; Cohen et al. 2008; Garcia et al., 2009). Також можливим видається об'єднання цих двох ділянок ще у кільцевій формі до їх інтегрування у хромосому (Garcia et al., 2009).

Серед покритонасінних рослин 5S рДНК добре охарактеризована для багатьох економічно важливих культур. Наприклад, 5S рДНК була використана для з'ясування внутрішньовидової таксономії чаю, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (родина Theaceae) з метою розрізнити сорти, які мають різне походження та стійкість до холоду. Зазначається, що в геномі *Camellia sinensis* присутні два класи 5S рДНК, що відрізняються за довжиною: 300 та 325 нп, відповідно. Отримані результати вказують, що 5S рДНК можуть бути використані для розмежування сорту Chinaгу від інших сортів, таких як Assamica і Cambod (Singh & Singh, 2001; Singh & Ahuja, 2006).

Більшість культивованих видів роду Лобода (*Chenopodium*, родина Amaranthaceae) – це поліплоїди, але їхні таксономія та еволюція все ще погано вивчені. Порівняння послідовностей ITS ядерної 35S рДНК, чотирьох ділянок пластидного геному та IGS 5S рДНК двох тетраплоїдних ( $2n = 4x = 36$ ) видів, андського *C. quinoa* та північноамериканського *C. berlandieri* та їх диплоїдних родичів (17 видів) дозволили прояснити їх походження. Філогенетичний аналіз підтвердив алотетраплоїдне походження обох видів із залученням диплоїдів, які належать до двох різних геномних груп (геноми А і В). Імовірно, донором субгеному В для *C. quinoa* та *C. berlandieri* був вид, подібний до нині існуючого *C. ficifolium*. Походження субгеному А є більш дискусійним питанням, для вирішення якого використовувалися кілька молекулярних маркерів, оскільки для обох тетраплоїдних видів показана втрата одного локусу рДНК материнського виду. Родоначальник А-субгеному *C. quinoa* міг бути подібним до існуючого виду *C. nevadense*. З іншого боку, А-субгеном *C. berlandieri* має спільні повторювані послідовності з *C. watsonii*, але не з *C. nevadense* (Kolano et al., 2016). Результати порівняльного аналізу послідовностей ITS ядерної 35S рДНК, чотирьох ділянок пластидного геному та IGS 5S рДНК і геномної *in situ* гібридизації (GISH) для п'яти євразійських гексаплоїдних ( $2n = 6x = 54$ ) видів, *C. album*, *C. giganteum*, *C. pedunculare*, *C. formosanum* та *C. opulifolium*, а також їх диплоїдних та тетраплоїдних родичів, вказують на їх алоплоїдне походження. Імовірним донором В-геному для цих алогексаплоїдів міг бути один з досліджених раніше диплоїдних видів. Водночас, донором геному А для *C. album*, *C. giganteum* та *C. pedunculare* міг бути материнський вид, схожий на *C. betaceum* (*C. strictum* auct.), або на *C. striatiforme*, або на азіатські диплоїди (Kolano et al., 2019).

За допомогою 5S рДНК вдалося пролити світло на філогенію та таксономію поширеного у всьому світі роду *Anemone* (родина Ranunculaceae). Виявилось, що для представників цього роду характерні високий рівень поліморфізму послідовності IGS 5S рДНК, наявність кількох варіантів повторів різної довжини (від 150 до 400 нп) та псевдогенів. 5S рДНК в роді *Anemone*

еволюціонувала в два етапи: (1) виникнення та дивергенція двох ліній 5S рДНК, з довгим (підрид *Anemone*) та з коротким (підрид *Anemonidium*) IGS; (2) подальше збільшення або зменшення розміру IGS. Філогенетичний аналіз підтримує гіпотезу, що *A. parviflora* може бути батьківським видом та донором субгеному D для алополіплоїдів, *A. multifida* (BBDD) та *A. baldensis* (AABBDD). В *A. baldensis* в ході еволюції, можливо, відбувся внутрішньолокусний обмін ділянками, з подальшою заміною 5S рДНК. Таким чином, певні ділянки субгеному D замінилися на відповідні ділянки субгеному B. Також представлено докази (слабка гомогенізація, наявність псевдогенів і нових варіантів 5S рДНК) щодо двох моделей еволюції 5S рДНК у геномі представників підродів *Anemone* та *Anemonidium*: концертної еволюції та «народження і смерті» (Mlinarec et al., 2016).

Серед однодольних рослин 5S рДНК найбільш добре вивчена у основних злакових культур, які належать до родини Poaceae, особливо у представників триби Triticeae.

Однією з перших культур, для якої 5S рДНК було використано як молекулярний маркер, є м'яка пшениця *Triticum aestivum* L. та споріднені види родів *Aegilops/Triticum* та *Lophopyrum*. При цьому було виявлено два варіанти повторів, які мають однакові по довжині кодувальні послідовності, але різні IGS довжиною 290 та 380 нп, розташовані на різних хромосомах. Аналіз особливостей молекулярної еволюції цих двох варіантів 5S рДНК показав, що гомогенізація повторів відбувається лише в межах локусу. На сьогоднішній день відомо кілька типів геномів пшениці: A, B, D та G. Імовірно, A геном у *T. turgidum* та *T. aestivum* походить від геному *T. urartu*, а не від *T. monococcum*, як вважалося. Раніше, базуючись на морфологічних, географічних та цитогенетичних даних, було висунуто гіпотезу, що донорами геному B для поліплоїдних пшениць *T. turgidum* та *T. aestivum* є види *Aegilops bicornis*, *Ae. longissima*, *Ae. searsii*, *Ae. sharonensis*, *Ae. speltoides* та *T. urartu*. Аналіз 5S рДНК підтвердив, що донором геному B цих видів є диплоїдний вид *A. speltoides* (Kerby & Kuspira, 1987; Dvořák et al., 1988, 1989, 1993; Baum et al.,

2004). Донором геному G для *T. zhukovskyi* та *T. timopheevii* також вважається *A. speltoides*, але інша форма цього виду, відмінна від донора геному B (Dvořák & Zhang 1990). Відповідно, донором геному D *T. aestivum* був вид *A. tauschii* (McFadden & Sears, 1944).

В той час як для диплоїдних видів родів *Aegilops/Triticum* характерні два класи 5S рДНК (410 нп та 500 нп), алоплоїдні види мають менше структурних класів, ніж сума таких класів у їхніх предкових видів. Загалом у геномах близькоспоріднених родів *Aegilops* та *Triticum* знайдено кілька гаплотипів 5S рДНК, які різняться за розміром (Baum et al., 2010a, 2012).

Представник роду *Amblyopyrum* (*A. muticum*, родина Poaceae) характеризується такими ж класами 5S рДНК, що і диплоїдні види *Aegilops*. Це дає підстави для включення *Amblyopyrum* до роду *Aegilops* (Baum et al., 2009). На основі аналізу 5S рДНК були також висунуті припущення щодо походження деяких видів роду *Aegilops*. Так, тетраплоїдний вид *Ae. crassa* є імовірно предковим для трьох гексаплоїдних видів – *Ae. glumiaristata*, *Ae. juvenalis* та *Ae. Vavilovii*, а тетраплоїдний *Ae. neglecta* – для гексаплоїдного виду *Ae. recta* (Baum et al., 2012).

Багато видів, що є представниками родів *Lophopyrum* (Löve 1980), *Thinopyrum* (Löve 1980) та *Trichopyrum* (Löve 1986) є близькими родичами пшениці, які можуть бути використані як донори ознак для її покращення. Проте, різні автори відносили їх у один, два або більше родів. Щоб уточнити це питання, було проаналізовано послідовності 5S рДНК 15 видів з цих родів. Було виділено 5 структурних класів 5S рДНК: довгий S1, довгий E1, короткий E1, короткий S1 та довгий P1. Порівняння послідовностей дає підстави вважати, що всі досліджувані види можна об'єднати в один рід під назвою *Lophopyrum* або *Thinopyrum* (Baum & Johnson, 2018).

На основі цитогенетичних та морфологічних досліджень було виділено новий рід родини Злакових – *Douglasdeweya*, який включає в себе два види: *D. deweyi* та *D. wangii* (Yen et al., 2005). Близькоспорідненими родами до нього є роди *Pseudoroegneria* та *Agropyron* (триба Triticeae). Аналіз 5S рДНК показав,

що види *Douglasdeweya* з геномом PPStSt мають два структурних класи 5S рДНК – довгий P1 (482, 484, 508 нп) та короткий S1 (447-448 нп). *Pseudoroegneria* (геном StSt або StStStSt) характеризується довгим S1(483 нп) варіантом та коротким S1 (447-449 нп) варіантом. На противагу цьому, *Agropyron* (геном PP) має тільки один структурний клас – довгий P1 (483 нп). Ймовірно, предкові види родів *Pseudoroegneria* та *Agropyron* є донорами різних типів геномів видів роду *Douglasdeweya*, який є алоплоїдом (Baum & Johnson 2008a; Baum et al., 2008b).

Рід *Dasyphyrum* (родина Poaceae) включає в себе два види: однорічний широко розповсюджений вид *D. villosum* ( $2n = 2x = 14$ ) та багаторічний рідкісний вид *D. breviaristatum* ( $2n = 2x = 14$  та  $2n = 4x = 28$ ). Цей рід є цікавим для дослідження, оскільки його представники можуть слугувати хорошим генетичним матеріалом для покращення таких культур як пшениця та рис. Походження та структура геному *D. breviaristatum* протягом років є темою для дискусій. Відомо, що геном диплоїду *D. villosum* (VV) відрізняється від диплоїдного цитотипу *D. breviaristatum* (VbVb), але немає єдиної думки щодо конституції тетраплоїдного цитотипу: не зрозуміло, чи це авто-, чи алотетраплоїд. Пролити світло на це питання вдалося завдяки аналізу послідовностей 5S рДНК. Виявилось, що цитотип *D. breviaristatum*, який містить 4 набори хромосом, є алотетраплоїдом (VVVbVb) (Baum et al., 2014).

Рід *Elymus* є одним з найбільших у трибі Triticeae. Він складається приблизно з 150 видів, які широко розповсюджені в помірних та субтропічних регіонах. Кілька видів роду (*E. dahuricus*, *E. excelsus*, *E. tangutorum*, *E. cylindricus*, *E. breviaristatus* та *E. nutans*) було раніше запропоновано віднести до окремого роду *Campeiostachys*. Тож, щоб прояснити філогенетичні відносини цих двох родів, було проаналізовано 247 нуклеотидні послідовності 5S рДНК. Було ідентифіковано кілька структурних класів: довгий H1, короткий S1 та довгий Y1. Результати порівняння послідовностей підтверджують, що досліджувані види роду *Elymus*, що містять StYH гаплом (*Elymus dahuricus*,

*E. excelsus*, *E. tangutorum*, *E. cylindricus*, *E. breviaristatus* та *E. nutans*) дійсно мають бути віднесенні до окремого роду *Campeiostrachys* (Yang et al., 2019).

У видів роду *Hordeum* (родина Poaceae) було знайдено кілька структурних класів 5S рДНК довжиною від 313 до 544 нп: загалом десять, але автори вказують, що цю кількість можна скоротити до семи. За результатами порівняння цих класів була отримана дендрограма, яка відображає філогенетичні відносини між диплоїдними, тетраплоїдними та гексаплоїдними видами цього роду (Baum & Johnson 1994, Baum et al., 2010b).

Вивчення представників триби Aveneae (родина Poaceae) показало, що у п'яти родах (*Avena*, *Helictotrichon*, *Pseudarrhenatherum*, *Lagurus*, *Trisetum*) довжина повтору 5S рДНК варіює від 285 до 329 нп, крім *Helictotrichon aetolicum*, у якого довжина цієї ділянки складає 456 нп. Варіації у решти досліджуваних видів (*Avena sativa*, *Avena macrostachya*, 26 видів *Helictotrichon*, *Pseudarrhenatherum longifolium*, *Lagurus ovatus* та *Trisetum spicatum*) значною мірою зумовлені вставками або делеціями в IGS, як було визначено з аналізу послідовностей 163 клонів. Ділянка, що кодує 5S рРНК у досліджуваних видів Aveneae є консервативною за довжиною (119-120 нп) та послідовністю. Проте, у двох видів, *Helictotrichon bromoides* та *Helictotrichon marginatum*, додатково знайдено повтори, які містять кодувальну ділянку більшого розміру, яка утворилась за рахунок дуплікації двох сегментів розміром 24 та 21 нп. Проте, автори припускають, що послідовності з дуплікаціями не обов'язково є псевдогенами, оскільки мутації не зачіпають внутрішніх елементів промотора. При філогенетичному аналізі послідовностей 5S рДНК було зроблено висновок, що великий рід *Helictotrichon* є парафілетичним. Більше того, *H. desertorum*, що за морфологічними ознаками відносять до цього роду, виявився досить віддаленим видом. *A. macrostachya* та *H. jahandiezii* на отриманій дослідниками філодендрограмі займають ізольоване положення. Цей результат добре узгоджується із тим, що ці два види є ендеміками північної Африки та зустрічаються лише в кількох локаціях (Röser et al., 2001).



Поліморфізм та успадкування 5S рДНК детально вивчався для видів роду *Avena* (родина Poaceae). На загал було ідентифіковано шість структурних класів, які отримали назви відповідно до гапломів/геномів, які їх містять: довгі класи A1, B1, M1 та короткі класи C1, D1, M1. Довгий та короткий M1 класи були виявлені у багаторічного виду *A. macrostachya*, який вважається найбільш предковим видом роду. Цікаво, що довгий M1 клас близькоспоріднений до короткого C1, в той час як короткий M1 – до довгих A1 та B1 класів. Короткий клас D1 є найбільш віддаленим від решти. Двадцять два досліджуваних види містили довгий A1 клас. Послідовності довгого B1 класу були знайдені у тетраплоїдів *A. abyssinica*, *A. vaviloviana* та диплоїдів *A. atlanica*, *A. longiglumis*. Для 4 диплоїдів, 2 тетраплоїдів та 5 гексаплоїдів характерний короткий C1 клас. Відповідно, короткий D1 клас знайдено у всіх досліджуваних гексаплоїдів (5 видів) та у двох клонах *A. clauda*. Дослідники нагадують, що, згідно попереднім уявленням, геном В вважався характерним лише для тетраплоїдних видів, а геном D – лише для гексаплоїдних. Проте, детальне дослідження гаплотипів 5S рДНК спростувало цю думку. Також висунуто гіпотезу, що диплоїдні види *Avena* можуть бути донорами не тільки геному А, але й геному D для всіх гексаплоїдних видів вівсу. (Peng et al., 2008).

При дослідженні підтриби Dactylidinae (Poaceae), що включає в себе лише два роди – *Dactylis* і *Lamarckia*, було знайдено найкоротших варіантів 5S рДНК серед представників родини Poaceae, а саме – у *Dactylis glomerata* довжина повторів становить 258 нп. При порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК *D. glomerata* та інших видів виявили подібність з віддаленими представниками Aveninae, що може свідчити про можливу міжвидову гібридизацію (Volkov & Panchuk, 2014).

Філогенетичні дослідження представників роду *Setaria* (підродина Panicodae, родина Poaceae) – *S. adhaerans*, *S. verticillata*, *S. faberii*, *S. viridis* (3 варіації), *S. italica* (2 варіації), які базувалися на аналізі послідовностей 5S рДНК, показали, що досліджувані види можна розділити на чотири групи. Довжина повтору 5S рДНК варіювала від 300 до 450 нп. Була підтверджена

спорідненість *S. italica* та *S. viridis* з однакових географічних локацій. Отримані результати підтверджують попередні гіпотези про різницю між геномами А та В та культурні центри походження *S. italica* (Китай, Європа та територія від Афганістану до Лівану). Крім того, прояснилося питання щодо таксономічного положення *S. verticillata*, який є алотетраплоїдним видом і містить в собі геноми А та В. Ймовірно донором геному А є *S. italica*, а геному В – *S. adhaerans* (Benabdelmouna et al., 2001a, 2001b). Пізніше детальніше дослідження IGS 5S рДНК *S. italica* з 35 різних місцевостей Європи та Азії дозволило виділити три типи послідовностей 5S рДНК; тип I в свою чергу був розділений на сім підтипів. Підтипи Ia та Ib широко поширені в Азії та Європі. Підтип Ic поширений в Китаї, Кореї та Японії. Підтип Id містить в собі делецію розміром 20 нп та має унікальну С-послідовність. Він характерний для Афганістану та північно-західного Пакистану і сильно відрізняється від інших підтипів типу I, що свідчить на користь гіпотези про незалежне одомашнення форм, які його несуть. Підтип Ig поширений у Пакистані. Тип II також є високо поліморфним та включає в себе чотири підтипи IIa–IId. На противагу цьому, тип III є досить мономорфним і, можливо, його варто розглядати як підтип типу II. Також варто зазначити, що підтип IIa найбільше відрізняється від усіх типів (Fukunaga et al., 2006).

Рід *Oryza* (підродина Oryzoideae, родина Poaceae) налічує 21 дикий вид та два культурних види – *O. sativa* та *O. glaberrima*. В межах роду розрізняють 10 типів геному. Філогенетичні відносини між дев'ятьма видами роду *Oryza* та спорідненість шести різних геномів досліджувалися з використанням гібридизації та сиквенування ділянки 5S рДНК. Довжина отриманих послідовностей становила від 194 до 490 нп. Було показано основні відмінності між А геномом та В, С, D геномами, які були раніше виділені на основі морфологічних та цитогенетичних досліджень. 5S рДНК *O. australiensis* (геном Е) групується з В, С, D геномами в одну кладу, в той час як послідовності *O. brachyantha* (геном F) суттєво відрізнялися та групувалися окремо від інших видів (McIntyre et al., 1992). Пізніше аналіз молекулярної та хромосомної

організації 5S рДНК диплоїдних та тетраплоїдних диких видів рису показав, що (1) в геномі досліджених видів одночасно присутні декілька різних класів 5S рДНК; (2) деякі класи 5S рДНК є спільними для різних видів; (3) у цих спільних класів спостерігається міжвидова дивергенція. У тетраплоїдних видів виявлено втрату сайтів 5S рДНК одного з предкових диплоїдів. На загал, довжина повтору 5S рДНК у досліджених видів рису варіювала від 322 до 587 нп. Було виділено п'ять різних структурних класів 5S рДНК для представників роду. Базуючись на порівнянні IGS 5S рДНК 14 диких та 1 культурного виду (*O. sativa*), було побудовано дендрограму, яка відображає філогенетичні відносини між цими видами (Zhu et. al., 2008).

Проаналізувавши літературу можна сказати, що завдяки своїй універсальній будові та наявності у геномах всіх еукаріотичних організмів, 5S рДНК — універсальна модель для вивчення еволюції повторюваних послідовностей у різних таксономічних групах. Довжина повторюваної одиниці 5S рДНК змінюється у широких межах – від 214 до 1055 нп. При цьому довжина кодувальної ділянки становить 119—120 нп у всіх досліджених видів, тоді як розміри IGS мінливі.

Еволюційні зміни IGS пов'язані з накопиченням нуклеотидних замін, вставками / делеціями (інделами) та ампліфікацією субповторів. Швидкий темп накопичення мутацій призводить до того, що різницю у послідовностях IGS можна виявити між спорідненими видами і навіть між різними популяціями одного виду. Завдяки цьому, 5S рДНК — це інформативний молекулярний маркер для оцінки генетичної мінливості та реконструкції філогенії таксонів низького рангу (рід-вид-популяція). Особливо ефективним є використання 5S рДНК для уточнення походження поліплоїдних видів.

На сьогодні молекулярна організація та еволюція 5S рДНК досліджені у кількох групах Покритонасінних рослин. Проте аналіз наявної літератури свідчить, що 5S рДНК все ще залишається недооціненою та використовується недостатньо порівняно з такими молекулярними маркерами, як ділянки пластидного геному, або ITS 35S рДНК. Виходячи з цього, у роботі було

вирішено проаналізувати молекулярну організацію, поліморфізм та еволюцію 5S рибосомної ДНК в популяціях антарктичної рослини *Deschampsia antarctica*, у інших видів цього роду та у представників триби Pooae та оцінити потенціал використання цієї ділянки геному у молекулярній таксономії.

## РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### 2.1. МАТЕРІАЛ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Збір матеріалу для досліджень проводився протягом 2016-2019 років.

У дослідженні були використані свіжі та гербаризовані рослини, зібрані у природі, або зразки рослин та ДНК, отримані від наукових установ України (табл. 2.1.1). Всі досліджувані види належать до триби Pooae.

Таблиця 2.1.1 (початок)

#### Характеристика рослинного матеріалу

Назва виду	Таксономічне положення за хлоропласт-ною групою	Код зразка	Походження отриманого матеріалу	Назва клону	№ в БД ГенБанк
<i>Trisetum flavescens</i>	Chloroplast group 1 (Aveneae type)	Trfla	околиці м. Чернівці, Україна	Trfla4	---
				Trfla6	---
<i>Briza media</i>	Chloroplast group 1 (Aveneae type)	Brmed	околиці м. Чернівці, Україна	Brmed3	---
				Brmed5	---
<i>Calamagrostis epigeios</i>	Chloroplast group 1 (Aveneae type)	Caepi	Українські Карпати	Caepi5	---
				Caepi9	---
<i>Deschampsia antarctica</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Deant	Див. табл. 2.5.1	Див. табл. 2.2.2	Див. табл. 2.2.2

Таблиця 2.1.1 (продовження)

<i>Deschampsia cespitosa</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Decea	Українські Карпати	Deces1.2	---
				Deces1.7	---
				Deces1.11	---
				Deces1.16	---
			Ісландія	Deces13**	---
				Deces14**	---
				Deces15**	---
			Аляска	Deces16**	---
				Deces18**	---
			Пенсильванія, США	Deces19**	---
Deces20**	---				
<i>Deschampsia alpina</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Dealp	Ісландія	Dealp1**	---
				Dealp2**	---
				Dealp3**	---
<i>Deschampsia laxa</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Delax	Аргентина	Delax10**	---
				Delax12**	---
<i>Vahlodea (Deschampsia) atropurpurea</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Vaatr	Аргентина	Vaatr4**	---
				Vaatr5**	---
				Vaatr6**	---
<i>Avenella (Lerchenfeldia, Deschampsia) flexuosa</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Avfle	Українські Карпати	Avfle1	MT335693
				Avfle4	MT335694
			Польща	Avfle7**	MT335695
				Avfle8**	MT335696
<i>Lolium perenne</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Loper	околиці м. Чернівці, Україна	Loper4	MT335698
				Loper7	MT335699

Таблиця 2.1.1 (продовження)

<i>Festuca carpatica</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Fecar	Українські Карпати	Fecar2	MT514528
				Fecar5	MT514529
<i>Festuca ovina</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Feovi	Польща	Feovi13	MT514530
				Feovi23	MT514531
<i>Festuca fallax</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Fefal	Українські Карпати	Fefal5	---
				Fefal9	---
<i>Phleum pratense</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Phpra	околиці м.Чернівці, Україна	Phpra 1	MT335700
				Phpra 3	MT335701
<i>Cynosurus cristatus</i>	Chloroplast group 2 (Poeae type)	Суссі	околиці м.Чернівці, Україна	Суссі10	---
<i>Poa pratensis</i>	Tribe Poeae Chloroplast group 2 (Poeae type)	Popra	Чернівецька область, Україна	Popra12	---
			База даних Генбанк	Popra_Rep1	SRX 5824432*
				Popra_Rep2	
Popra_Rep3					

Таблиця 2.1.1 (продовження)

<i>Sesleria heufleriana</i>	Tribe Poeae Chloroplast group 2 (Poeae type)	Seheu	Українські	Seheu2	---
			Карпати	Seheu3	---
<i>Dactylis glomerata</i>	Tribe Poeae Chloroplast group 2 (Poeae type)	Daglo	Українські	Daglo1.1	---
			Італія	Daglo1.2	---
				Daglo2.2	---
				Daglo2.3	---
				Daglo5.2	---
				Daglo5.3	---
				Daglo5.4	---
			Австрія	Daglo3.3	---
				Daglo3.6	---
				Daglo4.1	---
Daglo4.2	---				

Примітка. Зірочкою (\*) позначений номер повногеномного архіву *Poa pratensis*, що був використаний для аналізу; двома зірочками (\*\*) позначені клони, отримані спільно з В.М.Мельником, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України. Зразки видів роду *Festuca* було отримано від І.О. Беднарської, Інститут екології Карпат НАН України.



## 2.2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### Виділення рослинної ДНК

Для виділення ДНК використовували свіжий або гербаризований рослинний матеріал у вигляді листків. Виділення ДНК проводилось цетавлоновим методом, за Rogers із модифікаціями (Rogers 1994):

1. Наважку 1 г свіжого або 0,3-0,4 г гербаризованого рослинного матеріалу заморожували з використанням рідкого азоту, розтирали в ступці і не допускаючи розморожування, додавали підігрітий до 65°C реакційний буфер для лізису, що містив: 3% цетавлон, 100 мМ трис-НСІ (рН 8,0), 20 мМ ЕДТА, 1,4 М NaCl, 0,1% β-меркаптоетанол (співвідношення об'єму буферу до маси наважки 2:1).

2. Лізис проводили на водяній бані за 65°C протягом 1 год 30 хв.

3. До лізату додавали рівний об'єм суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1), струшували і центрифугували при 13000 g, 5 хв.

4. Відбирали верхню фазу, до супернатанту додавали 0,6 об'єму охолодженого ізопропанолу та залишали на 10 хв. при -20°C для формування осаду.

5. Осад промивали 80% етанолом, центрифугували при 13000 g протягом 10 хв., підсушували при кімнатній температурі до зникнення запаху етанолу.

6. Осад розчиняли у 50 мкл буферу TE (10 мМ трис-НСІ, 1 мМ ЕДТА).

Нативність виділених зразків оцінювали за допомогою методу електрофорезу у 1% агарозному гелі. Концентрацію ДНК в отриманих препаратах визначали на спектрофотометрі. Для подальших досліджень використовували тільки препарати ДНК, що мали співвідношення A260/A280 і A260/A230 не менше, ніж 2.

### Виділення плазмідної ДНК методом лужного лізису

1. Готували нічну культуру бактерій: 5 мл рідкого поживного середовища LB (0,1% бакто-пептон, 0,05% бакто-дріжджовий екстракт, 0,1% NaCl), що містить ампіцилін у концентрації 100 мг/л, наливали у колбу об'ємом 50 мл.
2. Під ламінаром інокулювали середовище відібраною колонією *E. coli*.
3. Протягом 14-16 годин вирощували бактерії при інтенсивній аерації на роторній качалці GFL 3015 (Німеччина) за 37°C.
4. Розливали вміст колби у стерильні центрифужні пробірки по 5 -10 мл.
5. Збирали бактеріальні клітини центрифугуванням протягом 30 хв при 3000 g.
6. Рідку фазу зливали, а осад ресуспендували у 100 мкл розчину S1 (50 мМ глюкоза, 25 мМ трис-HCl, рН 8,0, 10 мМ ЕДТА). Переносили в чисті мікропробірки.
7. Додавали 200 мкл розчину S2 (1% SDS, 0,2М NaOH) перемішували та залишали на 3 хв при кімнатній температурі.
8. Додавали 150 мкл розчину S3 (3М ацетат калію, 5М оцтова кислота, рН = 5,0), перемішували та залишали на льоду на 10 хв.
9. Центрифугували протягом 10 хв при 13000 g.
10. Обережно відбирали супернатант, добавляли 1 мл 96% етанолу і залишали у морозильній камері (- 20°C) на 30 хв або на ніч.
11. Перемішували та центрифугували 10 хв при 13000 g.
12. Обережно відбирали надосадову рідину. Осад сушили 15-20 хв при 37°C.
13. Додавали 50 мкл бідистильованої води, ресуспендували до розчинення осаду.
14. Додавали 50 мкл 5М ацетату амонію. Обережно перемішували, повертаючи мікропробірку.
15. Центрифугували 5 хв при 13000 g.
16. Відбирали супернатант у чисту пробірку. До супернатанту додавали 100 мкл суміші хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1).

17. Інтенсивно струшували, центрифугували 5 хв за 13000 g.
18. Відбирали супернатант у чисту пробірку. До супернатанту додавали 0,6 об'єму ізопропанолу, перемішували та центрифугували 10 хв при 13000 g.
19. Осад промивали, додаючи 500 мкл 80% етанолу, та центрифугували 3 хв при 13000 g.
20. Відбирали супернатант. Осад підсушували 10-15 хв при 37°C і розчиняли в 20 мкл буферу TE.

### **Електрофорез ДНК в агарозному гелі**

1. Для електрофорезу використовували 1×TBE буферну систему (трис-борат ЕДТА: 0,089 М трис, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА, рН 8.0).
2. Для аналізу геномної та плазмідної ДНК використовували агарозний гель концентрацією 1 %, для аналізу ПЛР-продуктів 1,5 %, продуктів рестрикції – 2%. Для цього до необхідної кількості агарози додавали 30 мл чи 20 мл (в залежності від приладу) 1× TBE і прогрівали в мікрохвильовій печі (3 хв за потужності 300-450 Вт) до повного розчинення агарози, перемішуючи кожного разу при закипанні.
3. Охолоджували розчин до 50-55°C. Додавали бромистий етидид в концентрації 10 мг/мл 30/20 мкл, в залежності від загального об'єму суміші (30/20 мл відповідно).
4. Зібравши форму для електрофорезу, заливали у неї розчин агарози та вставляли гребінку.
5. Після застигання агарози форму переносили в камеру для проведення електрофорезу та заливали 1× буфером TBE так, щоб гель був покритий буфером на 2-3 мм.
6. Витягували спейсери та гребінку, намагаючись не пошкодити лунки.
7. Готували проби для нанесення; для цього змішували розчинену ДНК з 1× буфером для нанесення (1×TE, 50% гліцерин, 0,25% розчин бромфенолового синього). Співвідношення об'єму проб і буферу – 5:1.
8. Наносили проби ДНК на гель у лунки під буфер.

9. Використовували ДНК-маркер GeneRuller DNA Leader Mix, SMO 3310, 1 mg DNA/ml (Fermentas, Литва).

10. Приєднували прилад для електрофорезу до блоку живлення.

11. Електрофорез проводили при напруженості поля 5 В/см<sup>2</sup>, так щоб лідуючий барвник пройшов майже до кінця гелю.

12. Після закінчення електрофорезу забарвлювали гель у 200 мл 1× буферу TBE із бромистим етидієм в концентрації 10 мг/мл.

13. Для візуалізації ДНК гель переносили на скло транслюмінатора та в ультрафіолетовому світлі розглядали і фотографували ДНК.

Квантифікацію ДНК проводили використовуючи програмне забезпечення приладу GelDoc 2000 (BioRad, США).

### Полімеразна ланцюгова реакція

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували за допомогою ПЛР. Для цього використовували дві пари праймерів, Pr5S-L-Ph (5'-GCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3') + Pr5S-R-Not (5'-CATTGCGGCCGCTTAACTTCGGAGTTCTGATGGGA-3'), або Pr5S-L-Not (5'-CAATGCGGCCGCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3') + Pr5S-R-Not, які комплементарні до консервативної ділянки, що кодує 5S рРНК у покритонасінних рослин. Праймер Pr5S-L-Ph містив на 5'-кінці фосфатну групу, що дозволяє збільшити ефективність лігування при клонуванні ПЛР-продуктів за тупим кінцем, а праймери Pr5S-L-Not та Pr5S-R-Not – додатковий сайт впізнавання рестриктази NotI, який було використано при клонуванні 5S рДНК кількох видів. Застосовані праймери забезпечують ампліфікацію повного IGS та фланкуючих ділянок кодувальної послідовності.

Для клонування та визначення вмісту різних класів 5S рДНК *D. antarctica* використовували три пари специфічних олігонуклеотидних послідовностей:

- 1) Для 1 класу: Des-5S-cds-C11-frw – 5'-CAT ACG GCC GGG GCG TTA TAT ATA TT-3' та Des-5S-cds-C11-rev – 5'-CAT AAT GCA TCG TGC CAC GTC GTC GTC-3';;

- 2) Для 2 класу: Des-5S-cds-C12-frw – 5'-GCC TTG TGG CCA TGG TAA ATA-3' та Des-5S-cds-C12-rev – 5'-ATA CGC GGC CGC AAA AAA ATA AATT-3';
- 3) Для 3 класу: Des-5S-cds-C13-frw – 5'-CAT AGC GGC CGC CAA TTC CCT CGT GTT CAT GC-3' та Des-5S-cds-C13-rev – 5'-CAT AGC GGC CGC ACA AAA GAA TAC AAC-3'.

Праймери для ПЛР створювались згідно правил молекулярного дизайну з використанням пакету програм Primer 3 Software (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) та отриманих у роботі сиквенованих послідовностей різних класів 5S рДНК *D. antarctica*.

Для проведення ампліфікації використовували полімерази Dream Taq Polymerase, (Fermentas, USA), Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), Master Mix FirePol (Solis Biodyne, Estonia). Приклад складу реакційної суміші представлений в таблиці 2.2.1.

**Таблиця 2.2.1**

**Склад реакційної суміші**

Компоненти	Об'єм (мкл)
Master Mix FirePol	4
праймер 1 (25 мкМ)	0,5
праймер 2 (25 мкМ)	0,5
розчин ДНК (0,5 - 50 нг/мкл)	1
H <sub>2</sub> O бідистильована	14
Разом	20

Примітка. Усі маніпуляції по приготуванню реакційної суміші проводили на льоду, якщо цього вимагав протокол.

ПЛР проводили з використанням ампліфікатора MiniCycler (MJ Research Inc, США) за програмою (як приклад для ДНК-полімераза Dream Taq

Polymerase, Fermentas): 1 - початкова активація ДНК-полімерази – 95°C, 2 хв; 2 - денатурація ДНК – 95°C, 45 с; 3 - гібридизація праймерів – 58°C, 40 с; 4 - синтез ДНК – 72°C, 30-60 с; 5- закінчення ампліфікації – 72°C, 8 хв; припинення реакції – 4°C; загальна кількість циклів ампліфікації з 2 по 4 крок – 35.

Залежно від завдань експерименту та використання певного полімеразного міксу температура та час гібридизації праймерів, початкова активація, час та температура елонгації могли відрізнятись.

Аналіз результатів ПЛР проводили методом електрофорезу у 1,5% агарозному гелі. При потребі ПЛР-продукти очищали як описано нижче.

### **Розщеплення ДНК ендонуклеазами рестрикції**

1. Для обробки ПЛР-продуктів або плазмідної ДНК ендонуклеазами рестрикції готували реакційну суміш наступного складу:

- Зразок ДНК – 6 мкл
- H<sub>2</sub>O (бідистильована) – 2,6 мкл
- 10x буфер для ендонуклеази рестрикції (Fermentas, Литва) – 1 мкл
- Ендонуклеаза рестрикції (10 од./мкл) – 0,4 мкл
- Загальний об'єм суміші – 10 мкл

Усі маніпуляції по приготуванню реакційних сумішей здійснювали на льоду.

2. Суміш інкубували 16 год за температури 37°C (або іншої, відповідно до рекомендованої температури та часу для окремої ендонуклеази рестрикції). Реакцію зупиняли, інкубуючи суміш 10 хв при температурі 65°C або поставивши у морозильну камеру (– 20°C).

3. Електрофоретичний аналіз зразків ДНК, розщеплених ендонуклеазами рестрикції, здійснювали у 2% агарозному гелі.

Для подальшого клонування ПЛР-продукти та ДНК векторної плазмідни після обробки рестриктазами очищали сумішшю фенолу та хлороформ-ізоамілового спирту, як описано нижче.

Таблиця 2.2.2 (початок)

Походження зразків та стратегія клонування 5S рДНК *D. antarctica*

Номер популяції та місце збору	Праймери для ПЛР	Ферменти для обробки ПЛР-продукту	Вектор для клонування	Ферменти для обробки вектора	Назва клону	№ в БД ГенБанк
A1: Мис Расмуссен S65°14.819', W64°05.156'	Pr5S-L-Ph + Pr5S-R-Not	NotI	pKS	Eco32 + Bsp120I	DeantA1.1	MN071970
					DeantA1.11	MN071971
A2: О. Галіндез S65°14.819', W64°05.156'	Pr5S-L-Ph + Pr5S-R-Not	NotI	pKS	SmaI + Eco52	DeantA2.3	MN519085
					DeantA2.5	MN519086
A3: О. Галіндез S65°14.883', W64°14.389'	Pr5S-L-Not+ Pr5S-R-Not	-	pGEM-T	-	DeantA3.2	MN519087
A4: О-ви Ялур S65°14.039', W64°09.761'	Pr5S-L-Not+ Pr5S-R-Not	-	pGEM-T	-	DeantA4.7	MN519089
					DeantA4.14	MN519090
A5: О-ви Ялур S65°14.139', W64°09.330'	Pr5S-L-Not+ Pr5S-R-Not	NotI	pKS	NotI	DeantA5.2	MN519091
A6: О-ви Берселот, S65°19.731', W64°08.613'	Pr5S-L-Not + Pr5S-R-Not	NotI + BamHI	pKS	Eco52 + BamHI	DeantA6.1	MN519092
					DeantA6.9	MN519093
A7: О-ви Берселот, S65°19.400', W64°08.640'	Pr5S-L-Not + Pr5S-R-Not	NotI	pLit38	Bsp120I	DeantA7.10	MN519094
					DeantA7.11	MN519095
					DeantA7.14	MN519096

Таблиця 2.2.2 (продовження)

<b>A8:</b> О. Пітерман S65°10.453', W64°08.452'	Pr5S-L-Ph + Pr5S-R-Not	NotI	pKS	SmaI + Bsp120I	DeantA8.5	MN071972
					DeantA8.10	MN071973
					DeantA8.14	MN519097
<b>A9:</b> О. Уругвай, S65°14.171', W64°13.557'	Pr5S-L-Ph + Pr5S-R-Not	BamHI	pKS	SmaI + BamHI	DeantA9.5	MN519098
					DeantA9.15	MN519099
					DeantA9.18	MN519100
<b>A10:</b> О. Кінг-Джордж S62°09.480', W58°27.953'	Pr5S-L-Not + Pr5S-R-Not	NotI + BamHI	pLit38	Eco52 + BamHI	DeantA10.11	MN071974
					DeantA10.13	MN519101
<b>A11:</b> О. Кінг-Джордж S62°09.765', W58°27.871'	Pr5S-L-Not + Pr5S-R-Not	NotI	pKS	Eco52	DeantA11.10	MN519102
					DeantA11.11	MN519103
<b>A13:</b> О. Кінг-Джордж S62°10.161', W58°27.893'	Pr5S-L-Ph + Pr5S-R-Not	BamHI	pLit38	Eco32 + BamHI	DeantA13.6	MN519104
					DeantA13.9	MN519105
<b>A14:</b> О. Кінг-Джордж S62°09.765', W58°27.650'	Pr5S-L-Not + Pr5S-R-Not	-	pJet1.2	-	DeantA14.9	MN519107
<b>A15:</b> о. Галіндез S65°14.849', W64°14.474'	Pr5S-L-Not + Pr5S-R-Not	NotI + BamHI	pKS	Bsp120I+ BamHI	DeantA15.1	MN519108
					DeantA15.6	MN519109
					DeantA15.18	MN519110



Таблиця 2.2.2 (закінчення)

<b>A18:</b> о. Дарбо S65°23.717', W64°12.940'	Pr5S-L-Not + Pr5S-R-Not	NotI	pLit38	NotI	DeantA18.4	MN519111
					DeantA18.10	MN519112
					DeantA18.15	MN519113
<b>A21:</b> о. Ялур S65°14.039', W64°09.760'	Pr5S-L-Not + Pr5S-R-Not	NotI + BamHI	pLit38	Bsp120I+ BamHI	DeantA21.2	MN519114
<b>K3:</b> О. Пітерман S65°09.926', W64°08,669'	Pr5S-L-Ph + Pr5S-R-Not	NotI	pKS	Eco32 + Eco52	DeantK3.1	MN519115
					DeantK3.18	MN519116
<b>K4:</b> О. Галіндез S65°14.918', W64°14.646'	Pr5S-L-Not + Pr5S-R-Not	NotI	pKS	NotI	DeantK4.2	MN519117
<b>K5:</b> О-ви Ялур S65°14.039', W64°09.760'	Pr5S-L-Not + Pr5S-R-Not	NotI	pKS	Bsp120I	DeantK5.16	MN519118
					DeantK5.17	MN519119

Примітка. Скорочення: pKS – pBluescript-KS, pLit38 - pLitmus38. Препарати ДНК *D. antarctica* було отримано від проф. В.А. Кунаха, Інститут молекулярної біології і генетики НАН України.

### Лігування ПЛР-продуктів у плазмідний вектор

Лігування ПЛР-продуктів у вектор проводили за липкими чи тупими кінцями відповідно до використаних праймерів та ендонуклеаз рестрикції.

У мікропробірці змішували векторну ДНК (50-400 нг) і ДНК вставки. Загальний об'єм суміші складав 12-13 мкл, а молярне співвідношення ДНК вектору та вставки становило від 1:1 до 1:5. Після цього додавали в наступному порядку:

10× реакційний буфер для лігування (60 мМ трис-НСl, рН=7,6; 50 мМ дитіотрейтол, 10 мМ АТФ) – 1,5 мкл

T<sub>4</sub> ДНК-лігазу (Fermentas, Литва) – 1 мкл (C = 1 од.акт./мкл).

Перемішували піпетуванням та інкубували при 22°C протягом години або при 4°C протягом ночі.

Інкубували 15 хв при температурі 65°C для інактивації лігази.

Очистку продуктів лігування проводили за схемою описаною нижче.

Для того, щоб уникнути можливої взаємної контамінації, при клонуванні 5S рДНК одного виду для кожного із досліджуваних зразків використовували індивідуальну стратегію. У частині експериментів для клонування було використано рестриктазу BamHI, сайт впізнавання якої присутній у консервативній 5S рРНК кодувальній ділянці безпосередньо перед місцем гібридизації праймера Pr5S-R-Not.

### Клонування ПЛР-продуктів за допомогою комерційних наборів

У частині експериментів використовувалися дві системи для клонування: Cloning Jet (Thermo Fisher Scientific, USA) та pGEM®-T Easy Vector System (Promega Corporation, USA).

**Клонування ПЛР-продуктів з використанням Cloning Jet.** Система передбачає лігування за тупими кінцями. Вектор, що використовується у цій системі клонування – pJet 1.2. Суміш для лігування загальним об'ємом 10 мкл включала в себе:

ПЛР- продукт – 0,5-1 мкл.

2× реакційний буфер – 5 мкл.

Фермент для утворення тупих кінців – 0,5 мкл.

Бідистильованою водою доводили до об'єм до 9 мкл.

Інкубували 10 хв. при 70°C. Додавали 0,5 мкл. T<sub>4</sub> ДНК лігази та 0,5 мкл вектора. Інкубували 1 год. при 22 °C. Після цього обробляли лігазну суміш один раз сумішшю хлороформ-ізоамілового спирту (24:1). Далі проводили трансформацію.

В цій системі використовується метод скринінгу колоній по летальному гену. Інтактна плазміда pJet1.2 містить ген, що є летальним для *E. coli*. Після проведення лігування цей ген пошкоджуються. Тому після трансформації виростають лише ті колонії, плазміди яких містять вставку. В подальшому отримані рекомбінантні плазміди перевірялися на наявність вставки за допомогою ПЛР.

З використанням цього набору клоновано зразки *Calamagrostis epigeios*, *Trisetum flavescens*, *Festuca carpatica*, *F. fallax*, *F. ovina*, *Poa pratensis*, *Sesleria heufleriana*, *Dactylis glomerata*.

**Клонування ПЛР-продуктів з використанням pGEM®-T Easy Vector System.** Система передбачає лігування за липкими кінцями. Вектор, що використовується у цій системі клонування – pGEM, містить на обох 3'-кінцях неспарений тимідин, що зменшує імовірність лігування вектору «сам на себе», а також забезпечує лігування з ПЛР-продуктами, утвореними певними термостабільними полімеразами, у яких є «звисяючий» кінець після ПЛР реакції. Суміш для лігування загальним об'ємом 10 мкл включала в себе:

ПЛР- продукт – 0,5-1 мкл.

Вектор pGEM – 1 мкл.

2× реакційний буфер – 5 мкл

T<sub>4</sub> ДНК лігаза – 1 мкл

Бідистильована вода – 1,5-2 мкл

Перемішували піпетуванням та інкубували при 22°C протягом години або при 4°C ніч. Інкубували 15 хв при температурі 65°C для інактивації лігази.

Очистку продуктів лігування проводили аналогічно до очистки ПЛР продуктів. Проводили трансформацію та селекцію колоній. В подальшому колонії перевірялися на наявність вставки виділенням плДНК та проведенням ПЛР за стандартною методикою.

З використанням цього набору клоновано зразки *Briza media*, *Deschampsia cespitosa*, *Avenella flexuosa*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Cynosurus cristatus*, *Dactylis glomerata*.

### **Очистка зразків ДНК**

До розчину ДНК (ПЛР-продукти, рестриктні фрагменти, лігазна суміш) додавали рівний об'єм суміші хлороформ-ізоамілового спирту (24:1), інтенсивно перемішували та центрифугували 5 хв 13000 g.

Відбирали супернатант у чисту мікропробірку.

Повторювали очистку сумішшю хлороформ-ізоамілового спирту (24:1). Додавали 1/10 об'єму 5М NaCl.

Додавали 0,6 об'єму ізопропанолу, або 2 об'єми 96% етанолу, залишали суміш на 20-30 хв. при  $t = -20^{\circ}\text{C}$  або на ніч і центрифугували 10 хв. 13000 g.

Відбирали супернатант. Осад промивали 100 мкл 80% етанолом, центрифугували 2 хв при 13000 g.

Підсушували осад 20-25 хв при  $t = 37^{\circ}\text{C}$ .

Осад розчиняли в 10-12 мкл TE або 10 мМ трис-HCl, pH=8,0.

Примітка. При переосадженні ДНК після проведення лігазної реакції та для очистки ПЛР-продуктів при підготовці до сиквенування не додавали 1/10 об'єму 5М NaCl, а отриманий осад розчиняли у 8-10 мкл бідистильованої  $\text{H}_2\text{O}$ .

### Отримання електрокомпетентних клітин *E. coli*

Для введення продуктів лігування в клітини *E. coli* застосовували метод електропорації. Перед проведенням електропорації готували культуру компетентних клітин *E. coli* (лінія XL-blue).

1. 200 мл середовища LB (0,1% бакто–пептон, 0,05% бакто–дріжджовий екстракт, 0,1% NaCl) інокулювали 5 мл нічної культури *E.coli* XL-blue. Нарощування бактерій проводили за 37°C на шейкері GFL 3015 при 120-150 об/хв у 1 л колбі протягом 3-4 год.

2. Після того, як оптична густина культури при  $\lambda$  - 600 нм досягала 0,5–1, клітини збирали центрифугуванням при 10000 g протягом 15 хв за 4°C.

3. Осад клітин ресуспендували у 10% стерильного розчину гліцерину при 4 °C та знову збирали центрифугуванням. Бактеріальний осад ще двічі промивали 10% гліцерином, поступово зменшуючи об'єм. Остаточний осад бактерій ресуспендували у 1 мл 10% стерильного гліцерину.

4. Суспензію клітин розливали на порції по 50 мкл, заморожували у рідкому азоті та зберігали при – 70°C.

### Трансформація *E. coli* методом електропорації та скринінг клонів

1. Заморожені компетентні клітини розморожували при кімнатній температурі, переносили на лід і додавали 10 мкл розчину ДНК (~2 нг).

2. Пробу перемішували, піпетуванням переносили в охолоджену кювету для електропорації і одразу проводили трансформацію з використанням приладу *E. coli* Pulser (BioRad, США).

Електропорація проводилась за таких умов:

- а) напруга  $U=2,5$  кВ;
- б) напруженість електричного поля 12,5 кВ/см;
- в) тривалість імпульсу 3,2-3,8 мс.

3. Після електропорації до бактеріальної суспензії додавали 500 мкл середовища LB, ресуспендували клітини та інкубували при 37°C 45-50 хв.

4. Трансформанти висівали на агаризоване середовище LB з додаванням ампіциліну (100 мг/л). Для проведення селекції чашку Петрі з агаризованим середовищем додатково натирали хромогенним субстратом X-Gal та допоміжною речовиною IPTG.

Ефективність клонування оцінювали шляхом підрахунку кількості колоній методом “blue-white colony selection”. Принцип методу полягає в наступному: на агаризованому середовищі з ампіциліном проростають тільки колонії трансформованих бактерій, оскільки використані як вектори плазміди містять ген стійкості до ампіциліну. Трансформовані бактерії, плазміди яких не несуть вставки, містять активний ген, що кодує Z-фрагмент  $\beta$ -галактозидази. Остання розщеплює хромогенний субстрат X-Gal, внаслідок чого колонії зафарбовуються у синій колір. У трансформованих бактерій, плазміди яких містять вставку, порушується цілісність ділянки ДНК, яка кодує Z-фрагмент  $\beta$ -галактозидази. Такі бактерії не здатні синтезувати активний фермент і розщеплювати X-Gal, тому їх колонії мають біле забарвлення.

Виділення плазмідної ДНК здійснювалось методом лужного лізису, що описаний вище. Для контролю наявності бажаної вставки в плазміді проводили її розщеплення відповідними ендонуклеазами рестрикції, отримані продукти розщеплення аналізували в 2% агарозному гелі. Потім для остаточного підтвердження наявності інсерту, проводили застосовуючи ПЛР із стандартними праймерами M13/pUC forward (For) та reverse (Rev), сайти гібридизації яких знаходяться в плазмідній ДНК з двох боків від полілінкеру. За результатами скринінгу відбирали рекомбінантні плазміди для сиквенування.

### **Сиквенування і аналіз сиквенсів**

Первинну обробку та аналіз отриманої первинної нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та

пакетів програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR (DNASTAR, 1998) та Geneious Prime v 2019-2021 (Kearse et al., 2012).

Пошук послідовностей у Genbank здійснювали за допомогою програми BLAST (Altschul et al., 1997).

Для побудови дендрограм застосовували програму Geneious Prime v 2019-2021 (Kearse et al., 2012). Алгоритм, використаний при побудові філодендрограм - максимальної правдоподібності з використанням моделі заміщення Джукса – Кантора.

### **Аналіз повногеномних архівів**

Для аналізу повногеномних архівів використовували наступні етапи:

1. Пошук в базі даних «Sequence Read Archive (SRA)», який є частиною платформи Генбанку, сиквенованих геномів методом сиквенування Ілюміна.
2. Ідентифікація послідовності 5S рДНК у конкретному експерименті міжнародної бази даних SRA.
3. Аналіз повногеномного архіву за допомогою програми SeqMan NGen 14.
4. Первинна обробка отриманих нуклеотидних послідовностей за допомогою комп'ютерних програм DNASTAR.

## РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### 3.1. ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК

#### *DESCHAMPSIA ANTARCTICA*

Як згадувалося у першому розділі, щучка антарктична, *Deschampsia antarctica* E. Desv. (родина Poaceae) – один із двох видів покритонасінних рослин, що ростуть у екстремальних умовах Антарктики. Загалом ареал виду охоплює території Південної Америки, Західної Антарктики та деяких островів Південного та Індійського океанів. Проте, єдиних поглядів на розповсюдження цього виду в минулому і шляхів формування його теперішнього ареалу і досі не існує. Висунуто щонайменше дві основні гіпотези щодо заселення Антарктики цим видом. Перша гіпотеза передбачає міграцію виду до Антарктики з території Південної Америки під час Голоцену. Друга гіпотеза стверджує, що йому вдалося пережити льодовиковий період в Антарктиці і після відступу льодовиків поширитися і утворити чисельні популяції на узбережжі північно-західної частини Антарктичного півострова та прилеглих островів (Mosyakin et al., 2007; Parnikoza et al., 2007; Fasanella et al., 2017). Отже, питання про історію поширення виду в Антарктиці після останнього зледеніння залишається відкритим.

Завдяки своєму фрагментованому ареалу, *D. antarctica* являє собою унікальну модель для вивчення взаємозв'язку між генетичним поліморфізмом та такими факторами як ізоляція, міграція та адаптація до нових екологічних умов. Для оцінки генетичної мінливості *D. antarctica* раніше використовували ряд молекулярно-генетичних маркерів. Так, AFLP-маркери було застосовано для прояснення питання, чи фенотипова мінливість у популяціях *D. antarctica* визначається спадковими факторами, або ж залежить від впливу довкілля (Chwedorzewska et al., 2004). Також



молекулярні методи було використано для з'ясування часу і шляхів поширення цього виду у Антарктиці (Wouw et al., 2008). Зокрема, з використанням RAPD-маркерів було показано диференціацію досліджених популяцій на молекулярному рівні, обмеження в обміні генетичною інформацією між ними та існування географічного градієнту генетичного поліморфізму *D. antarctica* в Прибережній Антарктиці зі зниженням цього показника в напрямі з півночі на південь (Andreev et al., 2010, 2012). Також при аналізі послідовності 35S рДНК в антарктичних популяціях було виявлено кілька варіантів спейсерної ділянки ITS1-2, які відрізняються специфічними мутаціями від рослин, що зростають за межами Антарктики (Volkov et al., 2010; Andreev et al., 2012).

Пізніше, з використанням молекулярної цитогенетики та шляхом порівняння некодувальних ділянок хлоропластної ДНК та ITS1-2 35S рДНК було встановлено, що популяції *D. antarctica* з Патагонії демонструють більшу мінливість хромосомних і молекулярних ознак порівняно з антарктичними популяціями (González et al., 2016; Fasanella et al., 2017). Ці дані добре узгоджуються з гіпотезою про Південноамериканське походження *D. antarctica*. Також було встановлено, що колонізація Антарктики цим видом супроводжувалась змінами у хромосомній організації повторюваних послідовностей (González et al., 2016).

Отже, на сьогодні для дослідження генетичної мінливості *D. antarctica* було застосовано цілий ряд молекулярних методів. Проте, багато питань все ще залишаються дискусійними. Для подальшого прогресу видається необхідним використання додаткових молекулярних маркерів.

### **3.1.1. Молекулярна організація міжгенного спейсера (IGS) 5S рДНК.**

Як не дивно, для видів роду *Deschampsia* досі недослідженою залишається молекулярна організація та еволюція 5S рДНК, хоча порівняльне вивчення цієї ділянки геному було раніше з успіхом використано при вивченні молекулярної еволюції і таксономії як для злаків так і для інших груп покритонасінних рослин (див. розділ 1).

Відповідно, ми поставили перед собою задачу оцінити можливість використання 5S рДНК для диференціації 19 популяцій *D. antarctica* (табл. 2.2.2). З отриманого матеріалу було виділено ДНК, ампліфіковано та клоновано повторювані ділянки 5S рДНК. Для того, щоб уникнути можливої взаємної контамінації, при клонуванні 5S рДНК для кожного із досліджуваних зразків була використана індивідуальна стратегія (табл. 2.2.2).

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації 5S рДНК показало, що для всіх досліджених популяцій *D. antarctica* утворюється лише один ПЛР-продукт довжиною близько 350 нп. Подібна довжина характерна і для інших представників родини Poaceae (Ishchenko et al., 2018a; Ishchenko & Panchuk, 2018b; Volkov & Panchuk, 2014).

Загалом було просиквеновано 38 клонів. Отримані послідовності задепоновано у базі даних Genbank під номерами, які наведені у табл. 2.2.2

Аналіз отриманих послідовностей виявив, що сиквеновані клони містять IGS 5S рДНК, які з обох боків фланковані фрагментами кодувальної послідовності, зокрема – використаними для ПЛР праймерами. Також було встановлено, що у переважної більшості клонів довжина IGS лежить у межах від 197 до 213 нп, а вміст GC-пар коливається від 50,47 до 56,7 7%. Проте, у шести клонах, DeantA3.2, DeantA5.2, DeantA7.11, DeantA9.15, DeantA13.9 та DeantK5.17, IGS виявився значно коротшим – від 95 до 204 нп (табл. 3.1.1.). Раніше було показано, що у представників родів *Avena*, *Dactylis*, *Helictotrichon*, *Lagurus*, *Pseudarrhenatherum* та *Trisetum*, які як і *Deschampsia*, належать до триби Poeae (Soreng et al., 2015), розмір IGS знаходиться у межах від 88 до 329 нп (Peng et al., 2008; Röser et al., 2001; Volkov & Panchuk, 2014).

Отримані послідовності *D. antarctica* порівняли між собою та зі взятими з Генбанку послідовностями IGS двох близькоспоріднених видів, *Helictotrichon convolutum* (C. Presl) Henrard та *Trisetum spicatum* (L.) K. Richt. (рис. 3.1.1). Було встановлено, що зменшена довжина шести «коротких» клонів є наслідком делеції значної частини повтору 5S рДНК, від 17 до 99 нп.

При цьому, у п'яти з цих клонів (за виключенням DeantA7.11) втрачено не тільки частину IGS, але й суміжний фрагмент кодувальної ділянки.

**Таблиця 3.1.1 (початок)**

**Характеристика IGS 5S рДНК *D. antarctica***

<b>Клон</b>	<b>Довжина IGS, пн</b>	<b>Відсоток GC-пар IGS, %</b>	<b>Структурний клас/підклас 5S рДНК</b>
DeantA1.11	204	53,43	1A
DeantA2.5	204	54,41	
DeantA6.1	204	54,41	
DeantA6.9	204	55,39	
DeantA7.10	204	54,41	
DeantA7.14	204	54,41	
DeantA8.10	204	54,90	
DeantA11.11	204	54,90	
DeantA15.6	204	54,90	
DeantK3.18	204	55,88	
DeantA8.5	197	54,31	1B
DeantA10.11	203	54,19	
DeantA15.18	203	52,71	
DeantA21.2	203	55,17	
DeantK3.1	203	54,68	
DeantA3.2*	192	56,77	1C
DeantA4.7	204	56,37	
DeantA15.1	204	54,90	
DeantK4.2	205	56,10	
DeantA1.1	199	55,28	2
DeantA4.14	199	53,27	
DeantA7.11*	172	52,91	
DeantA9.5	198	54,55	
DeantA13.9*	132	53,03	
DeantA14.9	199	54,77	

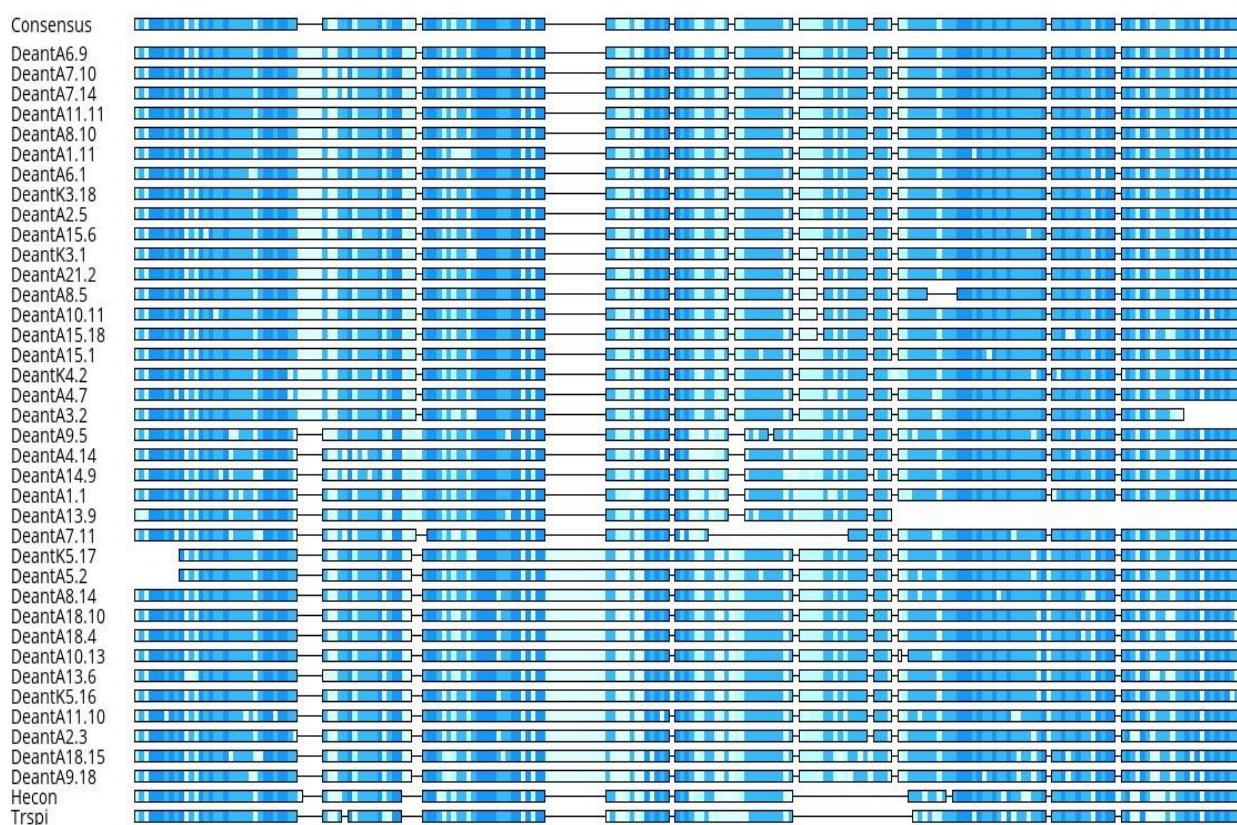
Таблиця 3.1.1 (закінчення)

DeantA2.3	212	53,30	3
DeantA5.2*	203	54,68	
DeantA8.14	212	54,25	
DeantA9.18	212	52,83	
DeantA10.13	211	53,55	
DeantA11.10	212	55,19	
DeantA13.6	213	53,99	
DeantA18.4	212	53,77	
DeantA18.10	212	53,77	
DeantA18.15	212	50,47	
DeantK5.16	213	53,99	
DeantK5.17*	204	54,41	
DeantA9.15*	95	48,42	

Примітка. Знаком \* позначені клони, у яких відбулась делеція частини 5S рДНК.

Крім того, клон DeantA9.15 відрізняється від усіх решта значною кількістю замін нуклеотидів. Всі ці структурні особливості свідчать, що цей клон являє собою суттєво змінений функціонально неповноцінний псевдоген. У подальшому, послідовність клону DeantA9.15 при порівнянні не використовувалась.

Порівняння отриманих нами послідовностей показало, що деякі сиквеновані повтори 5S рДНК суттєво відрізняються між собою: мінімальний рівень подібності IGS становить лише 60,6%. Це дало підстави вважати, що у геномі *D. antarctica* можуть бути присутні кілька структурних класів 5S рДНК.



**Рис. 3.1.1** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК популяцій виду *D. antarctica* та видів *H. convolutum* та *T. spicatum*. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 3.1.1. Градацією відтінків блакитного показано рівень гомології між окремими ділянками:  – менше 60%,  – від 60 до 80%,  – від 80 до 100%,  – 100%.

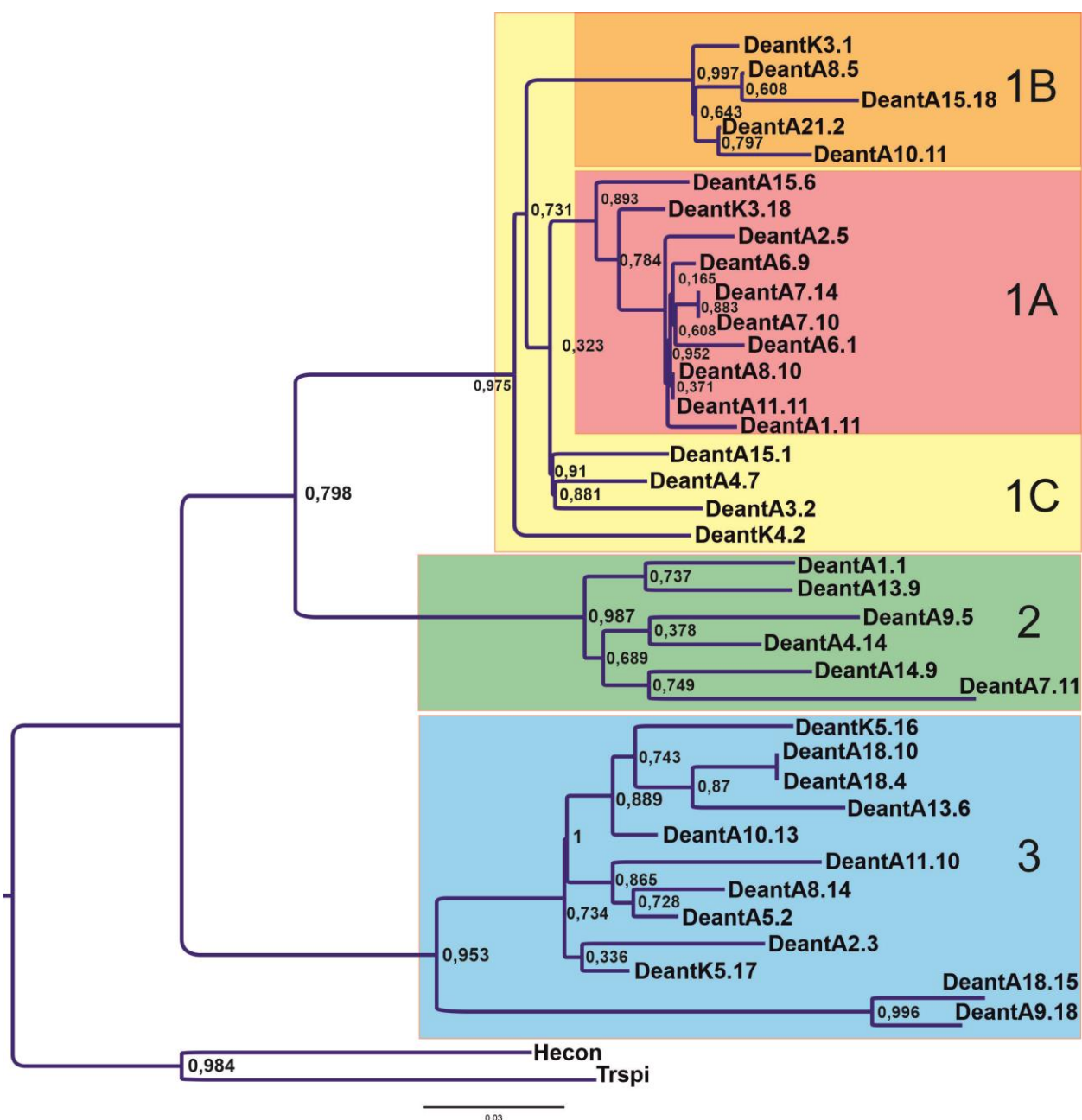
Спираючись на порівняння послідовностей IGS, ми побудували ML-дендрограму, яка відображає подібність між ними. Як зовнішню групу було використано *H. convolutum* та *T. spicatum* (рис. 3.1.2). На цій дендрограмі клони 5S рДНК *D. antarctica* утворюють три основні клади з високою статистичною підтримкою, що вказує на існування у геномі цього виду як мінімум трьох структурних класів 5S рДНК (рис. 3.1.3 – 3.1.5; табл. 3.1.2-3.1.4). Більше того, за наявності специфічних мутацій та рівнем подібності IGS повтори 5S рДНК класу 1 можуть бути розділені на три підкласи – 1А, 1В та 1С, які формують на дендрограмі три підгрупи, з яких дві, 1А та 1В, мають високу статистичну підтримку (рис. 3.1.2).

Один з клонів першого класу, DeantK4.2, займає на дендрограмі ізольоване положення і видається сестринським до решта клонів класу 1. Проте, таке розташування клону DeantK4.2 не має високої статистичної підтримки. Враховуючи, що цей клон найбільш подібний до клонів підкласу 1C (табл.3.1.2; рис. 3.1.3 ), ми включили його до цього підкласу.

Рівень подібності послідовностей IGS в межах класу 1 коливається від 88,3 до 100% (табл. 3.1.2). При цьому, в межах кожного з підкласів 1A, 1B та 1C подібність IGS виявилась вищою: 95,1-100 %, 93,6-98,5 % та 92,7-95,6%, відповідно.

В межах класів 2 і 3 подібність IGS становить 89,9-93% та 82,2-100%, відповідно (табл. 3.1.3, 3.1.4). Отже, в межах одного структурного класу 5S рДНК рівень подібності IGS не менший, ніж 82,2%. В той же час, між класами рівень подібності є значно меншим та коливається від 67,0 до 82,5% (табл. 3.1.5). Подібність послідовностей IGS 5S рДНК *D. antarctica* та найближчих родичів з інших родів, *H. convolutum* та *T. spicatum*, складає від 61,8 до 70,2%.

У попередніх дослідженнях 5S рДНК кількох родів злаків було встановлено, що у представників триби Triticeae у геномі присутні як мінімум два класи повторів (Baum & Bailey, 2004; Peng et al., 2008). В межах триби Pooae у видів родів *Avena* та *Dactylis* було знайдено лише по одному класу повторів (Peng et al., 2008 Volkov & Panchuk, 2014). Водночас, деякі види *Helictotrichon* (напр., широко розповсюджений диплоїдний вид *H. bromoides*) мають по декілька варіантів повторів, які, імовірно, належать до різних хромосомних кластерів 5S рДНК (Röser et al., 2001). У *D. antarctica* кластери 5S рДНК розташовані на п'ятьох парах хромосом (Amosova et al., 2017). Відповідно, можна припустити, що структурні класи/підкласи 5S рДНК можуть мати різну хромосомну локалізацію.



**Рис. 3.1.2** Філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК популяцій *D. antarctica* та видів *H. convolutum* та *T. spicatum* методом максимальної правдоподібності з використанням моделі заміщення Джукса – Кантора. Цифри біля вузлів відповідають статистичній підтримці тесту Шимодайра-Хасегави, який розрахований в частках одиниці.

У IGS 5S рДНК модельного виду *Arabidopsis thaliana* було знайдено елементи зовнішнього промотора РНК-полімерази III, до яких належать ТАТАТА-подібний мотив, динуклеотид GC та нуклеотид С, розташовані, відповідно, на відстані -28, -13 та -1 нп перед початком кодувальної ділянки (Douet & Tourmente, 2007). Подібні мотиви знайдено також у IGS 5S рДНК інших дводольних (Tynkevich & Volkov, 2014a, 2014b; Tynkevich et al., 2015; Rusak et al., 2016; Volkov et al., 2017). Порівняльний аналіз послідовностей IGS *D. antarctica* та споріднених злаків показав, що у згаданих позиціях у цих видів також присутні консервативні мотиви, проте вони відрізняються від таких у дводольних рослин (Ishchenko et al., 2018a, 2018b, 2018c, 2020a, 2020b). Так, у злаків у позиції -29 нп знаходиться мотив АТААGG. Динуклеотид GC присутній двічі у позиціях -16 нп та -12 нп у більшості клонів 1 та 2 класів 5S рДНК *D. antarctica*. Винятками є клон DeantA15.18, у якого у позиції -12 присутній динуклеотид GC, а в позиції -16 – GT, та клон A13.9, в якому ця частина IGS взагалі втрачена внаслідок делеції.

У більшості IGS-клонів класу 3 у позиції -12 знайдено динуклеотид GC, а у -16 нп – GT. Проте, у клоні DeantK5.16 динуклеотид GC присутній двічі, а у для клонів DeantA13. 6, DeantA18.4 та DeantA18.10 у позиції -16 знайдено динуклеотид AT. Консервативний нуклеотид С присутній в позиції -1 нп у всіх порівняних клонів, окрім тих, що зазнали делеції на 3'-кінці IGS.

На самому початку IGS у *D. antarctica* знаходиться Т-багатий мотив НСНТТТТТGC, який, імовірно, залучений до термінації транскрипції 5S рДНК. Для кожного з класів характерна своя Т-багата консенсусна послідовність: клас 1 – ТСНТТТТТGC, клас 2 – ТСТТТТТТGC, клас 3 – СССТТТТТGC. Крім того, в межах класу 1 ця послідовність також дещо відрізняється у різних підкласах.

Аналіз центральної частини консенсусної послідовності IGS показав, що у класів 1 і 2 тут присутні два короткі субповтори GGTCATGGTAAAT, які, імовірно, виникли внаслідок тандемної дуплікації. В подальшому у цих субповторах відбувались індивідуальні нуклеотидні заміни.



	10	20	30	40	50	60
<b>Consensus</b>	<b>TCATTTTTGC</b>	<b>TTTACGCGAC</b>	<b>GACGACGTGG</b>	<b>CACGATCGGG</b>	<b>CCGGGGCGTT</b>	<b>ATATATATTT</b>
DeantA6.9	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA7.10	.....	.....	.....	.....	.A.....	.....
DeantA7.14	.....	.....	.....	.....	.A.....	.....
DeantA11.11	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA8.10	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA1.11	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA6.1	.....	.....	.T.....	.....	.....	.....
DeantK3.18	..C.....	..C.....	.....	..C.....	.....	.....
DeantA2.5	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA15.6	..C.....	..C.T....	.....	.....	..C.....	.....
DeantK3.1	..C.....	..C.....	.....	.....	.....	.....
DeantA21.2	..C.....	..C.....	.....	.....	..A.....	.....
DeantA8.5	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA10.11	..C.....	..C..T...	.....	.....	..A.A...	.....
DeantA15.18	.....	.....	.....	.....	..A.....	.....
DeantA15.1	..C.....	.....	.....	..A.....	..A.....	.....
DeantA4.7	..C.....T.	..C.....	.....	..T.....	.....	.....
DeantA3.2	..C.....	..C.....	.....	.....	.....	.....
DeantK4.2	..T.....	..C.....	..G.....	..C.....	.....	..A.....

	70	80	90	100	110	120
<b>Consensus</b>	<b>TTTTTCGACCC</b>	<b>CTCGTGCGCG</b>	<b>CCTTGTGGGC</b>	<b>ATGGTAAAAT</b>	<b>GGGTGGTCAT</b>	<b>GGTAAATTGG</b>
DeantA6.9	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA7.10	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA7.14	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA11.11	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA8.10	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA1.11	...TT.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA6.1	.....	.....	.....	..T.....	.....	.....
DeantK3.18	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA2.5	.....	.....	.....	..T.....	.....	.....
DeantA15.6	...G.....	.....	..A.....	.....	.....	.....
DeantK3.1	...G..GT..	.....	.....	..T.....	.....	.....CA
DeantA21.2	...G..G...	.....	.....	.....	.....	.....CA
DeantA8.5	...G..G...	.....	.....	.....	.....	.....CA
DeantA10.11	...G..G...	.....	.....	..T.....	.....	.....CA
DeantA15.18	...G.....	.....	.....	.....	.....	.....CA
DeantA15.1	...G.....	.....	.....	.....	.....	..T...G...
DeantA4.7	...G.....	.....	.....	.....	.....	.....G...
DeantA3.2	...GT..G..	.....	.....	.....	.....	.....G...
DeantK4.2	...G..G...	.....	.....	.....	..A.....	.....G...

Рис. 3.1.3 (початок)

	130	140	150	160	170	180
<b>Consensus</b>	<b>GGTGGCCATG</b>	<b>GTA AAT-AGG</b>	<b>GGCGCGTAGG</b>	<b>CACGAGAAGG</b>	<b>AGCCGGAGGG</b>	<b>GCAAGGATAA</b>
DeantA6.9	.....	.....-T.	.....	.....	.....	.....
DeantA7.10	.....	.....-T.	.....	.....	.....	.....
DeantA7.14	.....	.....-T.	.....	.....	.....	.....
DeantA11.11	.....	.....-T.	.....	.....	.....	.....
DeantA8.10	.....	.....-T.	.....	.....	.....	.....
DeantA1.11	.....	.....-T.	.....	..T.....	.....	.....
DeantA6.1	.....	.....-T.	.....	.....	.....	.....C..
DeantK3.18	.....A.....	.....-T.	.....	.....	.....	.....
DeantA2.5	.T.....	.....-	.....	.....	.....	.....
DeantA15.6	.....	.....-T.	.....	.....	...T.....	.....
DeantK3.1	TA-..T.T..	.....-	.....	.....	.....	.....
DeantA21.2	TA-..T.T..	.....-	.....	.....	.....	.....
DeantA8.5	TA-..T.T..	.....-	.....	-----	.....	.....
DeantA10.11	TA-..T.T..	.....-	.....	.....	.....	.....
DeantA15.18	TA-..T.T..	.....-	.....	.....	.....	..TG.....
DeantA15.1	.....	.....-	.....	.....T.....	.....	.....
DeantA4.7	.....T.....	.....-	.....G.....	.....	.....	.....
DeantA3.2	.....T.....	.....-	.....T.....	.....	.....	.....
DeantK4.2	.....	.....A.....	.....	.....	.....A...A.	.....
	190	200				
<b>Consensus</b>	<b>GGCCAACTCG</b>	<b>CGTG CACAAC</b>	<b>ATGTC</b>			
DeantA6.9	.....	.....	.....G.....			
DeantA7.10	.....	.....	.....			
DeantA7.14	.....	.....	.....			
DeantA11.11	.....	.....	.....			
DeantA8.10	.....	.....	.....			
DeantA1.11	.....	.....	.....			
DeantA6.1	.....	.....	.....			
DeantK3.18	.....	.....	.....			
DeantA2.5	.....	.....	.....			
DeantA15.6	.....	.....	.....			
DeantK3.1	.....	.....	.....			
DeantA21.2	.....	.....	.....			
DeantA8.5	.....	.....	.....			
DeantA10.11	.....	.....	.....G.....			
DeantA15.18	.....	.....T.....	.....			
DeantA15.1	.....	.....	.....			
DeantA4.7	.....	.....	.....			
DeantA3.2	.....	.....AC-----	-----			
DeantK4.2	T.....	.....	.....			

**Рис. 3.1.3 (закінчення)** Вирівнювання послідовностей IGS структурного класу 1 5S рДНК *Deschampsia antarctica*. Характеристики використаних для порівняння клонів наведені у табл. 1 та 2. Кольорами виділені субкласи 1 класу: червоним-1А, помаранчевим-1В, жовтим-1С. Сірим кольором виділені елементи промотора РНК-полімерази III.

Таблица 3.1.2

Рівень подібності (%) IGS структурного класу 1 5S рДНК *D. antarctica*

Клон	DeantA6.9	DeantA7.10	DeantA7.14	DeantA11.11	DeantA8.10	DeantA1.11	DeantA6.1	DeantK3.18	DeantA2.5	DeantA15.6	DeantK3.1	DeantA21.2	DeantA8.5	DeantA10.11	DeantA15.18	DeantA15.1	DeantK4.2	DeantA4.7	DeantA3.2*
DeantA6.9	100	99.0	99.0	99.5	99.5	98.0	98.0	97.5	98.0	96.1	92.6	93.1	91.7	91.2	93.1	95.6	92.7	95.1	94.3
DeantA7.10		100	100	99.5	99.5	98.0	98.0	97.5	98.0	96.1	92.6	93.1	91.7	91.2	93.1	95.6	92.7	95.1	93.8
DeantA7.14			100	99.5	99.5	98.0	98.0	97.5	98.0	96.1	92.6	93.1	91.7	91.2	93.1	95.6	92.7	95.1	93.8
DeantA11.11				100	100	98.5	98.5	98.0	98.5	96.6	93.1	93.6	92.2	91.7	93.6	96.1	93.2	95.6	94.3
DeantA8.10					100	98.5	98.5	98.0	98.5	96.6	93.1	93.6	92.2	91.7	93.6	96.1	93.2	95.6	94.3
DeantA1.11						100	97.1	96.6	97.1	95.1	91.7	92.2	90.7	90.2	92.2	94.6	91.7	94.1	93.8
DeantA6.1							100	96.6	97.1	95.1	91.7	92.2	90.7	90.2	92.2	94.6	91.7	94.1	92.7
DeantK3.18								100	96.6	96.6	93.6	94.1	90.7	92.2	92.2	95.1	92.7	95.6	94.3
DeantA2.5									100	95.1	94.1	93.6	92.2	92.6	93.6	95.6	92.7	95.1	93.8
DeantA15.6										100	92.6	93.1	89.7	91.2	90.2	94.6	92.2	95.1	93.8
DeantK3.1											100	98.5	95.1	97.5	95.6	92.2	90.7	92.6	92.7
DeantA21.2												100	95.6	98.0	97.0	92.6	91.2	93.1	92.7
DeantA8.5													100	93.6	94.6	90.2	88.3	90.2	89.6
DeantA10.11														100	95.1	90.7	89.3	91.2	91.1
DeantA15.18															100	90.7	88.8	90.2	89.6
DeantA15.1																100	92.7	95.6	94.3
DeantK4.2																	100	93.7	91.7
DeantA4.7																		100	95.3
DeantA3.2*																			100

Примітка. Знаком \* позначені клони, у яких відбулась делеція частини 5S рДНК.

```

          10          20          30          40          50          60
Consensus  TCTTTTTTTCGTCACGCGAGGACGGCGTGGCAGGCTCRGAGCGTTAAATTTATTTTTTTG
DeantA9.5  .....A.....T..G.....
DeantA4.14 .....A.....A..A.....
DeantA14.9 .....A.....T.....A...A.....A.....
DeantA1.1  .....G.....G.....A.....
DeantA13.9 .T.....G.....A.....
DeantA7.11 .....T.A.....T...AT.....A.....C.--.....C

          70          80          90          100         110         120
Consensus  CGGCCCCCTCGTGCCCCGCCTTGTGGCCATGGTAAATAGGATGGGTGGTAAAGTGGGGGTGG
DeantA9.5  .....C.....T.....C..-.....
DeantA4.14 .....A.....TT.....
DeantA14.9 .....C...T...
DeantA1.1  .....A.....T.....T
DeantA13.9 .....C.....A.....
DeantA7.11 T..A.....C.....-

          130         140         150         160         170         180
Consensus  CCATGGTAAATAGGGGCGCGTAGGCACGAGAAGGAGCCGGAGGGGCAAGCATAAGGCCAA
DeantA9.5  ...A.....C.....T.....A.....T..
DeantA4.14 .....A.....
DeantA14.9 .....G.....
DeantA1.1  .....C..C...A.....T.....
DeantA13.9 T.....C-----
DeantA7.11 ---.....T.....T.....

          190
Consensus  GTCGCGTGCAAAACATGTC
DeantA9.5  .....
DeantA4.14 .....
DeantA14.9 .....T
DeantA1.1  .....
DeantA13.9 -----
DeantA7.11 .....

```

**Рис. 3.1.4** Вирівнювання послідовностей IGS структурного класу 2 5S рДНК *Deschampsia antarctica*. Характеристики використаних для порівняння клонів наведені у табл. 1 та 2.

Таблиця 3.1.3

Рівень подібності (%) IGS структурного класу 2  
5S рДНК *D. antarctica*

Клон	DeantA9.5	DeantA4.14	DeantA14.9	DeantA1.1	DeantA13.9*	DeantA7.11*
DeantA9.5	100	93.0	89.9	89.9	92.4	75.8
DeantA4.14		100	93.0	92.0	90.8	78.4
DeantA14.9			100	91.0	89.3	78.4
DeantA1.1				100	93.9	76.9
DeantA13.9*					100	68.7
DeantA7.11*						100

Таблиця 3.1.4

Рівень подібності (%) IGS структурного класу 3 5S рДНК *D. antarctica*

Клон	DeantK5.17*	DeantA5.2*	DeantA8.14	DeantA18.10	DeantA18.4	DeantA10.13	DeantA13.6	DeantK5.16	DeantA11.10	DeantA2.3	DeantA18.15	DeantA9.18
DeantK5.17*	100	97.1	95.1	93.6	93.6	95.6	94.6	95.1	93.1	94.6	85.4	85.4
DeantA5.2*		100	97.0	93.1	93.1	95.1	92.6	93.1	94.6	94.1	84.8	84.8
DeantA8.14			100	94.3	94.3	95.3	93.0	93.9	93.4	93.4	82.6	83.1
DeantA18.10				100	100	95.3	94.8	93.4	90.6	93.4	82.6	83.1
DeantA18.4					100	95.3	94.8	93.4	90.6	93.4	82.6	83.1
DeantA10.13						100	93.4	94.4	92.5	94.3	83.6	84.0
DeantA13.6							100	93.4	90.6	90.6	82.2	82.7
DeantK5.16								100	89.7	92.0	82.2	82.2
DeantA11.10									100	90.6	82.6	83.1
DeantA2.3										100	84.0	84.5
DeantA18.15											100	95.8
DeantA9.18												100

Примітка. Знаком \* позначені клони, у яких відбулась делеція частини 5S рДНК.

	10	20	30	40	50	60
Consensus	CCCTTTTTGC	GTCACGCGAC	GACGACGTGG	CACGCTCGGG	GCGTTGTATT	CTTTTGTGCG
DeantK5.17	-----.	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA5.2	-----.	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA8.14	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA18.10	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.
DeantA18.4	.....	.....	.....	.....	.....	.....T.
DeantA10.13	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA13.6	.....	.A.....	...G....	..A.....	.....	.....G.
DeantK5.16	..T.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA11.10	.....C..	.....	..T.G..A.	.....	.....	.....
DeantA2.3	.....	.....	.....	..T.....	.....	A.....
DeantA18.15	T.A.....	.....T	...GT...	.....	.....A...	A...TC...
DeantA9.18	T.....	.....	...TG....	.....	.....A...	A...TC...
	70	80	90	100	110	120
Consensus	GCCCCTMGTG	CTCCCCAATT	CCCTCGTGTT	CATGCAATGG	T-AAAATGGG	ATGTTTCATGG
DeantK5.17	.T...C..	.....	.....	.....	.A....T..	.....
DeantA5.2	.....C..	.....	.....	.....	-....A..	.G.....A
DeantA8.14	.....A..	.....	.....	.....	-....A..	.G.....
DeantA18.10	.....A..	.....	..TC....	.....	-......	.....
DeantA18.4	.....A..	.....	..TC....	.....	-......	.....
DeantA10.13	.....A..	.....	.....	.....	-......	.....
DeantA13.6	.....C..	.....	.....	.....	.A....T..	.....
DeantK5.16	.....A..	.....	.....	.....	.A....T..	.....
DeantA11.10	.....C..	.....	.....	.....C	-......	.G.....
DeantA2.3	.....A..	.....	...C....	.....	-......	...A....
DeantA18.15	A....CA..	.....	TTAAG...C	.....C..	-....C..	.....
DeantA9.18	A....C..	.....	TTAAG...C	.....C..	-....C..	.....
	130	140	150	160	170	180
Consensus	TAAAGTGGGG	TGGCCATGGT	-AAACTGGGG	CGCGTAGGCA	CGAGAAGGAG	CCGGATGGGG
DeantK5.17	.....	.....	-.....	.....	.....	...A....
DeantA5.2	.....	.....	-.....T	.....	.....	...A....
DeantA8.14	.....	.....	-.....T	..A....	.....C...	.....
DeantA18.10	.....	.....	-.....	..A....	.....	...T....
DeantA18.4	.....	.....	-.....	..A....	.....	...T....
DeantA10.13	.....	.....	-...T.-..	..A....	.....	...T....
DeantA13.6	.....	.....	-.....	..A....	.....	...T....
DeantK5.16	.....	.....	-.....	..A....	.....	...T....
DeantA11.10	.....T..	.....G...	-.....T	.....	.....TT	.....
DeantA2.3	.....C..	.....	-.....	.....	.....	...A....
DeantA18.15	...A....	...G..A.	A.....	.....	.....T	...A...-...T
DeantA9.18	...A....	C...G.A...	A.....	.....	...T....	...A...-...T
	190	200	210			
Consensus	CAAGCATAAG	GCTAAATCGT	GTGCATAACA	TGTC		
DeantK5.17	.....	.....	.....	.....		
DeantA5.2	.....	.....	.....	.....		
DeantA8.14	..T.....	.....	.....	.....		
DeantA18.10	..C.....	.....A.	.....	..A.		
DeantA18.4	..C.....	.....A.	.....	..A.		
DeantA10.13	.....	.....	.....	.....		
DeantA13.6	.....	.....G.A.	.....	..A.		
DeantK5.16	.....	..C..G..C	...A....	..A..		
DeantA11.10	.....	.....	.....	.....		
DeantA2.3	.....	..AA....	.....	.....		
DeantA18.15	.....	.....GC...	...T....	.....		
DeantA9.18	.....	.....GC...	...T....	.....		

**Рис. 3.1.5** Вирівнювання послідовностей IGS структурного класу 3 5S рДНК *Deschampsia antarctica*. Характеристики використаних для порівняння клонів наведені у табл. 1 та 2. Зеленим кольором виділені елементи промотора РНК-полімерази III.

**Таблиця 3.1.5**

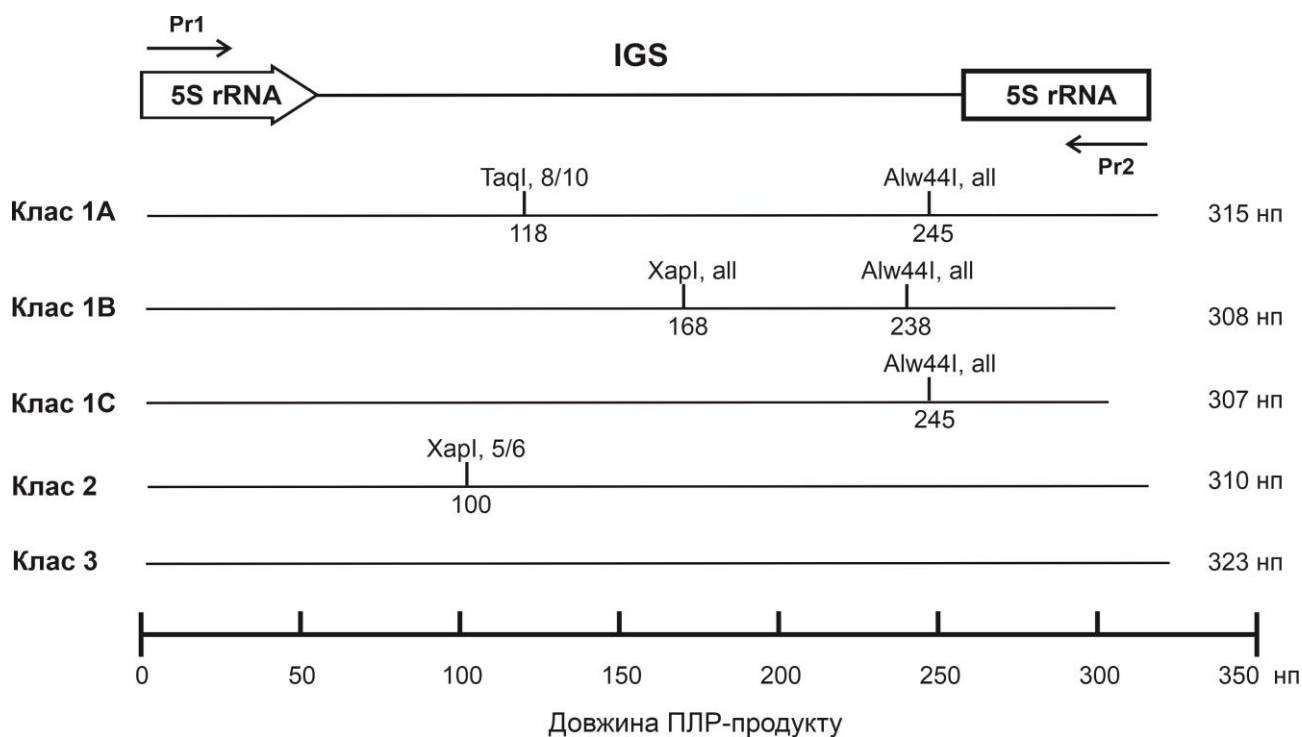
**Рівень подібності (%) IGS різних структурних класів  
5S рДНК *D. antarctica***

<b>Клас</b>	<b>1A</b>	<b>1B</b>	<b>1C</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>1A</b>	95,1-100	89,7-94,1	91,7-96,1	77,2-82,0	70,6-76,6
<b>1B</b>		93,6-98,5	88,3-93,1	73,8-80,1	67,0-74,8
<b>1C</b>			92,7-95,6	78,6-82,5	71,2-76,6
<b>2</b>				89,9-93,0	69,3-76,9
<b>3</b>					82,2-100

### **3.1.2. Відносний вміст структурних класів 5S рДНК у геномі *D. antarctica***

У наших експериментах по клонуванню IGS у геномі *D. antarctica* ідентифіковано як мінімум три структурні класи 5S рДНК. При цьому, у різних популяціях було знайдено 5S рДНК різних структурних класів. Для пояснення цього результату можна запропонувати дві гіпотези: (1) три класи 5S рДНК присутні у представників всіх популяцій, але ми виявили лише деякі з них, оскільки для кожного зразка було секвеновано лише обмежену кількість клонів; (2) рослини з різних популяцій *D. antarctica* дійсно відрізняються за набором структурних класів 5S рДНК у геномі. Для перевірки цих гіпотез було розроблено метод, який дозволяє виявити наявність у геномі рослин з різних популяцій всіх класів 5S рДНК та визначити співвідношення між ними.

Проаналізувавши наявні послідовності IGS, ми ідентифікували сайти ендонуклеаз рестрикції, які специфічні лише для певних класів 5S рДНК (рис.3.1.6).



**Рис. 3.1.6** Розташування сайтів впізнавання ендонуклеаз рестрикції TaqI, Alw44I, XapI у IGS різних класів 5S рДНК *D. antarctica*.

Так, для підкласу 1А характерна присутність двох сайтів для ендонуклеаз рестрикції, TaqI та Alw44I, у позиціях 118 та 245 нп, відповідно. Для класу 1В також виявлено сайт Alw44I у позиції 238 нп, проте сайт TaqI відсутній, але наявний сайт XapI у позиції 168 нп. Для послідовності класу 1С характерна наявність лише сайту Alw44I у позиції 245 нп, а класу 2 – сайту XapI у позиції 100 нп. У IGS класу 3 відсутні сайти всіх згаданих ендонуклеаз рестрикції. Таким чином, при обробці ПЛР-продуктів певною рестриктазою, або сумішшю рестриктаз для кожного класу/підкласу має утворюватися свій специфічний набір фрагментів ДНК, за яким можна ідентифікувати той чи інший клас (табл. 3.1.6.). При цьому інтенсивність смуг ДНК у гелі після електрофоретичного розділення буде пропорційна відносному вмісту певного класу у геномі.

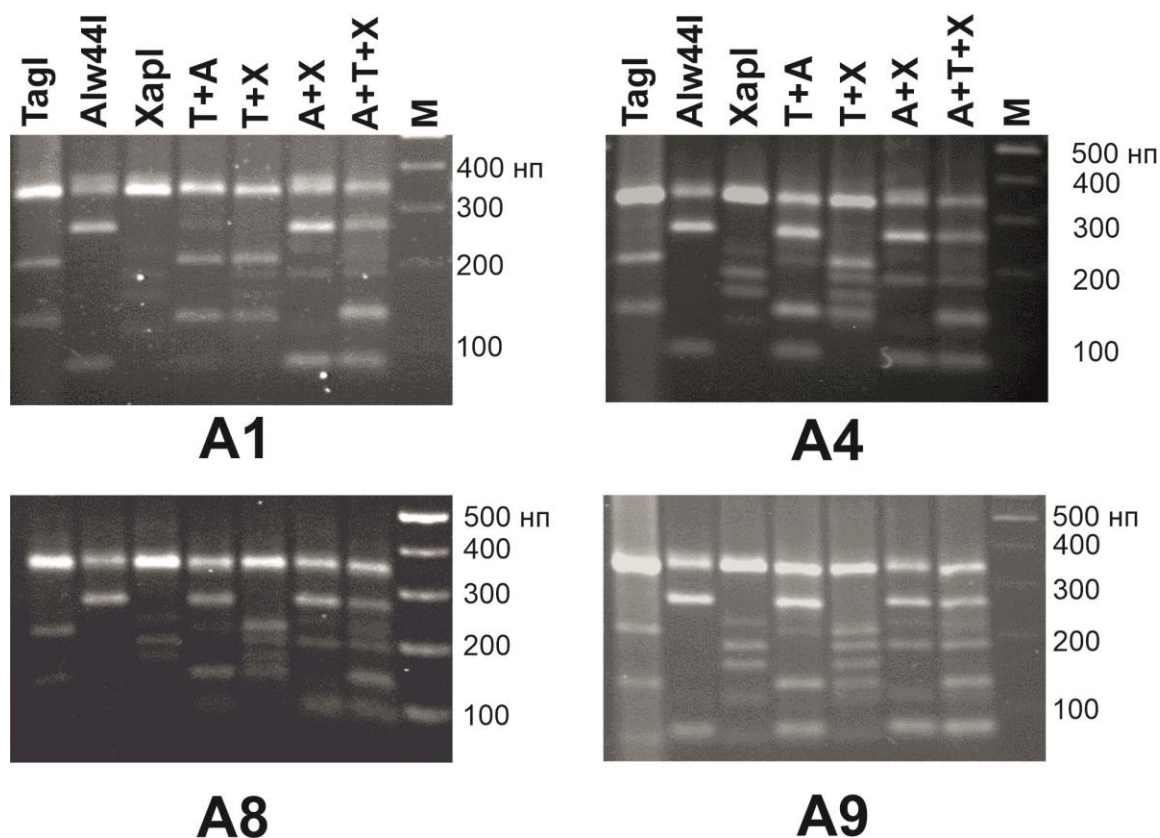


Таблиця 3.1.6

Довжини фрагментів ДНК (нп), отриманих після обробки ПЛР-продуктів IGS 5S рДНК *D. antarctica* рестриктазами Alw 44I, TaqI та XapI

Клас рДНК	Довжини фрагментів			
	----	Alw 44I	TaqI	XapI
1A	315	245 70	197 118	315
1B	308	238 70	308	168 140
1C	307	245 62	307	307
2	310	310	310	210 100
3	323	323	323	323

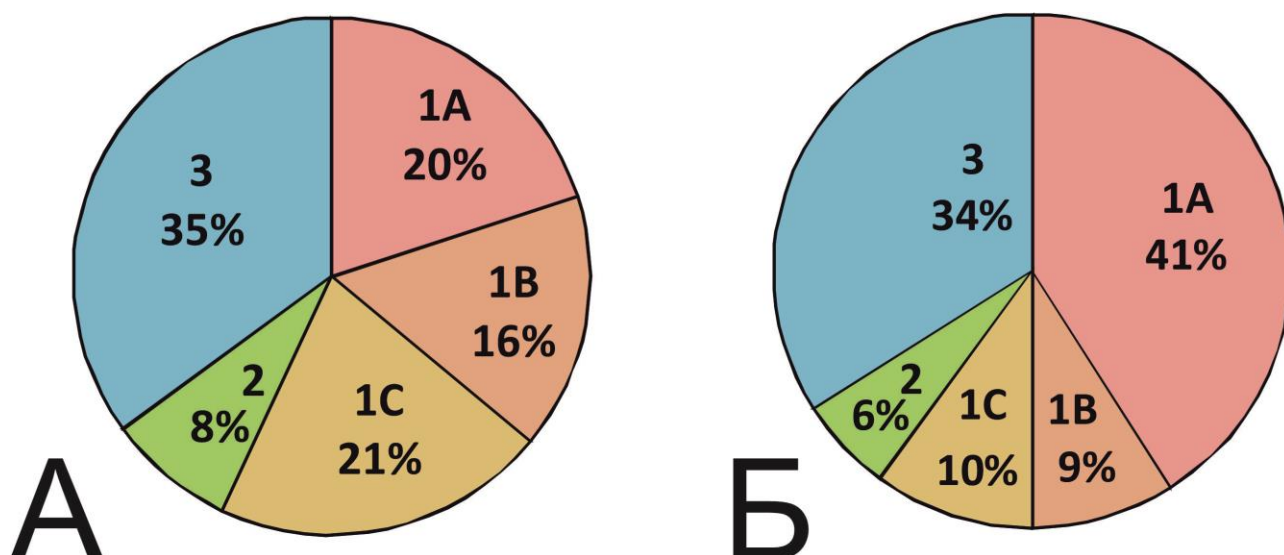
Відповідно, нами було проведено рестриктний аналіз IGS 5S рДНК та проаналізовано співвідношення класів для кожної популяції за допомогою електрофоретичного розділення продуктів рестрикції (обрані електрофореграми наведені на рис.3.1.7) та їх квантифікації (рис.3.1.8).



**Рис. 3.1.7** Обрані електрофореграми рестриктного аналізу IGS 5S рДНК *D. antarctica*. Т – ендонуклеаза рестрикції TaqI, А – Alw44I, X – XapI, М – маркер GeneRuler 100 bp plus; А1, А4, А8, А9 – назви популяцій.

Після аналізу отриманих наборів фрагментів встановлено, що всі ідентифіковані нами класи/підкласи 5S рДНК наявні у кожній із досліджених рослин/популяцій. При цьому відносний вміст варіантів 5S рДНК у геномах рослин з різних популяцій відрізняється незначно. Так, найбільше в геномі представлений клас 1, частка якого становить 57-60 %, далі ідуть клас 3 - 34-35 %, та клас 2 – 6-8% (рис.3.1.8). Варто зазначити, що при випадковому відборі клонів для сиквенування в кінцевому рахунку було отримано більше всього клонів класу 1 (51 % від загальної кількості), і менше всього – класу 2 (16 %).

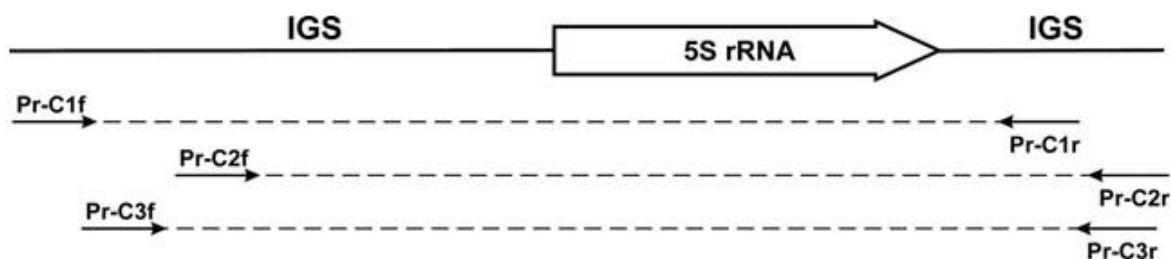
Проте, в межах класу 1 виявлену різницю між популяціями за відносним вмістом підкласів. У більшості досліджених популяцій вміст повторів 1А та 1С майже однаковий – 20-21%, а 1В – дещо менший, 16 %. Помітна різниця знайдена для популяції А1: підклас 1А – 41%, а підкласи 1В та 1С – 9-10% (рис.3.1.8).



**Рис. 3.1.8** Відносний вміст різних класів 5S рДНК у геномі *D. antarctica*. А – співвідношення, характерне для більшості популяцій; Б – співвідношення, характерне для популяції А1.

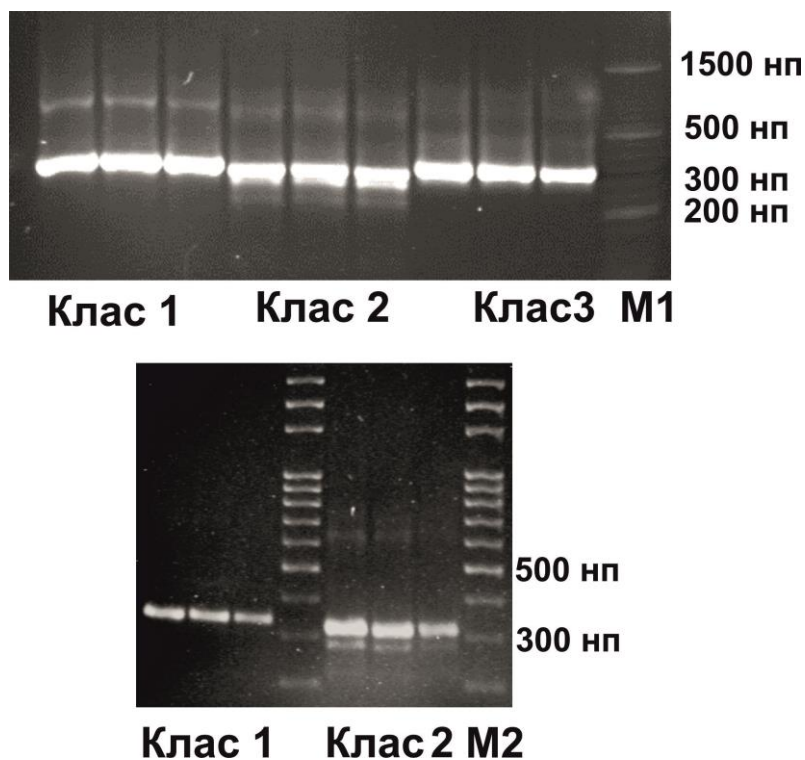
### 3.1.3. Організація кодувальної ділянки 5S рДНК *D. antarctica*.

З огляду на те, що в геномі *D. antarctica* було знайдено три основні структурні класи та три субкласи IGS, постало питання, чи всі ці варіанти 5S рДНК є функціонально повноцінними. Критеріями повноцінності повтору 5S рДНК можна вважати (а) відсутність суттєвих перебудов у межах кодувальної ділянки (особливо таких, які порушують її взаємодію з РНК-полімеразою) та (б) здатність 5S рРНК укладатись у канонічну вторинну структуру. Відповідно, було вирішено проаналізувати будову кодувальної ділянки різних класів 5S рДНК. Для цього було використано три пари праймерів, які були розроблені для клонування кодувальної ділянки кожного з класів. Ці праймери комплементарні до послідовності IGS та специфічні для кожного з трьох класів 5S рДНК (рис. 3.1.9).



**Рис 3.1.9** Схематичне розташування сайтів для специфічних праймерів трьох класів IGS 5S рДНК у *D. antarctica*. Pr-C1f, Pr-C1r – праймери «forward» та «reverse» для структурного класу 1, відповідно. Pr-C2f, Pr-C2r – праймери «forward» та «reverse» для структурного класу 2, відповідно. Pr-C3f, Pr-C3r – праймери «forward» та «reverse» для структурного класу 3, відповідно.

Використання цих праймерів дозволило вибірково ампліфікувати кодувальну ділянку та суміжні із нею фрагменти IGS для кожного з 3 структурних класів рДНК (рис. 3.1.10). Довжина отриманих ПЛР-продуктів відповідала очікуваній з урахуванням розташування праймерів (рис. 3.1.9). Проте, для класу 2 на електрофореграмі спостерігались два ампліфікати високої інтенсивності, які відрізняються за довжиною на 40-50 нп.



**Рис. 3.1.10** Електрофореграми ампліфікованих фрагментів 5S рДНК різних класів *D. antarctica*. M1 – маркер 50 bp DNA ladder, M2 – маркер 100 bp DNA ladder

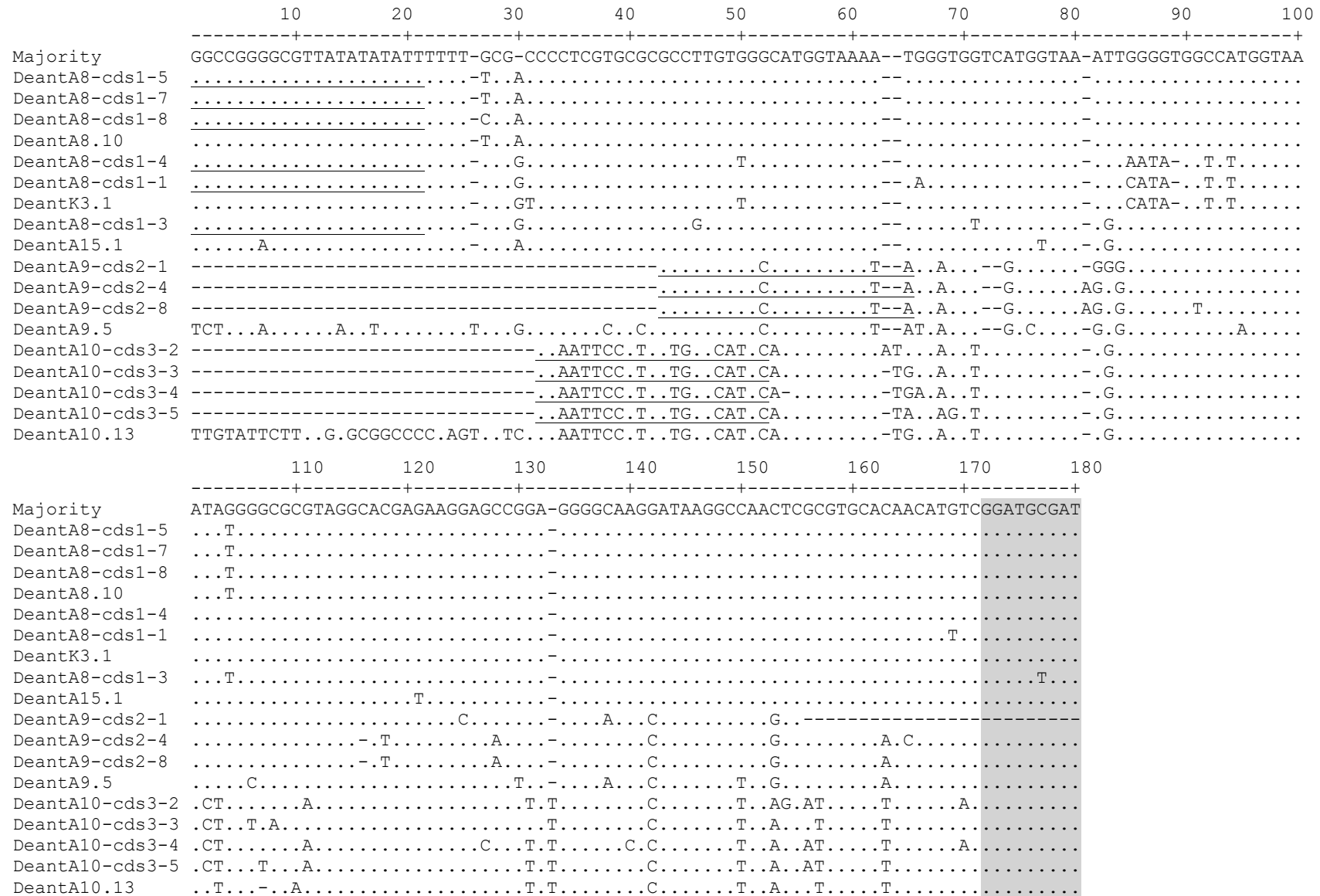
Отримані за допомогою класоспецифічних праймерів ПЛР-продукти клонували, сиквенували та порівняли отримані послідовності (табл. 3.1.7) між собою та з отриманими раніше клонами (DeantA8.10, DeantK3.1, DeantA15.1, DeantA9.5, DeantA10.13) які представляють 5S рДНК різних структурних класів (рис. 3.1.11). Було встановлено, що нам дійсно вдалось клонувати кодувальну ділянку для кожного з класів та підкласів 5S рДНК (табл.3.1.7)

Таблиця 3.1.7

Характеристика клонів кодувальної ділянки 5S рДНК *D. antarctica*

Назва клону	Розмір вставки, нп	Структурний клас
DeantA8-cds1-5	322	<b>1A</b>
DeantA8-cds1-7	334	
DeantA8-cds1-8	334	
DeantA8-cds1-1	333	<b>1B</b>
DeantA8-cds1-4	333	
DeantA8-cds1-3	334	<b>1C</b>
DeantA9-cds2-1	253	<b>2</b>
DeantA9-cds2-4	313	
DeantA9-cds2-8	313	
DeantA10-cds3-2	337	<b>3</b>
DeantA10-cds3-3	336	
DeantA10-cds3-4	336	
DeantA10-cds3-5	336	

Цікаво, що розмір клонованих ділянок 5S рДНК класів 1 та 3 виявився практично однаковим і таким, що відповідає довжині використаних для клонування ПЛР-продуктів. Водночас, для класу 2 довжина клонованих ділянок виявилась різною за рахунок делеції довжиною 55 нп, яка мала місце у клоні DeantA9-cds2-1. Отже, нам вдалось клонувати повтори 5S рДНК, що відповідають двом ампліфікатам, які було отримано з використанням праймерів, специфічних для класу 2 (рис. 3.1.10).

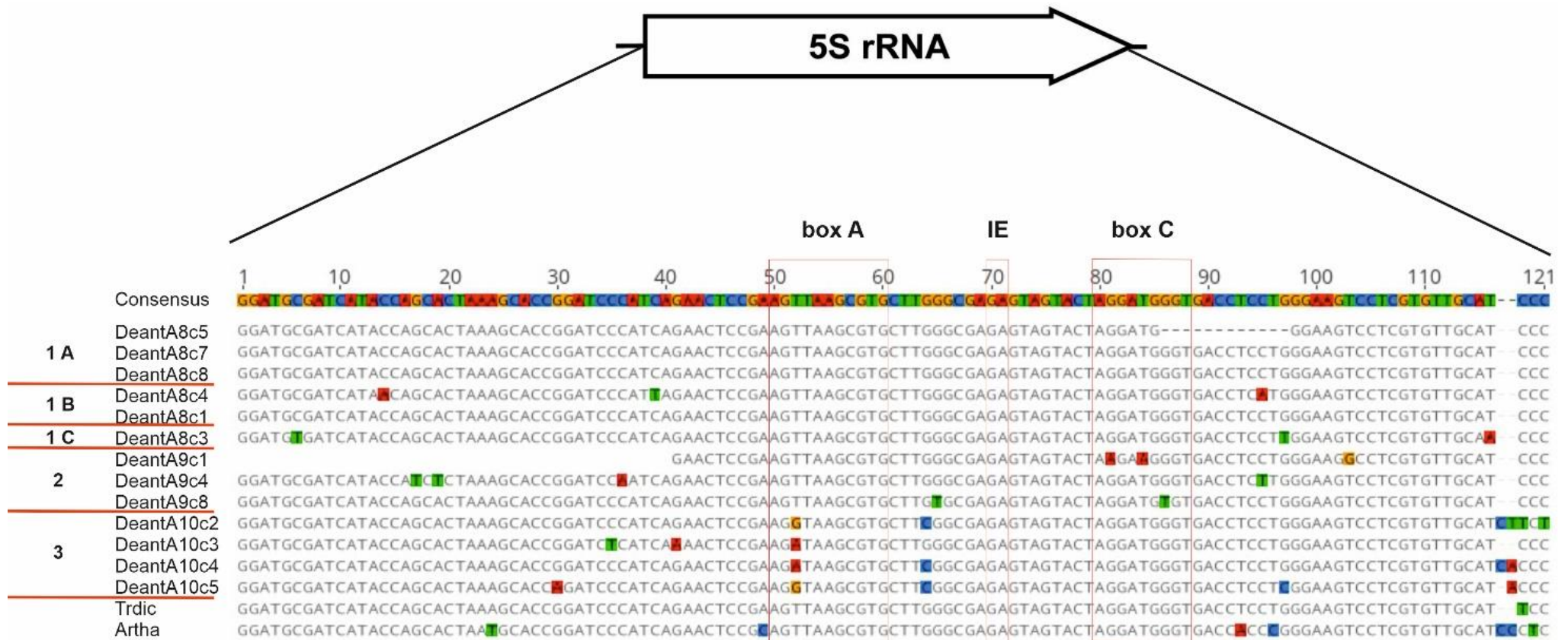


**Рис. 3.1.11** Порівняння 3'-фрагментів IGS для клонів кодувальної ділянки, які було отримано з використанням класоспецифічних праймерів та попередньо отриманих клонів IGS. Послідовності праймерів підкреслено, а їх розташування вказано на рис. 3.1.9.3 Характеристика клонів наведені в таблицях 3.1.1 та 3.1.7. На сірому фоні – частина кодувальної ділянки

В подальшому отримані послідовності кодувальних ділянок 5S рДНК *D. antarctica* порівняли між собою та із кодувальними ділянками *Triticum dicoccoides* та *Arabidopsis thaliana* (рис. 3.1.12). За результатами вирівнювання було встановлено, що послідовності 5S рДНК у *D. antarctica* мають довжину 119 нп, окрім трьох із чотирьох розшифрованих клонів класу 3, у яких ця довжина складає 120-121 нп за рахунок вставки 1 або 2 нуклеотидів на 3'-кінці кодувальної ділянки. При аналізі вирівнювання нуклеотидних послідовностей було також виявлено делеції (а) розміром 40 нуклеотидів на 5'-кінці кодувальної ділянки у одному клоні класу 2 (клон DeantA9-cds2-1) та (б) розміром 12 нп (86-97 нп) у одному клоні класу 1 (DeantA8-cds1-5). Наявність делецій у кодувальній ділянці вказує на перетворення цих повторів 5S рДНК на псевдогени.

Нуклеотидні заміни в межах кодувальної ділянки у більшості просиквенованих клонів є поодинокими і представлені переважно трансверсіями. Кількість замін на один клон становить від 0 до 4 (рис. 3.1.12). Специфічних для певного класу замін не спостерігається.





**Рис.3.1.12** Порівняння нуклеотидної послідовності кодувальної ділянки 5S рДНК. Алгоритм розрахунків – Muscle. Червоними прямокутниками відмічено елементи внутрішнього промотору РНК-полімерази III у *A. thaliana*.



Відомо, що Pol III взаємодіє із внутрішнім промотором, представленим в 5S рДНК трьома елементами, які розміщені в центральній частині кодувальної послідовності і використовуються для зв'язування факторів транскрипції TFIIIA та TFIIIB (White, 2011; Vannini, 2013). До таких елементів промотору відносяться так звані A-box, C-box та проміжний елемент IE, який представлений консервативним динуклеотидом GA (Pieler et al., 1987; Hemleben & Werts, 1988; Cloix et al., 2003). Цей консервативний динуклеотид присутній без змін у всіх отриманих нами клонах. Раніше для *Thinopyrum intermedium* (Triticeae) також повідомлялось, що IE є найбільш консервативним серед внутрішніх елементів промотора Pol III (Mahelka et al., 2013). У *D. antarctica* в A-box знайдено по одній трансверсії T → R у всіх чотирьох клонах класу 3 у позиції +52, а у C-box знайдено поодинокі мутації для двох клонів класу 2 у позиціях +82, +85 та +87.

Наявність мутацій у внутрішніх елементах промотору Pol III слід вважати вказівкою на можливе порушення транскрипції відповідного повтору 5S рДНК. Отже, видається, що всі дослідженні клони класу 3 та частина клонів класів 1 та 2 можуть виявитись такими, що не транскрибуються. Зокрема, з високою вірогідністю транскрипційно неактивним псевдогеном можна вважати клон DeantA8-cds1-5. Проте, на нашу думку, питання про активність інших клонів із мутаціями у кодувальній ділянці потребує додаткового вивчення, оскільки з літературних джерел відомо недостатньо, наскільки суттєво одиночні заміни нуклеотидів у A- та C-box впливають на їх взаємодію з Pol III.

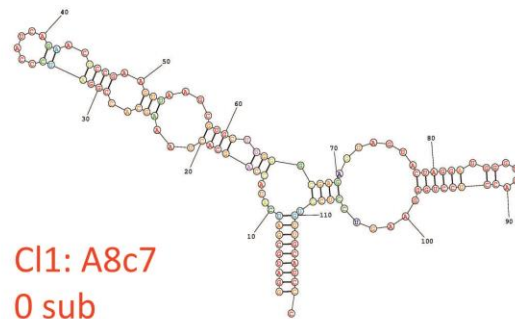
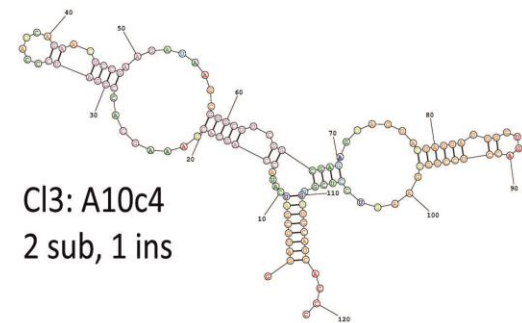
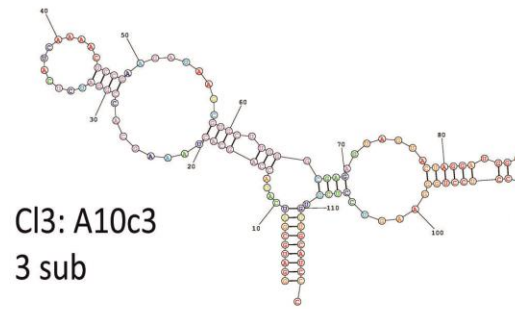
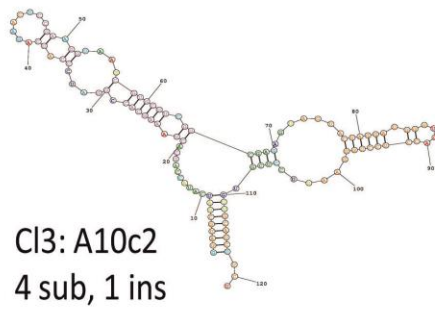
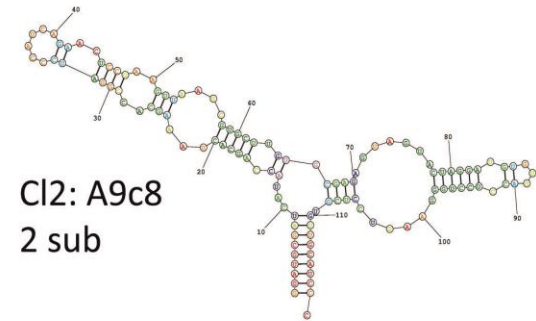
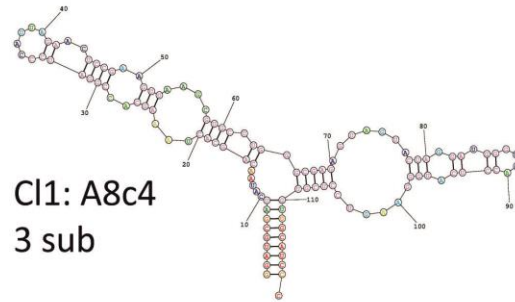
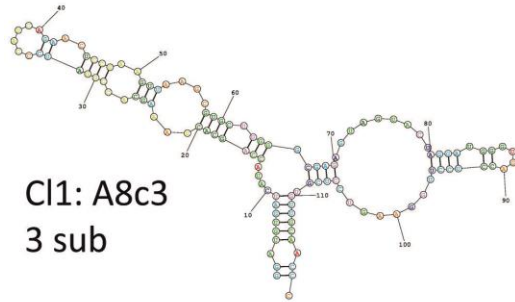
Відомо, що 5S рРНК у складі рибосоми утворює консервативну вторинну структуру (Barciszewska et al., 2001). Відповідно, порушення такої структури слід вважати вказівкою на нездатність молекули 5S рРНК виконувати свою функцію. Для того, щоб оцінити функціональність 5S рРНК, що зчитується із кодувальних ділянок *D. antarctica* нами була змодельована вторинна структура їх можливих транскриптів (рис. 3.1.13). Раніше вторинна структура 5S рРНК була встановлена завдяки рентгено-кристалографічним дослідженням, що дає

можливість достовірного прогнозування її для нових об'єктів (Barciszewska et al., 1994, 2001; Petrov et al., 2013).

Результати комп'ютерного моделювання свідчать, що у більшості випадків для усіх трьох структурних класів 5S рДНК *D. antarctica* можливе укладання транскриптів у канонічну вторинну структуру. Найбільш подібною до структури 5S рРНК досліджених раніше видів рослин виявилась структура транскриптів повторів класу 1 (клони DeantA8-cds1-7 та -8), кодувальна послідовність яких співпадає з консенсусною (рис. 3.1.13).

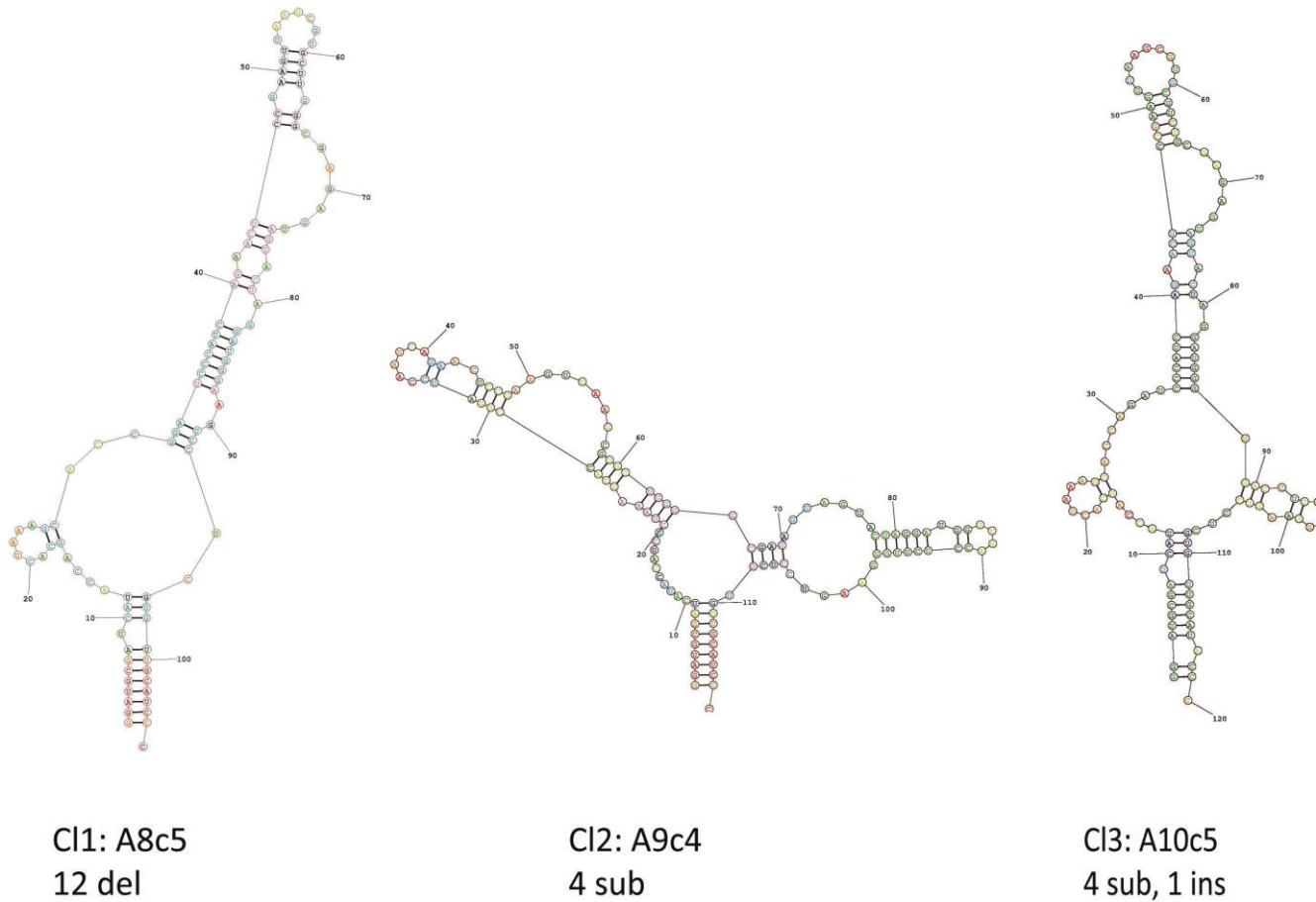
Слід зазначити, що у кількох клонів заміни нуклеотидів, присутні у кодувальній ділянці, не порушують вторинної структури, оскільки вони або (1) відбулись у однитчастих петлях, або ж (2) розташовані у двонитчастих стеблах, проте мають компенсаторний характер. Останнє слід вважати вказівкою на існування стабілізуючого природного добору, спрямованого на підтримання канонічної вторинної структури 5S рРНК. Таким чином, наявність у кодувальній послідовності кількох відхилень від консенсусу не обов'язково має призводити до порушення правильного укладання 5S рРНК у складі рибосоми. Раніше для злакових були встановлено, що мутації у кодувальних ділянках можуть як заважати утворенню нормальної вторинної структури, так і бути несуттєвими, тобто такими, що не пошкоджують структуру і функціональність. Зокрема, наявність одної нуклеотидної заміни, як правило, не порушує вторинну структуру 5S рРНК (Mahelka et al., 2013).

Водночас, у *D. antarctica* передбачувані транскрипти клонів класу 2, DeantA9-cds2-4 та класу 3, DeantA10-cds3-5, які містять по 4-5 відхилень від консенсусної послідовності, а також клону DeantA8-cds1-5, у якому сталась делеція 16 нд, не здатні утворювати канонічну вторинну структуру 5S рРНК та, вірогідно, є функціонально неповноцінними (рис. 3.1.13).



**Probability** >= 99%  
 99% > **Probability** >= 95%  
 95% > **Probability** >= 90%  
 90% > **Probability** >= 80%  
 80% > **Probability** >= 70%  
 70% > **Probability** >= 60%  
 60% > **Probability** >= 50%  
 50% > **Probability**

Рис. 3.1.13 (початок)



**Probability** >= 99%  
 99% > **Probability** >= 95%  
 95% > **Probability** >= 90%  
 90% > **Probability** >= 80%  
 80% > **Probability** >= 70%  
 70% > **Probability** >= 60%  
 60% > **Probability** >= 50%  
 50% > **Probability**

**Рис. 3.1.13 (закінчення)** Прогнозована вторинна структура 5S рРНК *D. antarctica*. Sub-нуклеотидні заміни, del-делеції, ins - вставки

### ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.1.:

Встановлено, що у геномі *D. antarctica* присутні щонайменше три структурні класи 5S рДНК, які суттєво відрізняються за послідовністю IGS. В свою чергу, в межах класу 1 виявлено три підкласи. Рівень подібності IGS 5S рДНК одного структурного класу не менший, ніж 82,2%. В той же час, між класами рівень подібності є значно меншим та коливається від 67,0 до 82,5%.

Представники різних антарктичних популяцій *D. antarctica* майже не відрізняються за кількістю копій рДНК у геномі та співвідношенням структурних класів / підкласів. Отже, складається враження, що колонізація Антарктики видом *D. antarctica* не супроводжувалась суттєвими перебудовами в організації мультигенної родини 5S рДНК.

Детально проаналізовано структуру IGS 5S рДНК *D. antarctica*, зокрема знайдено зовнішні елементи промотора РНК-полімерази, подібні до таких в інших представників родини. На початку IGS знаходиться Т-багатий мотив НСНТТТТТGС, який, імовірно, залучений до термінації транскрипції. Для кожного з класів характерна своя Т-багата консенсусна послідовність: клас 1 – ТСНТТТТТGС, клас 2 – ТСТТТТТТGС, клас 3 – СССТТТТТGС.

Нуклеотидні заміни в межах кодувальної ділянки у більшості просиквенованих клонів є поодинокими і представлені переважно трансверсіями. Наявність у кодувальній послідовності кількох відхилень від консенсусу не обов'язково має призводити до порушення правильного укладання 5S рРНК у складі рибосоми.

Аналіз отриманих даних також свідчить, що у геномі *D. antarctica* наявні 5S псевдогени двох типів – стародавні, які накопичили багато замін нуклеотидів та інделів, та відносно молоді, які втратили окремі фрагменти кодувальної ділянки, але за послідовністю нуклеотидів несуттєво відрізняються від повноцінних повторів 5S рДНК.

Більша частина результатів цих досліджень опубліковані у роботах Ishchenko et.al. 2018a, Andreev et al., 2019.

## 3.2. ПОХОДЖЕННЯ ТА ЕВОЛЮЦІЯ СТРУКТУРНИХ КЛАСІВ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ВИДІВ РОДУ *DESCHAMPSIA*

### 3.2.1. ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНИХ КЛАСІВ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ВИДІВ РОДУ *DESCHAMPSIA*

Присутність в геномі *D. antarctica* трьох структурних класів IGS 5S рДНК, які суттєво відрізняються між собою, є унікальним явищем. Відповідно, постає питання, коли саме в еволюції виникли ці структурні класи, зокрема, чи вони також наявні у геномах інших представників роду *Deschampsia*. Тому нами було клоновано, сиквеновано та проаналізовано IGS 5S рДНК трьох близько споріднених видів: *D. cespitosa* (L.) P. Beauv., *D. alpina* (L.) Roem. & Schult., *D. laxa* Phil., а також *Avenella flexuosa* (L.) Parl. (*Deschampsia flexuosa* (L.) Trin., *Aira flexuosa* L.) та *Vahlodea atropurpurea* (Wahlenb.) Fr. ex Hartm. (*Deschampsia atropurpurea* (Wahlenb.) Scheele, *Aira atropurpurea* Wahlenb.) (табл. 3.2.1), двох видів, чия приналежність до роду *Deschampsia* є об'єктом тривалих дискусій (Garcia-Suarez et al., 1997, Chiapella, 2004).

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації 5S рДНК показало, що для більшості досліджених видів роду *Deschampsia* утворюється лише один ПЛР-продукт довжиною близько 350 нп, за виключенням *A. flexuosa*.

Аналіз послідовностей сиквенованих клонів роду *Deschampsia* показав, що вони містять ділянку IGS 5S рДНК, яка з обох боків фланкована фрагментами кодувальної послідовності, зокрема – використаними для ПЛР праймерами. Також було встановлено, що довжина IGS досліджуваних клонів, за виключенням Deces18, лежить у межах від 173 до 211 нп, а вміст GC-пар коливається від 50,57 до 58,33% (табл. 3.2.1). Довжина IGS клону Deces18 становить лише 146 нп.

Таблиця 3.2.1

Характеристика IGS 5S рДНК представників видів роду *Deschampsia*

Клон	Довжина IGS, пн	Відсоток GC-пар IGS, %
Deces1.2	204	57,84
Deces1.7	200	56,00
Deces1.11	200	56,00
Deces1.16	199	56,78
Deces13	232	58,19
Deces14	204	57,35
Deces15	204	57,35
Deces16	204	56,86
Deces18	146	55,48
Deces19	200	56,50
Deces20	211	54,03
Dealp1	211	54,50
Dealp2	204	58,33
Dealp3	211	54,50
Vaatr4	183	52,46
Vaatr5	174	50,57
Vaatr6	183	53,55
Delax10	195	56,92
Delax12	204	56,37
Avfle1	173	55,49
Avfle4	173	54,91
Avfle8	176	56,82
Avfle7	190	53,68
Avfle9	176	56,82

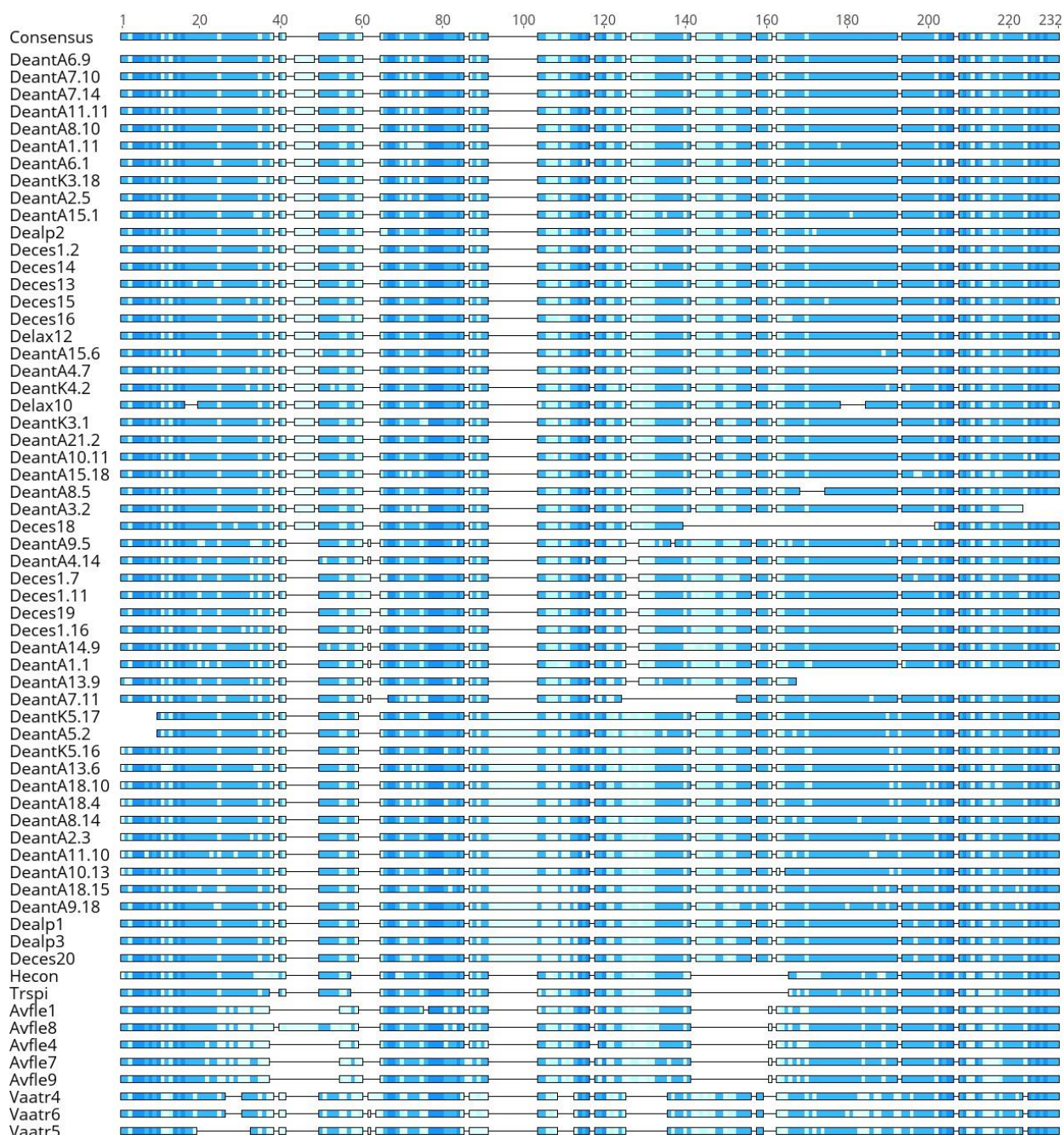
Отримані послідовності досліджуваних видів порівняли між собою, з різними популяціями *D. antarctica* та зі взятими з Генбанку послідовностями IGS двох близькоспоріднених видів, *Helictotrichon convolutum* та *Trisetum spicatum* (рис. 3.2.1). Було встановлено, що в IGS у досліджуваних видів, як і у *D. antarctica* (див. вище), в деяких клонах зустрічаються делеції, що зокрема пояснює малу довжину IGS клону Deces18.





Порівняння отриманих нами послідовностей показало, що рівень подібності IGS різних видів коливається у широких межах – від 50 до 98,6 %. При цьому IGS *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* найсильніше відрізнялись від решта видів – рівень подібності становив 50-73,2 %.

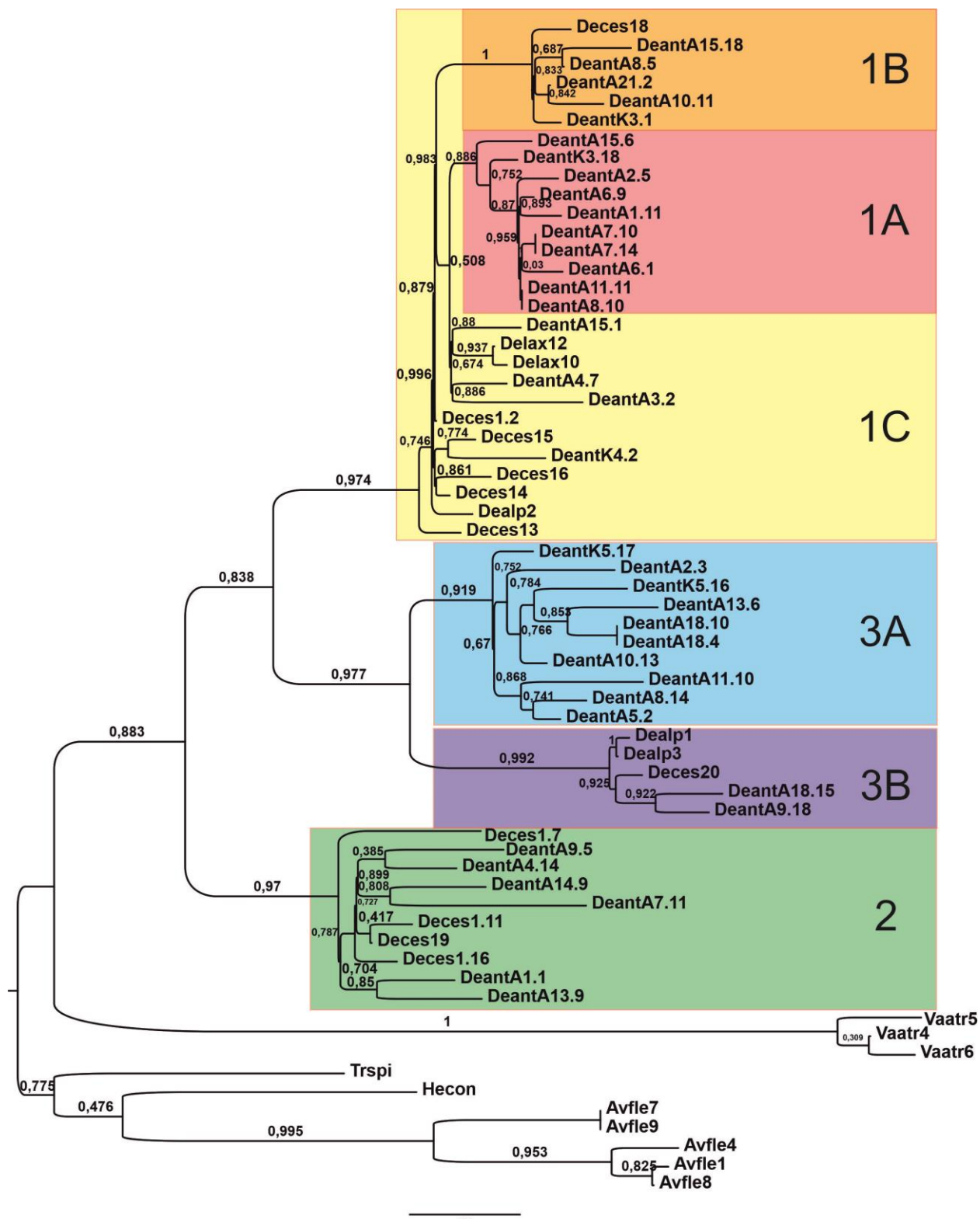
Водночас, послідовності IGS видів роду *Deschampsia* (*D. cespitosa*, *D. alpina*, *D. laxa*) виявились високо подібними до IGS того чи іншого класу 5S рДНК *D. antarctica*. Це дало підстави вважати, що у геномі цих видів та *D. antarctica* присутні однакові структурні класи 5S рДНК.

Спираючись на порівняння послідовностей IGS, ми побудували ML-дендрограму, яка відображає подібність між ними. Як зовнішню групу було використано *H. convolutum* та *T. spicatum* (рис. 3.2.2).





**Рис. 3.2.1** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Deschampsia* та видів *H. convolutum* та *T. spicatum*. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 3.2. Градацією відтінків блакитного показано рівень гомології між окремими ділянками:  – менше 60%,  – від 60 до 80%,  – від 80 до 100%,  – 100%.



**Рис. 3.2.2** Філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК IGS 5S рДНК представників видів роду *Deschampsia* та видів *H. convolutum* та *T. spicatum* методом максимальної правдоподібності з використанням моделі заміщення Джукса-Кантора. Цифри біля вузлів відповідають статистичній підтримці тесту Шимодайра-Хасегави, яка розрахована в частках одиниці.

На отриманій дендрограмі клони 5S рДНК представників роду *Deschampsia* утворюють три основні клади з високою статистичною підтримкою, що підтверджує думку про існування у геномі цих видів трьох класів 5S рДНК. Таким чином, можна стверджувати, що ці основні структурні класи 5S рДНК виникли в еволюції досить давно, ще до дивергенції *D. alpina*, *D. antarctica*, *D. cespitosa* та *D. laxa* від спільного предка і з того часу збереглися у геномах всіх чотирьох досліджених нами видів роду *Deschampsia*.

Рівень подібності послідовностей IGS в межах класів 1, 2 і 3 становить 85,8 - 100%, 89,5 - 98,5% та 82,2 - 100%, відповідно (табл. 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4.). Тобто, в межах одного структурного класу 5S рДНК рівень подібності IGS у досліджених видів не менший, ніж 82,2%. В той же час, між класами рівень подібності є значно меншим та коливається від 68,3 до 83,0% (табл. 3.2.5.). Подібність послідовностей IGS 5S рДНК видів роду *Deschampsia* та найближчих родичів з інших родів, *H. convolutum* та *T. spicatum* є ще нижчою і складає від 60,9 до 70,4%.







**Таблиця 3.2.5**

**Рівень подібності (%) IGS різних структурних класів  
5S рДНК видів роду *Deschampsia***

Клас	1А	1В	1С	2	3А	3В
1А	95,1-100	89,7-94,1	90,2-97,1	75,7-81,6	71,6-77,1	72,0-77,4
1В		93,6-98,5	85,8-96,6	72,3-80,7	68,9-75,7	68,3-75,1
1С			88,8-99,5	73,3-83,0	69,7-79,4	69,3-78,3
2				89,5-98,5	69,9-77,0	69,3-78,6
3А					89,7-100	82,2-87,3
3В						94,8-99,5

В межах структурного класу 1 можна розрізнити три підкласи, 1А, 1В та 1С (рис.3.2.3), які були описані раніше (див. вище). Два структурні підкласи, 1А та 1В формують на дендрограмі дві монофілетичні підгрупи (рис. 3.2.2). При цьому, до складу підгрупи 1В належать клони *D. antarctica* та *D. cespitosa*, а до складу підгрупи 1А - лише клони *D. antarctica*. Отже, у інших видів цього роду підклас 1А відсутній. Це означає, що підклас 1А виник відносно нещодавно, вже після дивергенції *D. antarctica* від решта видів, тоді як підклас 1В – дещо раніше. Механізмом виникнення цих підкласів можна вважати ампліфікацію певної предкової послідовності.

На противагу підкласам 1А та 1В, підклас 1С утворює на дендрограмі парафілетичну групу, до складу якої входять клони 5S рДНК всіх чотирьох досліджених видів *Deschampsia*. Ця група є базовою по відношенню до підкласів 1А та 1В. Тобто, отримані дані свідчать, що підклас 1С є еволюційно найстаршим, або предковим.

	10	20	30	40	50	60
Consensus	TCCTTTTTGCTTCACGCGACGACGACGCTGGCAGATCGGGCCGGGGCGTTATATATATTT					
DeantA6.9	..A.....T.....					
DeantA7.10	..A.....T.....			.A.....		
DeantA7.14	..A.....T.....			.A.....		
DeantA11.11	..A.....T.....					
DeantA8.10	..A.....T.....					
DeantA1.11	..A.....T.....					
DeantA6.1	..A.....T.....	.T.....				
DeantK3.18	.....			.C.....		
DeantA2.5	..A.....T.....					
DeantA15.6	.....	.T.....			.C.....	
DeantK3.1	.....					
DeantA21.2	.....			.A.....		
DeantA10.11	.....	.T.....		.A.A.....		
DeantA15.18	..A.....T.....			.A.....		
DeantA8.5	..A.....T.....					
DeantA15.1	.....	.T.....	.A.....	.A.....		
Dealp2	.....			.A.....		.C..
Deces1.2	.....					
Deces14	.....					
Deces13	.....	.G..A.....				
Deces15	.....		.C.....			
Deces16	.....				.G.....	
Delax12	.....	.G.....			.T.....	
DeantA4.7	.....	.T.....		.T.....		
DeantK4.2	..T.....		.G.....	.C.....	.A.....	
Delax10	.....	.G...---			.T.....	
DeantA3.2	.....					

	70	80	90	100	110	120
Consensus	TTTGCACCCCTCGTGC GCGCCTTGTGGGCATGGTAAAATGGGTGGTCATGGTAAATTGG					
DeantA6.9	...T.....					
DeantA7.10	...T.....					
DeantA7.14	...T.....					
DeantA11.11	...T.....					
DeantA8.10	...T.....					
DeantA1.11	...TTT.....					
DeantA6.1	...T.....		.T.....			
DeantK3.18	...T.....					
DeantA2.5	...T.....		.T.....			
DeantA15.6	.....	.A.....				
DeantK3.1	.....	.GT.....	.T.....			.CA
DeantA21.2	.....	.G.....				.CA
DeantA10.11	.....	.G.....	.T.....			.CA
DeantA15.18	...T..G.....					.CA
DeantA8.5	.....	.G.....				.CA
DeantA15.1	.....				.T.....	.G..
Dealp2	.....	.G.....				.G..
Deces1.2	.....	.G.....				.G..
Deces14	.....	.G.....		.A.....		.G..
Deces13	.....	.G.....				.G..
Deces15	.....	.G.....				.G..
Deces16	.....	.G.....	.T.....			.G..
Delax12	.....					.G..
DeantA4.7	.....					.G..
DeantK4.2	.....	.G.....		.A.....		.G..
Delax10	.....		.C.....			.G..
DeantA3.2	...T..G.....					.G..

Рис. 3.2.3 (початок)



	130	140	150	160	170	180
Consensus	GGTGGCCATGGTAAAT	-AGGGGCGCGTAGGCACGAGAAGGAGCCGGAGGGGCAAGGATAA				
DeantA6.9	.....	-.T.....				
DeantA7.10	.....	-.T.....				
DeantA7.14	.....	-.T.....				
DeantA11.11	.....	-.T.....				
DeantA8.10	.....	-.T.....				
DeantA1.11	.....	-.T.....	.T.....			
DeantA6.1	.....	-.T.....				.C.....
DeantK3.18	.....	A.....	-.T.....			
DeantA2.5	.T.....	.....	.....			
DeantA15.6	.....	-.T.....		.T.....		
DeantK3.1	TA-..T.T.....	.....				
DeantA21.2	TA-..T.T.....	.....				
DeantA10.11	TA-..T.T.....	.....				
DeantA15.18	TA-..T.T.....	.....				.TG.....
DeantA8.5	TA-..T.T.....	.....	-----			
DeantA15.1	.....	.....		.T.....		
Dealp2	.....	.....		.G.....		
Deces1.2	.....	.....				
Deces14	.....	.....				
Deces13	.....	C-.....			.T.....	
Deces15	.....	.....	.T.....			
Deces16	.....	.....	TA.....			
Delax12	.....	.....				
DeantA4.7	.....	.T.....	.....	.G.....		
DeantK4.2	.....	.....	A.....		.A..A.....	
Delax10	.....	.....	.....	-----		
DeantA3.2	.....	.T.....	.....	.T.....		

	190	200
Consensus	GGCCAAC TCGCGTGCACAACATGTC	
DeantA6.9	.....	.G.....
DeantA7.10	.....	
DeantA7.14	.....	
DeantA11.11	.....	
DeantA8.10	.....	
DeantA1.11	.....	
DeantA6.1	.....	
DeantK3.18	.....	
DeantA2.5	.....	
DeantA15.6	.....	
DeantK3.1	.....	
DeantA21.2	.....	
DeantA10.11	.....	.G.....
DeantA15.18	.....	.T.....
DeantA8.5	.....	
DeantA15.1	.....	
Dealp2	.....	
Deces1.2	.....	
Deces14	.....	
Deces13	.....	
Deces15	.....	.T.....
Deces16	.....	
Delax12	.....	.A.....
DeantA4.7	.....	
DeantK4.2	.T.....	
Delax10	.....	.A.....
DeantA3.2	.....	.ACCGG-----

**Рис. 3.2.3 (закінчення)** Вирівнювання послідовностей IGS структурного класу 1 5S рДНК *D. antarctica*, *D. alpina*, *D. cespitosa* та *D. laxa*

```

          10          20          30          40          50          60
Consensus  TCTTTTTTGCAGTCACGCGAGGACGGCGTGGCAGGCTCGGAGCGTTAAATTT-ATTTTTTT
DeantA9.5  .....A.....T.....-.....
DeantA4.14 .....A.....A..A.....-.....
Deces1.7   .....A.....A..A.....
Deces1.11 .....A.....A..A.....
Deces19    .....A..A.....
Deces1.16 .....G.....T.....-.....
DeantA14.9 .....A.....T.....A..A.....A-.....
DeantA1.1  .....G.....-..A.....
DeantA13.9 .T.....-..A.....
DeantA7.11 .....T.A.....T...AT.....A.....C-.-.....

          70          80          90          100         110         120
Consensus  GCGGCCCTCGTGCCCGCCTTGTGGCCATGGTAAATAGGATGGGTGGTAAAGTGGGGGTG
DeantA9.5  .....C.....T.....C..-.....
DeantA4.14 .....A.....TT.....
Deces1.7   .....T.....
Deces1.11 .....A.....
Deces19    .....
Deces1.16 .....
DeantA14.9 .....C..T...
DeantA1.1  .....A.....T.....
DeantA13.9 .....C.....A.....
DeantA7.11 CT..A.....C.....-----

          130         140         150         160         170         180
Consensus  GCCATGGTAAATAGGGGCGCGTAGGCACGAGAAGGAGCCGAGGGGCAAGCATAAGGCCA
DeantA9.5  ...A.....C.....T.....A.....T.
DeantA4.14 .....A.....
Deces1.7   ...C.....CT.....T.....T.
Deces1.11 .....
Deces19    .....
Deces1.16 .....G.....
DeantA14.9 .....G.....
DeantA1.1  T.....C..C...A.....T.....
DeantA13.9 .T.....C.CC..-----
DeantA7.11 ----.....T.....T.....

          190         200
Consensus  AGTCGCGTGCAAAACATGTC
DeantA9.5  .....
DeantA4.14 .....
Deces1.7   ..C..T...TT.....
Deces1.11 .....G.....
Deces19    .....
Deces1.16 .....
DeantA14.9 .....T
DeantA1.1  .....
DeantA13.9 -----
DeantA7.11 .....

```

**Рис. 3.2.4** Вирівнювання послідовностей IGS структурного класу 2 5S рДНК *D. antarctica*, *D. cespitosa* та *D. alpina*.

Структурний клас 2 представлений на філодендрограмі послідовностями 5S рДНК *D. antarctica* та *D. cespitosa*, які утворюють окрему кладу з високою статистичною підтримкою (рис. 3.2.2). Тобто, можна стверджувати, що цей клас утворився до дивергенції цих двох видів *Deschampsia*. Складається враження, що послідовності класу 2 відсутні в геномах *D. alpina* та *D. laxa*, проте для остаточного прояснення цього питання необхідно проаналізувати більше клонів 5S рДНК цих видів. Варто також зазначити, що для послідовностей IGS класу 2 характерні одиничні точкові мутації, проте загалом вони є високоподібними (рис. 3.2.4).

Аналіз отриманої філодендрограми свідчить, що структурний клас 3 слід розділити на підкласи 3А та 3В, оскільки послідовності, що їх формують, чітко відрізняються між собою специфічними мутаціями (рис. 3.2.5) і, відповідно, формують на дендрограмі дві порівняно віддалені кледи з високою статистичною підтримкою. При цьому, клас 3А видається специфічним лише для *D. antarctica*, що свідчить про його відносно нещодавнє виникнення. На відміну від 3А, до класу 3В належать послідовності 5S рДНК *D. antarctica*, *D. cespitosa* та *D. alpina*, що вказує на його більш давнє походження.

	10	20	30	40	50	60
Consensus	CCCTTTT	TGCGTCACGCGACGACGACG	TGGCACGCTCGGGGCGTTGTATTCTTTT	TGTCG		
DeantK5.17	-----	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA5.2	-----	.....	.....	.....	.....	.....
DeantK5.16	..T.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA13.6	.....	A.....	G.....	A.....	.....	G.....
DeantA18.10	.....	.....	.....	.....	.....	T.....
DeantA18.4	.....	.....	.....	.....	.....	T.....
DeantA8.14	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA2.3	.....	.....	.....	T.....	A.....	.....
DeantA11.10	.....	C.....	T.G..A.....	.....	.....	.....
DeantA10.13	.....	.....	.....	.....	.....	.....
DeantA18.15	T.A.....	T.....	GT.....	.....	A...A...TC...	.....
DeantA9.18	T.....	.....	TG.....	.....	A...A...TC...	.....
Dealp1	T.....	.....	G.....	.....	A...A...TC...	.....
Dealp3	T.....	.....	G.....	.....	A...A...TC...	.....
Deces20	T.....	.....	G.....	.....	A...A...TCA..	.....

**Рис. 3.2.5 (початок)**

	70	80	90	100	110	120
Consensus	GCCCTCGTGTCCCAATTCCTCGTGTTCATGCAATGGT-AAAATGGGATGTTTCATGG					
DeantK5.17	.T.....			.A.....	T.....	
DeantA5.2				-.....	A...G.....	A
DeantK5.16	.....A.....			.....A.....	.....T.....	
DeantA13.6				.....A.....	.....T.....	
DeantA18.10	.....A.....	.....TC.....		.....-.....		
DeantA18.4	.....A.....	.....TC.....		.....-.....		
DeantA8.14	.....A.....			.....-.....	A...G.....	
DeantA2.3	.....A.....	.....C.....		.....-.....		A.....
DeantA11.10				.....C.....	.....-.....	G.....
DeantA10.13	.....A.....			.....-.....		
DeantA18.15	A.....A.....	.....TTAAG.....	.....C.....	.....C.....	.....-.....	C.....
DeantA9.18	A.....A.....	.....TTAAG.....	.....C.....	.....C.....	.....-.....	C.....
Dealp1	A.....A.....	.....TAAAG.....	.....C.....	.....C.....	.....-.....	C..C.....
Dealp3	A.....A.....	.....TAAAG.....	.....C.....	.....C.....	.....-.....	C.....
Deces20	A.....A.....	.....TTAAG.....	.....C.....	.....G.....	.....-.....	C.....

	130	140	150	160	170	180
Consensus	TAAAGTGGGGTGGCCATGGT-AAACTGGGGCGCGTAGGCACGAGAAGGAGCCGGATGGGG					
DeantK5.17						A.....
DeantA5.2			.....T.....			A.....
DeantK5.16			.....A.....			T.....
DeantA13.6			.....A.....			T.....
DeantA18.10			.....A.....			T.....
DeantA18.4			.....A.....			T.....
DeantA8.14		.....T.....	A.....	.....C.....		
DeantA2.3	.....C.....					A.....
DeantA11.10	.....T.....	.....G.....	.....-.....	.....T.....		TT.....
DeantA10.13			.....T.....	.....-.....	A.....	T.....
DeantA18.15	.....A.....	.....G...A.A.....			.....T.A..-..	T
DeantA9.18	.....A.....	.....C...G.A...A.....		.....T.....	.....T.A..-..	T
Dealp1	.....A.....	.....G.....	.....-.....			-..T
Dealp3	.....A.....	.....G.....	.....-.....			-..T
Deces20	.....A.....	.....G.....	.....-.....			-..T

	190	200	210
Consensus	CAAGCATAAGGCTAAATCGTGTGCATAACATGTC		
DeantK5.17			
DeantA5.2			
DeantK5.16	.....C..G...C.....	.....A.....	.....A..
DeantA13.6	.....G.A.....		.....A..
DeantA18.10	.....C.....	.....A.....	.....A..
DeantA18.4	.....C.....	.....A.....	.....A..
DeantA8.14	.....T.....		
DeantA2.3	.....AA.....		
DeantA11.10			
DeantA10.13			
DeantA18.15	.....GC.....	.....T.....	
DeantA9.18	.....GC.....	.....T.....	
Dealp1	.....GC.....		
Dealp3	.....GC.....		
Deces20	.....GC.....		

**Рис. 3.2.5 (закінчення)** Вирівнювання послідовностей IGS структурного класу 3 5S рДНК *D. antarctica*, *D. cespitosa* та *D. alpina*.



Порівняння IGS *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* з консенсусними послідовностями трьох класів 5S рДНК представників роду *Deschampsia*, показує, що їхні послідовності володіють специфічними для кожного виду особливостями (рис. 3.2.6-3.2.7). Зокрема, отримані дані свідчать, що в геномі *A. flexuosa* присутні як мінімум 2 структурні класи повторів 5S рДНК. До першого класу можна віднести клони Avfle1, Avfle4 та Avfle8, а до другого - Avfle7, Avfle9. Різниця між цими структурними класами полягає у рівні подібності послідовності IGS та у розташуванні клонів на філодендрограмі. Крім того клон Avfle8 має найбільшу довжину завдяки присутності вставки довжиною 15 нп на початку IGS. Ця вставка, імовірно, виникла як результат тандемної дуплікації суміжної ділянки IGS. На відміну від *A. flexuosa*, у *V. atropurpurea* знайдено лише один структурний клас 5S рДНК.

	10	20	30	40	50	60
Consensus	TCCTTTTTGCGTCACGCGACGACGGCGTGKACGCTT	-----	GAGCGTT	-----	GNA	
Avfle1	.....	.....	T.C.TGG.A.G.	-----	.....	.....
Avfle8	.....	.....	T.C.TGG.A.G.	-----	A..TA..TTTTGCG.C.	.....
Avfle4	.....	.....	C..G.C.TGG.A.G.	-----	.....	.....
Avfle7	.....	.....	G..T.G.TGG..G.	-----	.....	.....
Avfle9	.....	.....	G..T.G.TGG..G.	-----	.....	.....
Vaatr4	.....	C.....G.....	----	G.GA----	A..TC..-----	G.
Vaatr6	.....	C.....G.....	----	G.GA----	A..T..-----	G.
Vaatr5	.....	C.....G-----	-----	G.GA----	A..T..-----	G.
Desh_cl1	.....	T.....	A....G....	A.CGGGCCG.G.....	-----	AT.
Desh_cl2	..T.....	G.....	G..G..CG-----	.....	-----	AA.
Desh_cl3	C.....	A....G....	CG-----	G.....	-----	T.
Trspi	.....	.....	G.....	C-----	.....	AG.
Hecon	A.....	.....	G..AGC.G----	G.G.....	-----	AT.

	70	80	90	100	110	120
Consensus	AGTAA-TTTTTTGCGGCCCTCGTGC-TCGCC	-----	TTTTGGCCATGGT---			
Avfle1	.....	.....	A.A.-.....	-----	C.....G.....	---
Avfle8	.....	.....	A.A.-.....	-----	.....G.....	---
Avfle4	.....	.....	A.....	A-----	.....G.....	---
Avfle7	.....	T.....	T.....	-----	C.....G.....	---
Avfle9	.....	T.....	T.....	-----	C.....G.....	---
Vaatr4	.A..TT...CC...TG.....	AGC.G.GT-----	.....	C.GT.AAT.---		
Vaatr6	.T.TTT...C...TG.....	GC.G.GT-----	.....	C.GT.AAT.---		
Vaatr5	.A..TT...CC...TG.....	GC.A.GT-----	.....	C.GT.AAT.---		
Desh_cl1	TA.--.....	A.....	-G.....	-----	G..G.....	AAA
Desh_cl2	TT..T-.....	.....	-C.....	-----	G.....	AAA
Desh_cl3	TTC---...G.....	.....	-..C..AATCCCTCGTG..	CAT..A....	AAA	
Trspi	T-----	G.....	.....	-----	G..C.....	---
Hecon	T-----	A.....	.....	-----	C.....C.....	---

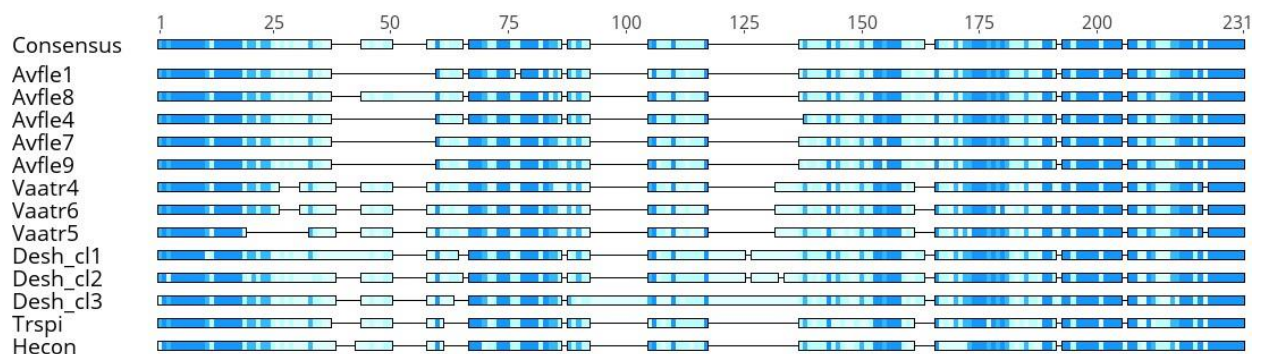
Рис. 3.2.6 (початок)



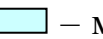

	130	140	150	160	170	180
Consensus	-----AAAT	TGGGGT	TGTCAT	GGTAAAT	TGGG--	GCGSGTAGGCACGAG
Avfle1	-----C.....	T.....	C.....	C..GT..	AG.....	
Avfle8	-----C.....	T.....	C.....	C..GT..	AG.....	
Avfle4	-----A.....	T.....	C.....	C..GT..	TAG.....	
Avfle7	-----G..G..T.....	G..G..C.....	C..GT..	T.G.....		
Avfle9	-----G..G..T.....	G..G..C.....	C..GT..	T.G.....		
Vaatr4	-----CGGTG..C..C.A.A.G.....	A.....	A.....	----	C.C.....	
Vaatr6	-----CGGTG..C..C.A.A.G.....	A.....	A.....	----	C.C.....G.	
Vaatr5	-----CGGTG.....C..TA.G.....	A.....	A.....	----	C.C.C.....	
Desh_cl1	ATGGG-TGGTCATGGT.....GC.....	A.....	--	C.....		
Desh_cl2	TAGGA-TGGGTG-GTA..G.G.....GC.....	A.....	--	C.....		
Desh_cl3	ATGGGATGTTTCATGGT...G.....GC.....	C.....	--	C.....		
Trspi	-----A...TT.T.TG.....G.C----	T.T.....	A...			
Hecon	-----T.....C.----	GTGCAT.....				

	190	200	210	220	230
Consensus	AAAGAGCTGGA-GGGGCAAGCATAA-GGGAAAACGGCGTGCATAACATGTC				
Avfle1	.....-.....G.....-.....C.....				
Avfle8	.....-.....G.....-.....C.....				
Avfle4	.....-.....G.....-.....C.....				
Avfle7	.....-.....-.....T.....				
Avfle9	.....-.....-.....T.....				
Vaatr4	.T.A.TTC..GA..A.....-.....G.-.....				
Vaatr6	GT.A.TTC..GA..A.....-.....G.-.....				
Vaatr5	.T.A.TTC..GA..A.....-.....G.-.....				
Desh_cl1	..G...C...-.....G...-..CC..CTC.....C.....				
Desh_cl2	..G...C...-.....-..CC..GTC.....A.....				
Desh_cl3	..G...C...T.....-..CT..TC.T.....				
Trspi	..T.G.....-.....G...-..TG.G.....G.....				
Hecon	..T..G...-.....G..G.....A.....G.....				

**Рис. 3.2.6 (закінчення)** Вирівнювання послідовностей IGS *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* з консенсусними послідовностями трьох основних класів 5S рДНК видів роду *Deschampsia*. Відтінками фіолетового позначені класи *A. flexuosa*.



**Рис. 3.2.7** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* з консенсусними послідовностями трьох основних класів 5S рДНК видів роду *Deschampsia*. Градацією відтінків блакитного показано рівень гомології між окремими ділянками:  – менше 60%,  – від 60 до 80%,  – від 80 до 100%,  – 100%.

Послідовності IGS 5S рДНК *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* на філодендрограмі розташовуються окремо від представників роду *Deschampsia*. Більше того, *A. flexuosa* утворює спільну групу з *H. convolutum* та *T. spicatum* (рис.3.2.2). На загал, ці дані підтверджують точку зору, що цей вид не належить до роду *Deschampsia* і, відповідно, має бути виділений у монотипний рід *Avenella*. Аналогічно, ізольоване положення *V. atropurpurea* свідчить, що цей вид також слід виключити із складу роду *Deschampsia* і віднести до роду *Vahlodea*.

Нагадаємо, що таксономічний статус *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* є предметом дискусії протягом двох століть. Вид *A. flexuosa* згадується під назвою *Aira flexuosa* L. ще у першому виданні *Species Plantarum* (Linnaeus, 1753). У першій половині 19 ст., з огляду на морфологічну подібність, щучник звивистий було включено до роду *Deschampsia* P. Beauv. (Palisot de Beauvois, 1812) під назвою *A. flexuosa* (L.) Trin., 1836. Ця назва широко використовується до сьогодні у багатьох каталогах та флорах, хоча деякі ботаніки пропонували виділити щучник звивистий у окремий одновидовий рід *Avenella* (*A. flexuosa* (L.) Drejer, 1838) або *Lerchenfeldia* (*L. flexuosa* (L.) Schur, 1866) (Chiapella, 2007; Chiapella & Zuloaga, 2010). Аналогічно, *V. atropurpurea* також має кілька синонімічних назв: *Aira magellanica* Hook. f. або *D. atropurpurea*.

Пізніше, спираючись на дослідження морфології та анатомії листків, коренів та колосків, а також будови хромосом Albers вважав, що щучник звивистий та вахлодея пурпурна мають бути перенесені у роди *Avenella* та *Vahlodea*, відповідно (Albers, 1972a, 1972b, 1980). Проте, ця точка зору не була визнана більшістю ботаніків.

На хромосомному рівні *A. flexuosa* та *V. atropurpurea*, які мають хромосомне число  $x = 14$  суттєво відрізняються від *D. antarctica*, *D. cespitosa*, *D. danthonioides*, *D. elongata*, *D. parvula* та *D. sukatschewii*, у яких  $x = 13$ . З огляду на те, що переважна більшість споріднених видів секції *Roeae* мають  $x = 7$ , можна вважати, що в еволюції родів *Avenella*, *Deschampsia* та *Vahlodea*



відбулось подвоєння набору хромосом, яке у роді *Deschampsia* (на відміну від *Avenella* та *Vahlodea*) супроводжувалось втратою одної хромосомної пари (Cardone et al., 2009; Parnikoza et al., 2011). Останнім часом специфіка будови хромосом *Deschampsia* була також підтверджена методами молекулярної цитогенетики, які виявили суттєву різницю між *A. flexuosa* та кількома представниками роду *Deschampsia* (Amosova et al., 2017).

З появою молекулярних маркерів для прояснення таксономічного статусу *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* було використано послідовності пластидного гену *trnL* та ядерної ділянки ITS1-2 (Garcia-Suarez et al., 1997; Souto et al., 2006; Chiapella, 2007; Chiapella & Zuloaga, 2010). Отримані результати показали, що щучник звивистий та вахлодея пурпурна мають бути виключені з роду *Deschampsia* і виділені в окремі роди. Водночас автори підкреслюють, що порівняння послідовностей ITS1-2 дозволяє отримати лише перше уявлення про філогенію роду *Deschampsia* та споріднених таксонів, оскільки ця ділянка геному не володіє достатньою роздільною здатністю (Chiapella, 2007). З огляду на широке розповсюдження сітчастої еволюції у трибі Роеае, видається очевидним, що для прояснення філогенії та дослідження можливого гібридного походження ряду таксонів необхідно залучити більше ядерних маркерів (Chiapella, 2007; Soreng et al., 2007). Отже, проведений нами аналіз будови 5S рДНК доповнює існуючі уявлення про таксономічний статус *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* і ще раз засвідчує необхідність виділення цих двох видів у окремі роди.

### **ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.2.**

На загал отримані результати свідчать, що у геномі представників роду *Deschampsia* присутні 3 структурні класи 5S рДНК, що відрізняються між собою нуклеотидною послідовністю. В межах одного структурного класу 5S рДНК рівень подібності IGS у досліджених видів не менший, ніж 82,2%. В той же час, між класами рівень подібності є значно меншим та коливається від 68,3 до 83,0%.

В межах 1 класу підклас 1А виник відносно нещодавно, вже після дивергенції *D. antarctica* від решта видів, тоді як підклас 1В – дещо раніше. Група 1С є базовою по відношенню до підкласів 1А та 1В. Тобто, отримані дані свідчать, що підклас 1С є еволюційно найстаршим, або предковим. Клас 2 утворився до дивергенції двох видів *Deschampsia*: *D. antarctica* та *D. cespitosa*. Клас 3 слід розділити на підкласи 3А та 3В. При цьому, клас 3А видається специфічним лише для *D. antarctica*, що свідчить про його відносно нещодавнє виникнення. На відміну від 3А, до класу 3В належать послідовності 5S рДНК *D. antarctica*, *D. cespitosa* та *D. alpina*, що вказує на його більш давнє походження.

Організація 5S рДНК *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* відрізняється від такої у представників роду *Deschampsia*. На загал, ці дані підтверджують точку зору, що види *A. flexuosa* та *V. atropurpurea* не належить до роду *Deschampsia* і, відповідно, мають бути виділені у монотипні роди *Avenella* та *Vahlodea*.

Більша частина результатів цих досліджень опубліковані у роботах Ishchenko et.al. 2020a, 2020c, 2020d).

### 3.3. МОЛЕКУЛЯРНЕ РІЗНОМАНІТТЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ У ДОСЛІДЖЕННІ ФІЛОГЕНІЇ ТРИБИ РОЕАЕ

#### 3.3.1. СТРУКТУРА ТА ПОЛІМОРФІЗМ 5S рДНК В МЕЖАХ ТРИБИ РОЕАЕ

Для того, щоб повніше охарактеризувати структуру та поліморфізм 5S рДНК, прослідкувати молекулярну еволюцію цієї ділянки у більш широкому таксономічному контексті, зокрема – в межах триби Роеае, та отримати уявлення про філогенетичні відносини у цій групі рослин, нами було клоновано та сиквеновано 5S рДНК *Briza media* L., *Calamagrostis epigeios* (L.) Roth., *Cynosurus cristatus* L., *Dactylis glomerata* L., *Festuca carpatica* F. Dietr., *Festuca fallax* Thuill., *Festuca ovina* L., *Lolium perenne* L., *Phleum pratense* L., *Poa pratensis* L., *Sesleria heufleriana* Schur, *Trisetum flavescens* (L.) P.Beauv. (характеристика клонів наведена в табл. 3.3.1), які було порівняно з описаними у попередніх розділах IGS *Avenella flexuosa*, *Vahlodea atropurpurea* та видами роду *Deschampsia*. Також для порівняння було використано послідовності 5S рДНК інших видів триби Роеае, які наявні у БД Генбанк: *Avena clauda* Durieu, *Avena macrostachya* Balansa ex Coss. et Durieu, *Avena sativa* L., *Helictochloa pratensis* (L.) Romero Zarco, *Helictotrichon aetolicum* (Rech.f.) Holub, *Helictotrichon bromoides* (Gouan) C.E.Hubb, *Helictotrichon convolutum* (C.Presl) Henrard, *Helictotrichon sedenense* (DC.) Holub., *Lagurus ovatus* L., *Phalaris coeruleascens* Desf., *Tricholemma jahandiezii* Litard. ex Jahand. & Maire, *Trisetum spicatum* L.

Таблиця 3.3.1 (початок)

Характеристика клонів представників триби Pooae

Назва виду	Назва клону	Довжина IGS, нп	Вміст GC пар IGS, %
<i>Briza media</i>	Brmed3	183	48,09
	Brmed5	186	46,24
<i>Calamagrostis epigeios</i>	Caepi5	188	56,91
	Caepi9	188	55,85
<i>Cynosurus cristatus</i>	Cycr10	152	51,32
<i>Dactylis glomerata</i>	Daglo1.1	140	52,86
	Daglo1.2	140	52,14
	Daglo2.2	141	51,06
	Daglo2.3	140	52,86
	Daglo3.3.1	139	51,80
	Daglo3.3.2	138	50,72
	Daglo3.6.1	140	52,14
	Daglo3.6.2	139	53,24
	Daglo4.1	178	52,81
	Daglo4.2	170	51,18
	Daglo5.2	140	52,14
	Daglo5.3	140	52,14
	Daglo5.4	140	52,14
<i>Festuca carpatica</i>	Fecar2	197	52,79
	Fecar5	197	52,28
<i>Festuca fallax</i>	Fefal5	197	54,31
	Fefal9	198	52,53
<i>Festuca ovina</i>	Feovi13	197	48,73
	Feovi23	197	49,75
<i>Lolium perenne</i>	Loper4	189	47,62
	Lope7	188	46,81

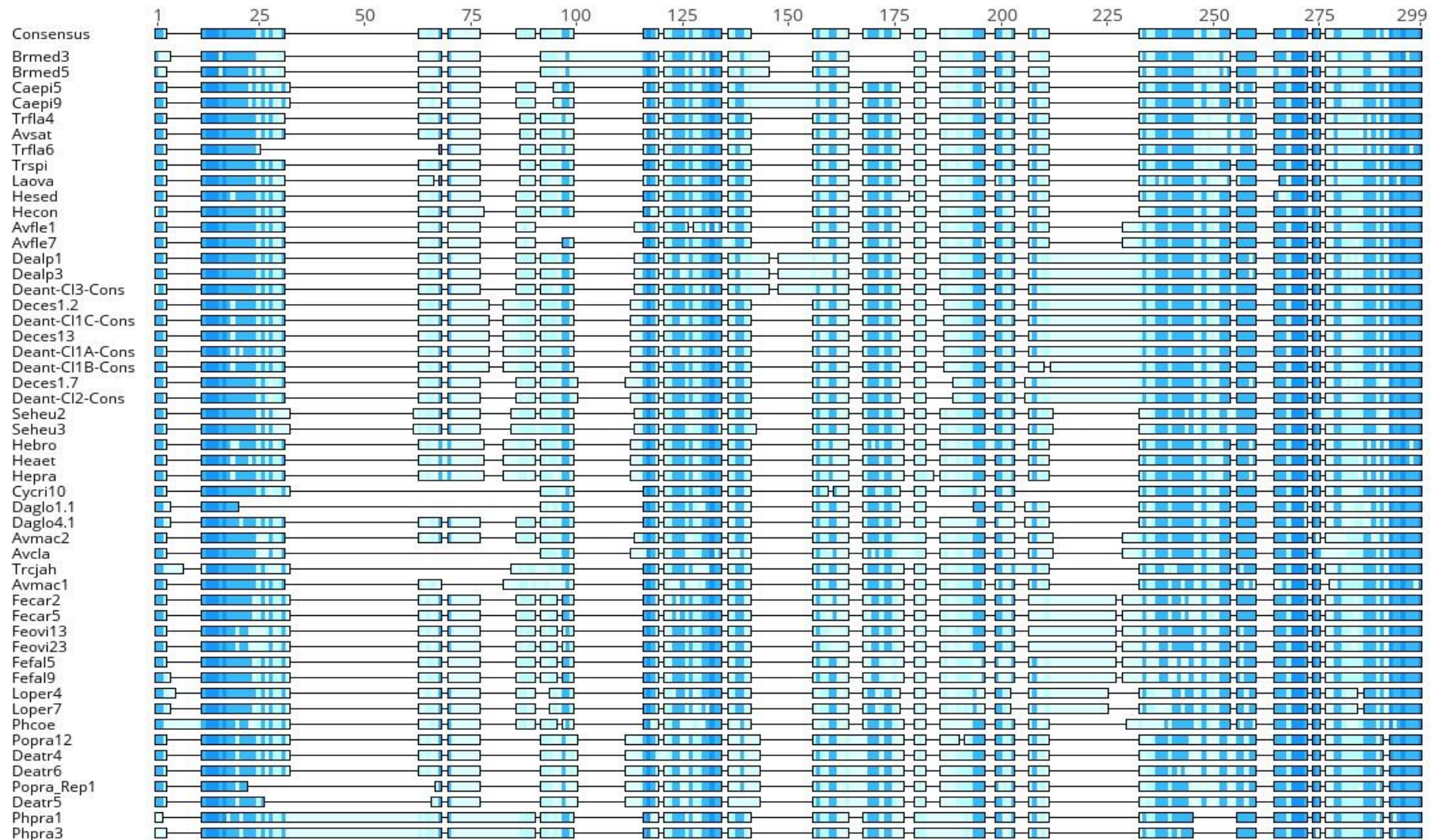
Таблиця 3.3.1. (закінчення)

<i>Phleum pratense</i>	Phpra 1	208	52,88
	Phpra 3	209	53,11
<i>Poa pratensis</i>	Popra12	182	53,30
	Popra_Rep1	185	52,97
	Popra_Rep2	183	53,55
	Popra_Rep3	185	52,97
<i>Sesleria heufleriana</i>	Seheu2	185	53,51
	Seheu3	186	53,23
<i>Trisetum flavescens</i>	Trfla4	176	51,70
	Trfla6	165	48,48

Довжина IGS та вміст GC-пар у досліджуваних видів коливається від 138 до 209 нп та від 46,24 до 56,91%, відповідно.

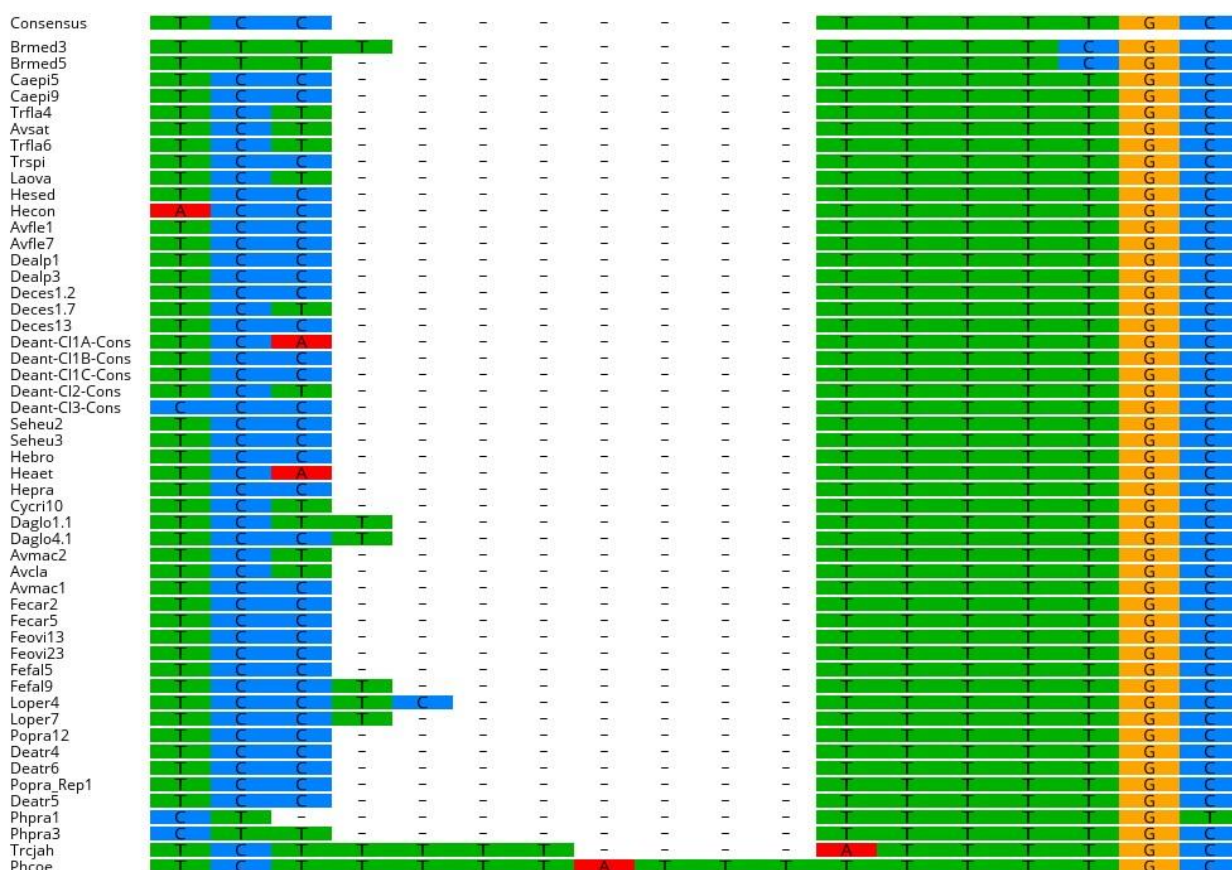
Встановлено, що рівень подібності IGS видів, які належать до різних родів триби Poeae, переважно лежить у межах 37,9-83,7%. Виключення становлять дві пари видів, *Avena sativa* та *Trisetum flavescens* – 96,0%, *Poa pratensis* та *Vahlodea atropurpurea* – 86,9-98,4%. Між видами триби Poeae, які належать до одного роду рівень подібності IGS складає 61,0-97,5 %.

Порівняння послідовностей IGS кількох видів/родів показало, що вони різняться не тільки замінами нуклеотидів, але й кількома інделами (рис. 3.3.1). Також вдалось виявити відносно консервативні елементи, які вірогідно задіяні у транскрипції 5S рДНК. Зокрема, на початку IGS знаходиться оліго-dT мотив, який імовірно бере участь у термінації транскрипції. Консенсусна послідовність цієї ділянки – TCCTTTTGC, але у різних видів, особливо у *Phalaris coerulescens* та *Tricholemma jahandiezii*, ця ділянка може дещо відрізнятись (рис 3.3.2).



**Рис. 3.3.1** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК представників триби Роєае.  – менше 60%,  – від 60 до 80%,  – від 80 до 100%,  – 100%.





**Рис. 3.3.2** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей ділянки термінації транскрипції 5S рДНК представників триби Pooae.

Як вже було сказано у розділі 3.1, у *Arabidopsis thaliana* до елементів зовнішнього промотора Pol III належать AT-багатий мотив ТАТАТА, динуклеотид GC та нуклеотид C, які розташовані, відповідно, на відстані –28, –13 та –1 перед початком кодувальної ділянки (Cloix et al., 2000; Simon et al., 2018). У всіх порівнюваних видів триби Pooae у позиції –29 виявлено консервативний мотив АТАА, окрім *Cynosurus cristatus* та *Dactylis glomerata*, у яких у мотиві виявлено одну трансверсію: АТАТ (рис.3.3.3). Динуклеотид GC знайдений у всіх досліджуваних видів, проте у різних позиціях або двічі. Наприклад, для *Trisetum spicatum*, *Lagurus ovatus*, *Helictotrichon sedenense*, *Avenella flexuosa*, *Deschampsia cespitosa*, *Deschampsia antarctica*, *Sesleria heufleriana*, *Dactylis glomerata*, *Avena macrostachya*, *Festuca fallax*, знайдено GC у позиціях –16 та –12 від початку кодувальної ділянки. Для

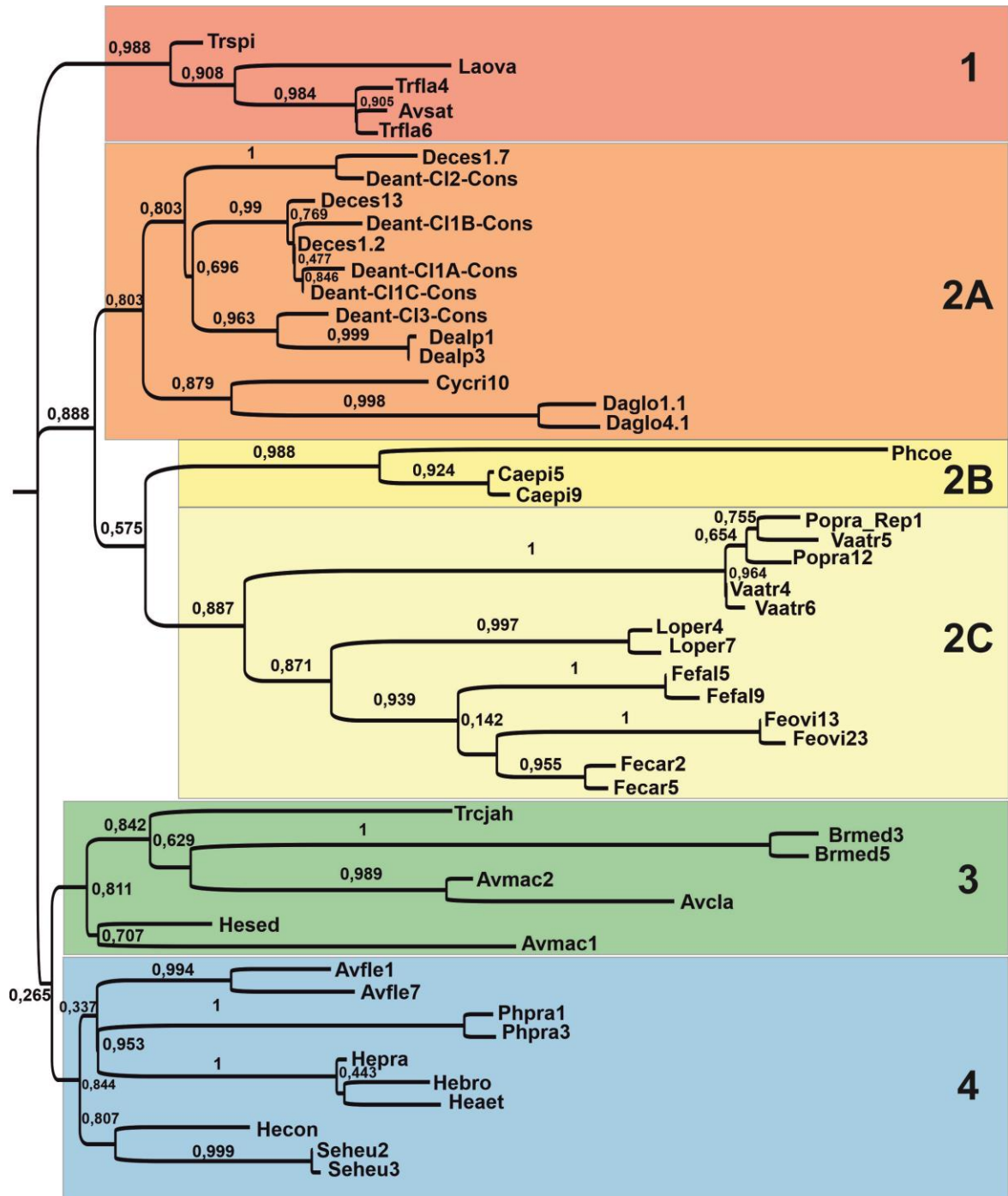
решти видів ділянка зустрічається один раз у різних позиціях: -12, -14 чи -16 (рис.3.3.3). Нуклеотид С знайдено в позиції -1 у всіх досліджуваних видів.

	-29	-16	-12	-1
Consensus	ATAA	-GG-GAAAACGGCGT	GCAKAACATGTC	
Brmed3	.....	-AGC.....	TGCT.....	C.....
Brmed5	.....	-AGC.....	TGCT.....	
Caepi5	.....	-.....	A.T.....	T.....
Caepi9	.....	-.....	A.T.....	T.....
Trfla4	.....	-TG.T.....	A.G.....	G.....
Avsat	.....	-TG.T.....	A.A.....	A.....
Trfla6	.....	-TG.T.....	A.A.....	G.....A.....
Trspi	.....	-TG.G.....		G.....
Laova	.....	-AG.G.....		G..T.....
Hesed	.....	-..G.....		C.....
Hecon	.....	G..-G.....	A.....	G.....
Avfle1	.....	-..-.....	C.....	T.....
Avfle7	.....	-..-.....	T.....	T.....
Dealp1	.....	-..-CT..G.C.T.....		T.....
Dealp3	.....	-..-CT..G.C.T.....		T.....
Deces1.2	.....	-..-CC..CTC.....		C.....
Deces1.7	.....	-..-CT..G.C.T.....		TT.....
Deces13	.....	-..-CC..CTC.....		C.....
Deant-C11A-Cons	.....	-..-CC..CTC.....		C.....
Deant-C11B-Cons	.....	-..-CC..CTC.....		C.....
Deant-C11C-Cons	.....	-..-CC..CTC.....		C.....
Deant-C12-Cons	.....	-..-CC..GTC.....		A.....
Deant-C13-Cons	.....	-..-CT..TC.T.....		T.....
Seheu2	.....	-..T.....		GG.....
Seheu3	.....	-..-.....		GA.....
Hebro	.....	-..-.....	G.C.A.G.....	A.....
Heaet	.....	-..-.....	G.C.A.G.....	T.....
Hepra	.....	-..-.....	G.C.A.G.....	
Cycr110	.....	T-..-TG..TTTA.....		T.....
Daglo1.1	.....	T-..-T...CTC..TC.....		G.....
Daglo4.1	.....	T-..-T...CTC..TC.....		G.....
Avmac2	.....	-..T-ACCCC.....	T..G.....	
Avcla	.....	-..CATCTC.....		C.....
Avmac1	.....	-..-GG.....		G.....A.....
Fecar2	.....	-..-C.....	A.....	C.....
Fecar5	.....	-..-A.....	A.....	C.....
Feovi13	.....	-..-C.....	CA.....	C.....
Feovi23	.....	-..-C.....	CA.....	C.....
Fefal5	.....	-..-C.....		C.....
Fefal9	.....	-..-C.....		C.....
Loper4	.....	-..-.....	T.A-.....	T.....
Loper7	.....	-..-.....	T.A-.....	T.....
Popra12	.....	-..-.....		G.....
Deatr4	.....	-..-.....		G.....
Deatr6	.....	-..-.....		G.....
Popra_Rep1	.....	-..-.....	A.....	G.....
Deatr5	.....	-..-.....		G.....
Phpra1	.....	-..-.....		G.-T.....
Phpra3	.....	-..A-.....		G.-T.....
Trcjah	.....	-..-..G..A.....		G.....
Phcoe	.....	-..-T.....	AAT.....	T.C.....

**Рис. 3.3.3** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей ділянки ініціації транскрипції 5S рДНК представників триби Pseae.



На основі вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS була побудована філодендрограма, на якій досліджувані види розподіляються між чотирма основними кладами, які мають високу статистичну підтримку (рис. 3.3.4).



**Рис. 3.3.4** Філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК представників триби Roeae методом максимальної правдоподібності з використанням моделі заміщення Джукса – Кантора. Цифри біля вузлів відповідають статистичній підтримці тесту Шимодайра-Хасегави, яка розрахована в частках одиниці.

### 3.3.2 ОРГАНІЗАЦІЯ IGS 5S рДНК ДЛЯ ОКРЕМИХ КЛАД ТРИБИ РОЕАЕ

Клада 1 включає *Lagurus ovatus*, *Trisetum spicatum*, *Trisetum flavescens* та *Avena sativa*. Таке групування відповідає таксономії, побудованої за хлоропластними генами, де ці роди відносять до підтриби Aveninae (Soreng et al., 2015). Варто також зазначити, що *Avena sativa* знаходиться окремо і не групується з іншими представниками цього роду.

Клада 2 підрозділяється на підклади 2А, 2В та 2С, які мають високу статистичну підтримку. Підклади 2В та 2С групуються разом, але лише з низькою підтримкою. Підклада 2А включає *Cynosurus cristatus*, *Dactylis glomerata* та види роду *Deschampsia*, а підклада 2В – *Calamagrostis epigeios* та *Phalaris coerulescens*. До підклади 2С відноситься *Poa pratensis*, *Vahlodea atropurpurea* та група *Lolium/Festuca*.

При детальному порівнянні послідовностей видів підклади 2А (рис. 3.3.5). показано, що більшість зразків *Dactylis glomerata* є дуже подібними – 79,3-100%, і від решта відрізняється лише одна популяція з Австрії (Daglo4), для якої характерний довший варіант IGS 5S рДНК. Таким чином, можна стверджувати, що для *Dactylis glomerata* також характерні два класи 5S рДНК, які відрізняються своєю довжиною. Проте, ці класи знайдені у різних популяціях виду і не можна стверджувати, що вони можуть бути присутні одночасно в гаплоїдному геномі (одному наборі хромосом). Можливо, кожен клас характерний для окремої популяції. Також варто зауважити, що в IGS трьох структурних класів 5S рДНК роду *Deschampsia*, *Cynosurus cristatus* (Cucri10) та австрійської популяції *Dactylis glomerata* (Daglo4) наявні три гомологічні фрагменти ДНК, які відсутні у інших досліджених зразках *Dactylis glomerata*. Цей результат свідчить, що ці ділянки IGS були характерні для 5S рДНК спільного предка цих трьох родів, і були втрачені внаслідок делеції протягом внутрішньовидової дивергенції популяцій *Dactylis glomerata*.

```

          10      20      30      40      50      60
-----+-----+-----+-----+-----+
Majority  TCTTTTTT-----GCGTCT-----AATATT-----
Daglo1.1.1 .....
Daglo1.2 .....
Daglo2.2 .....-T.....
Daglo2.3 .....
Daglo3.6.1 .....
Daglo3.6.2 .....
Daglo3.3.1 .....
Daglo3.3.2 .....
Daglo5.2 ...C.....
Daglo5.3 .....
Daglo5.4 .....
Daglo4.1 ..C.....GCGTAACGCGACGACGATGTGGC...C...GGGGCGT.....
Daglo4.2 ..C.....GCGTAACGCGACGACGATGTGGC...CT...GGGGTGT.....
Cycr10    .....-GCGTCACGCGATGAC-----CG...AGTTT-----
Desh_clas1 ..C.....-GCTTCACGCGACGACGACGTGGCA...ATCGGGCCGGGGCG...AT--ATAT
Desh_clas2 .....-GCGTCACGCGAGGACGGCGTGGCA----GGCTCGG.GCG...AA--ATTT
Desh_clas3 C.C.....-GCGTCACGCGACGACGACGTGGCA...CTCGGGGCGTTG...CTTTTGTGC

          70      80      90      100     110     120
-----+-----+-----+-----+-----+
Majority  ---TTTTTGC GGCCCGCCGTGGAC--GTATTTTGGGGGCGGTAAAATGG-----G
Daglo1.1.1 ---.....
Daglo1.2 ---.C.....
Daglo2.2 ---...A.....
Daglo2.3 ---.....
Daglo3.6.1 ---.....
Daglo3.6.2 ---.....
Daglo3.3.1 ---.....
Daglo3.3.2 ---.....
Daglo5.2 ---...T.....
Daglo5.3 ---.....
Daglo5.4 ---.....
Daglo4.1 ---.....AT.....T.....
Daglo4.2 ---.....AT...A...T...A...T.....
Cycr10    ---.....T...C--TC...C...T.CC.T...C...A...GGTGGCCATG-
Desh_clas1 ATT.....-...A...CT...CG--CC...G...CAT.....G-TGGTCATG.
Desh_clas2 ATT.....CT...CC--CC...G...CCAT.....TA...A-TGG--GTG.
Desh_clas3 GGCCCC.C.T.CT...C.AA.TCC.TC...G...CAT.CAAT.....GATGTTTCATG.

          130     140     150     160     170     180
-----+-----+-----+-----+-----+
Majority  -----GG-----TAAGC-GTGGTGC GTGGCAGAGAAGGAGCTGGA-GGGG
Daglo1.1.1 -----.....
Daglo1.2 -----.....A.....
Daglo2.2 -----.....
Daglo2.3 -----.....G-.....
Daglo3.6.1 -----.....
Daglo3.6.2 -----.....
Daglo3.3.1 -----.....
Daglo3.3.2 -----.....
Daglo5.2 -----.....
Daglo5.3 -----.....T.....
Daglo5.4 -----.....T.....
Daglo4.1 TAAAATGGA.....T.T.....
Daglo4.2 -----.....T.....
Cycr10    -----TGAA.GTG-----AT...C.....
Desh_clas1 TAAATGGA..-TGGCCATGG...ATA.G...C...A.....C.....
Desh_clas2 TAAAGTGG..GTGGCCATGG...ATA.G...C...A.....C.....
Desh_clas3 TAAAGTGG..-TGGCCATGG...A.T.G...C...A.....C...T.....

```

Рис. 3.3.5 (початок)

	190	200	210
	-----+	-----+	-----+
Majority	CAAGCATATGGTAAACTCGCTCGCAGAACATGTC		
Daglo.1.1	.....		
Daglo1.2	.....A..		
Daglo2.2	.....A..		
Daglo2.3	.....A..		
Daglo3.6.1	.....C....		
Daglo3.6.2	.....C....		
Daglo3.3.1	A.....	A.....	A.....
Daglo3.3.2	A.....	A.....	A.....
Daglo5.2	.....A..		
Daglo5.3	.....		
Daglo5.4	.....		
Daglo4.1	.....		
Daglo4.2	.....A..		
Cycr110	.....G..T..TA..GT...T.....		
Desh_clas1	...G...A..CC.....	GT...C.....	
Desh_clas2	.....A..CC..G....	GT...A.....	
Desh_clas3	.....A..CT..A....	TGT...T.....	

**Рис. 3.3.5 (закінчення)** Структурна організація IGS 5S рДНК досліджуваних видів підклади 2А. Червоним кольором позначено фрагменти IGS клонів Daglo4, які відсутні у 5S рДНК інших популяцій *Dactylis glomerata*.

Клада 2В, яка включає тільки два види *Calamagrostis epigeios* та *Phalaris coeruleascens*, потребує ще більшого включення інших видів з цих родів для детальнішого дослідження.

В межах класу 2С можна виділити дві групи з високою підтримкою.

Група, яка об'єднує види *Festuca* L. (костриця) та *Lolium* L. (пажитниця) є особливо цікавою і важливою. Представники роду *Festuca* розповсюджені по всьому світу та адаптовані до різноманітних умов середовища (Clayton & Renvoize, 1986; Catalán et al., 2004, Yamada, 2011; Bednarska & Brazauskas 2017). Серед видів роду широко представлені як диплоїдні, так і поліплоїдні форми, походження яких вимагає прояснення (Humphreys et al., 1995; Šmarda & Stančík, 2006; Kopecký et al., 2006, 2008; Ferreira et al., 2019; Hand et al., 2010, 2013). Деякі види роду *Festuca* (*F. pratensis*, *F. arundinacea*) та *Lolium* (*L. multiflorum* Lam. та *L. perenne* L.) є основними кормовими травами, які широко культивуються в усьому світі (Thomas et al., 2003; Kopecký et al., 2008). На сьогодні, завдяки великому практичному значенню, ці види *Festuca*

та *Lolium* є найкраще дослідженими серед всіх незернових злаків. Проте, генетичний потенціал чисельних видів *Festuca* все ще залишається недостатньо використаним, хоча деякі з них вважаються перспективними для селекції (Thomas & Humphreys 1991; Yamada, 2011). Подальший прогрес у цьому питанні потребує кращих знань про генетичну спорідненість видів.

Протягом останніх трьох століть таксономія роду *Festuca* залишається предметом дискусій. Linnaeus (1753) наводить лише сім видів роду *Festuca*, п'ять з яких було пізніше перенесено до роду *Bromus*. Пізніше було описано багато нових видів, і наприкінці 19 ст. Hackel (1882) запропонував підрозділити рід *Festuca* на шість підвидів. З того часу таксономія роду *Festuca* зазнавала чисельних ревізій. Пізніше, використовуючи порівняння ділянок *trnL-F* хпДНК та ITS1-2 було отримано нові уявлення про філогенію підтриби Loliinae (Gaut et al., 2000; Catalán et al., 2004, 2007; Torrecilla & Catalán, 2002; Cheng et al., 2016; Inda et al., 2014). Зокрема встановлено, що цю підтрибу можна розділити на дві основні групи: (i) «широколисті» Костриці, та (ii) «дрібнолисті» Костриці, до яких належать більшість видів роду *Festuca*. Також було виявлено близьку спорідненість роду *Lolium* та «широколистих» видів *Festuca*, які належать до підроду *Schedonorus*.

Аналіз отриманих нами послідовностей IGS 5S рДНК *Festuca ovina* (підрід *Festuca*), *Festuca carpatica* (підрід *Leucopoa*), *Festuca fallax* (підрід *Festuca*) та *Lolium perenne* показав, що довжина IGS для всіх клонів *Festuca* становить 197-198 нп, а у *Lolium perenne* ця ділянка дещо коротша, 188-189 нп. Як зазначалося вище, такі довжини також характерні для інших злакових. Між трьома видами *Festuca* подібність IGS становить від 76,3 до 81,7%, тоді як при порівнянні з *Lolium perenne* цей показник коливається від 61,8 до 69,5%.

На отриманій нами дендрограмі клони 5S рДНК *Festuca ovina*, *Festuca carpatica*, *Festuca fallax* та *Lolium perenne* належать до однієї групи з високою статистичною підтримкою. При цьому три досліджені види Костриць утворюють окрему підгрупу, тоді як *Lolium perenne* є сестринським

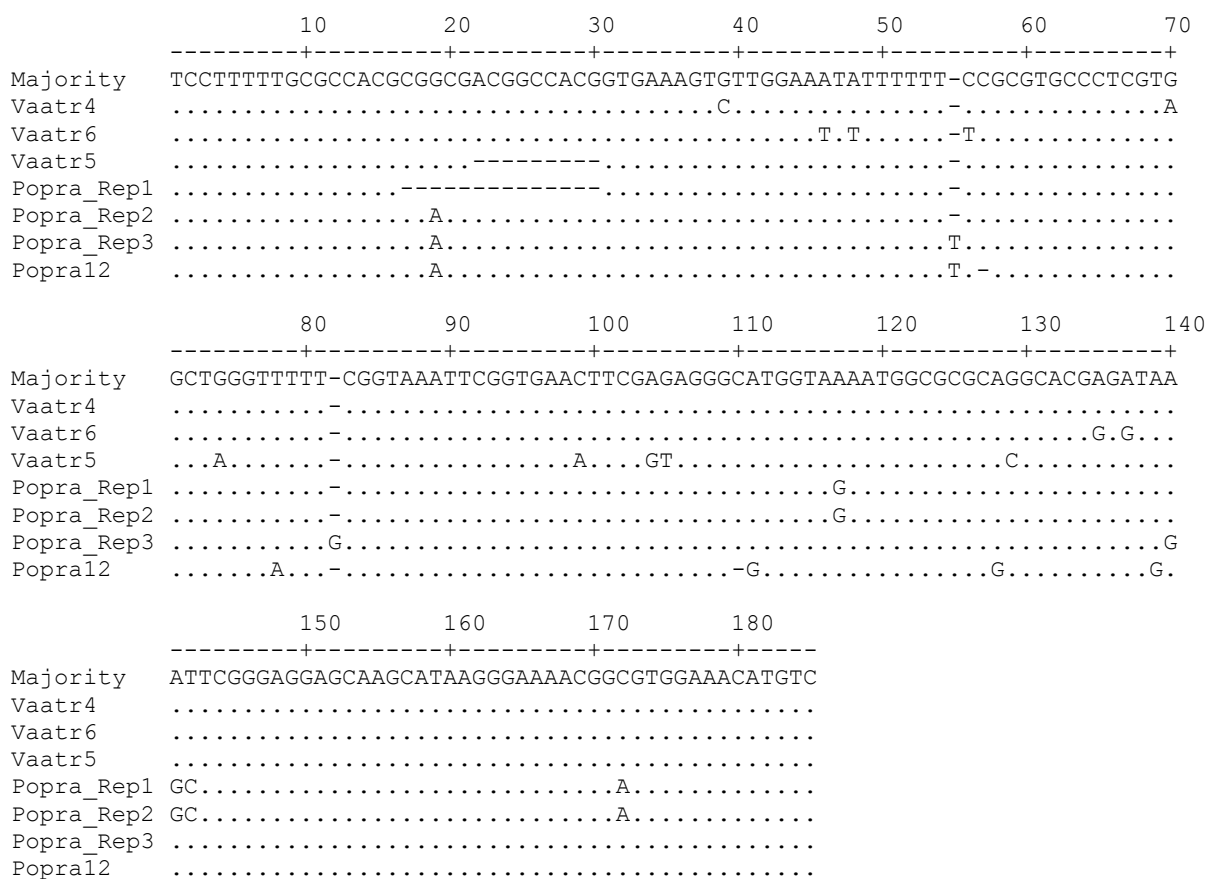
видом по відношенню до неї. При порівнянні нуклеотидних послідовностей цих видів (рис. 3.3.6) можна стверджувати, що вони високоподібні та для різних родів характерні однакові особливості і точкові мутації. Така картина цілком узгоджується з думкою про високу спорідненість родів *Festuca* та *Lolium*.

	10	20	30	40	50	60	70
Majority	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+						
Majority	TCCT-TTTT-GCGT	CACACGGCGAC	CGTCATGGTGA	ATTCGGGGCG	GATAATTTTTT	TACGGCCCTCG	TG
Fecar2	....-....-.....	C..T...G.....	.....	.....	.....	ACT.C.....	.....
Fecar5	....-....-.....	C.....G.....	.....	.....	A.....	ACT.T.....	.....
Feovi13	....-....-.....	C..TTTTA.A.....	C.....	A.T...G..T.....	C.....	.....	.....
Feovi23	....-....-.....	C..TTTTA.A.....	C..C.....	A.C..G..T.....	C.....	.....	.....
Fefal5	....-....-.....	.....	G..C.....	C.....	.....	.....	.....
Fefal9	....-....T.....	.....	G..A.....	C.....	.....	.....	.....
Loper7	....-....T.....	.....	AT..G.....	G.TA..A.....	-.....	G..G.A..A...	.....
Loper4	....C...T.....	G.....	AT.....	G.TA..A.....	-.....	GT..G.A.....	.....
	80	90	100	110	120	130	140
Majority	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+						
Majority	CTCGGCTTTTGGT	GATCGTAAACGG	TGGTGCGCATGG	TAAAGTGGCATGG	GCGATGGGATGG	TAAATCGTCCGT	
Fecar2	.....CC...G.....	.....	.....	.....	T.....	.....	.....
Fecar5	.....CC...G.....	.....	.....	.....	C.....	.....	.....
Feovi13	.....CT.A.....	.....	TG.....	CCTCC.C...C.....	.....	.....	.....
Feovi23	.....CTAA.....	.....	TG.....	CCTCC.C...C.....	.....	.....	.....
Fefal5	.C..C.....A.G...TG.....	.....	TT..CG.....	C.....	.....	TC...	.....
Fefal9	.C..C.....A.G...TG.....	.....	TT..CG.....	T.....	.....	TC.A..	.....
Loper7	.....A.....-GG...A.....	G.A.AA...A..-...A.....	C.....	-----AA.	.....	.....	.....
Loper4	.....A.....-GG.....	G...AA...A..-...A.....	C.....	-----AA.	.....	.....	.....
	150	160	170	180	190		
Majority	-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+						
Majority	TTTGCAAGACAAG	TAGCCGGAGGGG	CAAGCATAAGG	CAAAACGACGTG	CACAACATGTC		
Fecar2	.....T.C...G.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Fecar5	.....T.C.....	.....	A.....	.....	.....	.....	.....
Feovi13	..A....G....CA....C.....	.....	C.....	.....	.....	.....	.....
Feovi23	..A....G....CA....C.....	.....	C.....	.....	.....	.....	.....
Fefal5	..A...C..G..C.....	C.....	G.....	.....	.....	.....	.....
Fefal9	..A...C..G..C.....	C.....	G.....	.....	.....	.....	.....
Loper7	AGA...-....AG...G....A.....	G....T..-....T.....	.....	.....	.....	.....	.....
Loper4	AGA...-....AG...G....A.....	G....T..-....T.....	.....	.....	.....	.....	.....

**Рис. 3.3.6** Структурна організація IGS 5S рДНК *Festuca ovina*, *Festuca carpatica*, *Festuca fallax* та *Lolium perenne*.

До іншої групи клади 2С можна віднести *Poa pratensis* та *Vahlodea atropurpurea*. Для *Poa pratensis* нами було сиквеновано 1 клон та ідентифіковано 3 послідовності 5S рДНК у міжнародній базі даних SRA (sequence read archive). Вирівнювання послідовностей IGS *Poa pratensis* показало високу подібність між ними – від 87,6 до 97%.

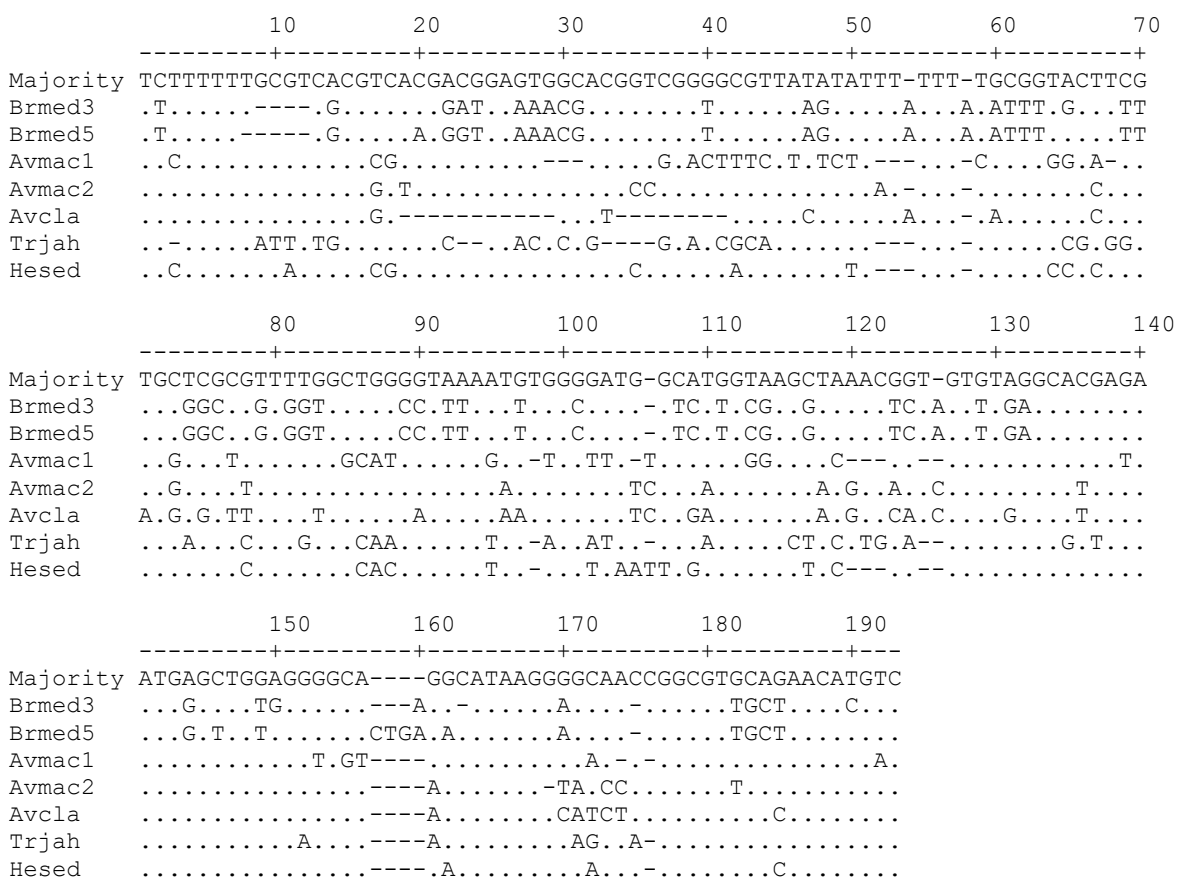
Для *Vahlodea atropurpurea* нами розшифровано три клони, які були описані у попередньому розділі. На філодендрограмі (рис. 3.3.4) ці клони групуються разом із послідовностями IGS *Poa pratensis*. При порівнянні послідовностей цих двох видів між собою було показано високу подібність між ними та різницю між ними лише поодинокими замінами нуклеотидів та однонуклеотидними інделами, розкиданими по всій довжині IGS (рис. 3.3.7). Крім того, в одному із варіантів IGS *Poa pratensis*, Popra-Rep3 та в одному з клонів *Vahlodea atropurpurea* виявлено делеції довжиною 14 нп та 9 нп, відповідно, що розташовані на початку IGS (рис. 3.3.7). Така близька спорідненість *Poa pratensis* та *Vahlodea atropurpurea* є несподіваною та потребує подальшого прояснення.



**Рис. 3.3.7** Структурна організація IGS 5S рДНК *P. pratensis* та *V. atropurpurea*.

До класу 3 належать *Tricholemma jahandiezii*, *Briza media*, *Avena clauda*, *Avena macrostachya* та *Helictotrichon sedenense*. Порівнявши послідовності IGS 5S рДНК (рис. 3.3.8) можна стверджувати, що хоч ці види і відносяться до

однієї клади, але генетична дистанція між ними більша, ніж в межах клад 2А, 2В та 2С. Це може свідчити про давнє розходження цих видів. Послідовності клонів досліджуваного нами виду *Briza media* подібні між собою на 92,3% та відрізняються лише 8-ма точковими мутаціями. Можна стверджувати, що для цього виду характерний лише 1 клас 5S рДНК. Варто також зазначити, що два варіанти *Avena macrostachya* групуються окремо та суттєво відрізняються нуклеотидними послідовностями між собою (рис. 3.3.8), причиною чого може бути алотетраплоїдне походження цього виду (Baum & Rajhathy, 1976).



**Рис. 3.3.8** Структурна організація IGS 5S рДНК *Tricholemma jahandiezii*, *B. media*, *Avena clauda*, *Avena macrostachya* та *Helictotrichon sedenense*.

Клада 4 охоплює описаний в розділі 3.2. вид *Avenella flexuosa* та види *Phleum pratense*, *Helictochloa pratensis*, *Helictotrichon aetolicum*, *Helictotrichon bromoides*, *Helictotrichon convolutum* та *Sesleria heufleriana*.

Вирівнювання послідовностей клонів *Phleum pratense* показало високу подібність між ними - 97,4%. Різниця в нуклеотидній послідовності між



двома сиквенованими клонами виражається чотирма однонуклеотидними транзиціями та трьома трансверсіями, рівномірно розподіленими по всій довжині IGS. Детальний аналіз отриманих сиквенсів показав, що в центральній частині IGS *Phleum pratense* присутні п'ять дивергованих субповторів (рис.3.3.9-3.3.10). Перший, другий і третій субповтори мають довжину 26, 22 та 25 нп, тоді як четвертий і п'ятий - лише 15 та 17 нп. Ці субповтори, імовірно, виникли внаслідок тандемної дуплікації батьківської послідовності довжиною 24 нп. Протягом подальшої еволюції у кожній копії субповторів мали місце заміни окремих нуклеотидів, а також - невеличкі делеції та інсерції. Саме за рахунок делецій і відбулося вкорочення четвертого і п'ятого субповторів. Проте, загалом, можна стверджувати, що у геномі *Phleum pratense* виявлений тільки один варіант повторюваної одиниці 5S рДНК із довжинами кодувальної ділянки та IGS 120 та 209 нп, відповідно (Ishchenko et al., 2018c).

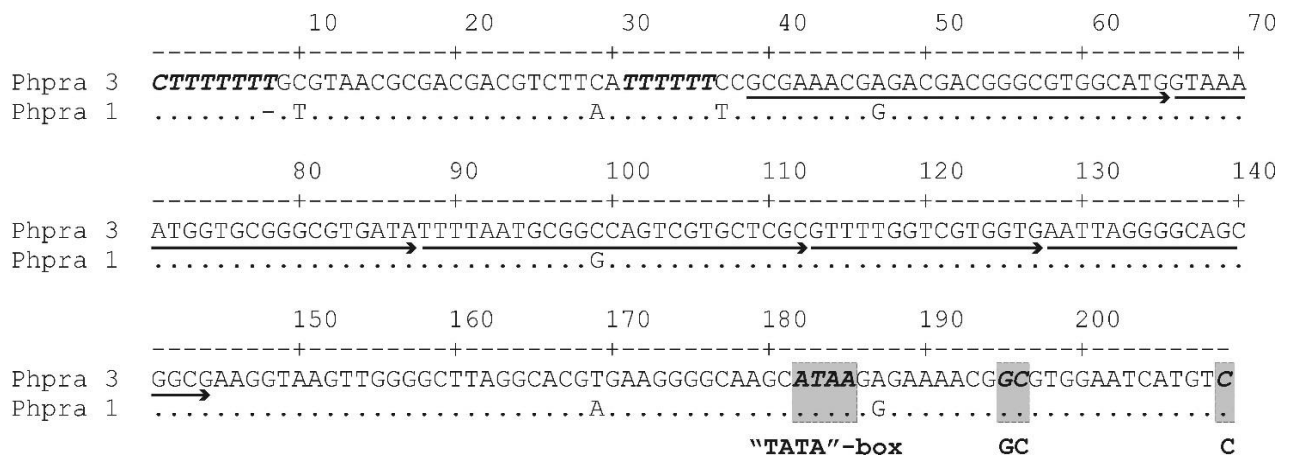


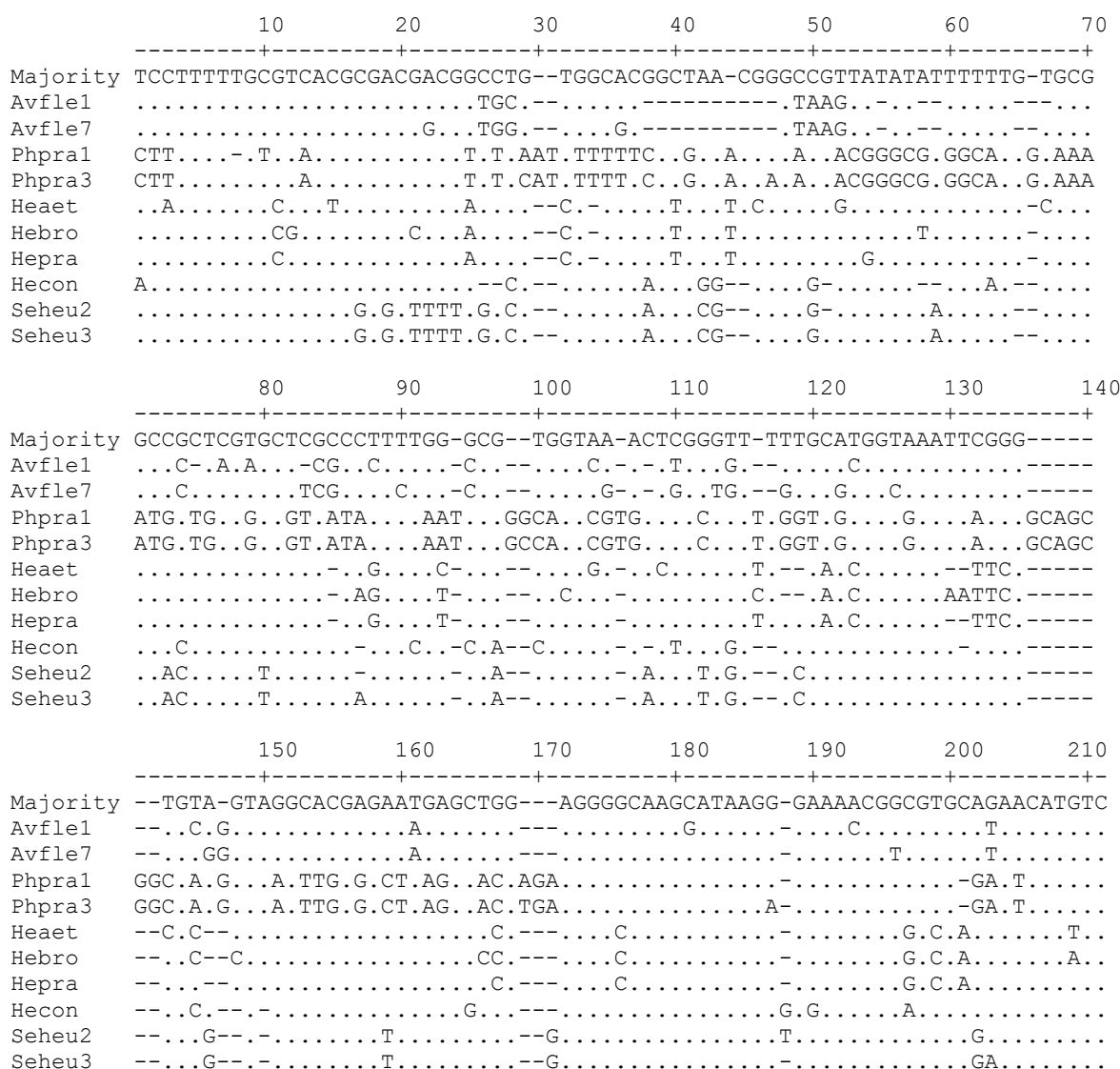
Рис. 3.3.9 Структурна організація IGS 5S рДНК *Phleum pratense*.

Жирним курсивом виділено оліго- dT послідовність потенційного термінатора та передбачувані зовнішні елементи промотора РНК- полімерази ІІІ. Стрілками відмічено розташування повторюваних елементів.

Consensus	GTTWAATGG--TGACGGGC----GTGG-ATG	(24 нп)
39	.CGA..C..GAC.....-.....-...	65 (26 нп)
66	..AA.....-.....-.....-.....-..A	87 (22 нп)
88	Т..Т..-----.-.....AGTC...СТСГС	112 (25 нп)
113	...Т--...--.-.G-----.....-..	127 (15 нп)
128	-----.....-.-.G....AGCG.C.	144 (17 нп)

Рис. 3.3.10 Порівняння субповторів у IGS 5S рДНК *Phleum pratense*.

Порівняння нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК видів класу 4 між собою показало суттєву різницю між представниками різних родів (рис. 3.3.11). Рівень подібності між родами коливається від 33,0 до 69,1%. Також, для досліджуваного нами виду *Sesleria heufleriana* характерний лише 1 клас повторів 5S рДНК, оскільки клони між собою є високоподібними.



**Рис. 3.3.11** Структурна організація IGS 5S рДНК *Avenella flexuosa*, *Phleum pratense*, *Helictochloa pratensis*, *Helictotrichon aetolicum*, *Helictotrichon bromoides*, *Helictotrichon convolutum* та *Sesleria heufleriana*.

### ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.3.

На загал отримані результати свідчать про суттєву дивергенцію 5S рДНК в межах триби Pooae.

При цьому, в межах одного виду/геному послідовності 5S рДНК є переважно високо подібними між собою. Лише у окремих видів в геномі знайдено два структурні класи 5S рДНК, а саме - у видів *Avenella flexuosa* та *Avena macrostachya*. Ці результати ще раз підкреслюють, що присутність трьох структурних класів 5S рДНК в геномах видів роду *Deschampsia* є унікальним явищем. З огляду на те, що види цього роду відрізняються високим хромосомним числом ( $x = 13$ ) та наявністю кількох локусів 5S рДНК на хромосомах (Amosova et al., 2017; Navrotska et al., 2018), можна припустити, що дуплікація геному, яка передувала дивергенції видів цього роду, створила передумови для виникнення поліморфізму 5S рДНК.

Результати даного розділу опубліковані у таких публікаціях: Ishchenko et.al. 2018b, 2018c, 2020b, 2020c.

## ВИСНОВКИ ДО РОБОТИ

У роботі вперше описано молекулярну організацію, поліморфізм та еволюцію мультигенної родини 5S рДНК у видів роду *Deschampsia* та інших представників триби Poeae. Доведена доцільність використання цієї ділянки геному у таксономічних дослідженнях цієї триби.

1. В геномі видів роду *Deschampsia* присутні три структурні класи повторів 5S рДНК, які відрізняються чисельними замінами нуклеотидів та інсерціями/делеціями у міжгенному спейсері, а також містять поодинокі нуклеотидні заміни у кодувальній ділянці. В межах структурного класу 1 виявлено три, а класу 3 – два підкласи.

2. Три структурні класи 5S рДНК зустрічаються в геномах всіх досліджених представників роду *Deschampsia*, тобто вони виникли на ранній стадії видоутворення у роді, ще до дивергенції сучасних видів від спільного предку.

3. Рослини більшості антарктичних популяції *D. antarctica* несуттєво відрізняються відносним вмістом структурних класів 5S рДНК у геномах. Колонізація Антарктики не була пов'язана з появою нових структурних класів.

4. Транскрипти більшості повторів 5S рДНК всіх структурних класів здатні формувати канонічну вторинну структуру, що вказує на їх функціональну активність. Тим не менш, мультигенна родина 5S рДНК *D. antarctica* також включає (i) структурно суттєво змінені древні псевдогени та (ii) відносно молоді псевдогени, які зазнали делецій в кодувальній ділянці, але не встигли накопичити багато замін.

5. За послідовністю IGS та розташуванням на філодендрограмі види роду *Deschampsia*, *Avenela flexuosa* та *Vahlodea atropurpurea* суттєво відрізняються між собою, що свідчить на користь виключення двох останніх видів із складу роду *Deschampsia*.

6. Високий внутрішньогеномний поліморфізм 5S рДНК є унікальною особливістю роду *Deschampsia*, на відміну від високої подібності повторів 5S рДНК у геномах всіх інших досліджених представників триби Pooae.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Albers, F. (1972a). Cytotaxonomie und B-Chromosomen bei *Deschampsia cespitosa* (L.) P.B. und verwandten Arten. *Beitr Biol Pflanzen*, 48, 1-62.
2. Albers, F. (1972b). Cytosystematische Untersuchungen in der Subtribus Deschampsineae Holub (Tribus Aveneae Nees). II. Die Gattungen *Vahlodea* Fr. und *Avenella* Koch. *Ber Deutsch Bot Ges*, 85, 279-285.
3. Albers, F. (1980). Vergleichende Karyologie der Gräser-Subtriben Aristaveninae und Airinae (Poaceae-Aveneae), *Plant Syst Evol*, 136, 137-167.
4. Amosova, A.V., Bolsheva, N.L., Zoshchuk, S.A., Twardovska, M.O., Yurkevich, O.Yu., Andreev, I.O., Samatadze, T.E., Badaeva, E.D., Kunakh, V.A., & Muravenko, O.V. (2017). Comparative molecular cytogenetic characterization of seven *Deschampsia* (Poaceae) species. *PLoS One*, 12(4), e0138878. doi:10.1371/journal.pone.0175760
5. Andreev, I. O., Spiridonova, E. V., Kyryachenko, S. S., & Parnikoza, I. Yu. (2010). Population-genetic analysis of *Deschampsia antarctica* from two regions of Maritime Antarctica. *Moscow Univ Biol Sci Bull*, 65(4), 208-210. doi:10.3103/s0096392510040243
6. Andreev, I. O., Volkov, R. A., Kozeretska, I. A., Parnikoza, I. Yu., Spiridonova, K. V., Kiryachenko, S. S., Maydanyuk, D. M., & Kunakh, V. A. (2012). Geographical gradient of genetic diversity of *Deschampsia antarctica* Desv. from the Maritime Antarctic. *Ukrainian Antarctic J*, 10-11, 282-288.
7. Andreev, I. O., Ishchenko, O. O., Volkov, R. A., & Kunakh, V. A. (2019). Molecular organization and polymorphism of 5S rRNA genes *Deschampsia antarctica* E. Desv. *Factors of experimental evolution of organisms: Selected abstracts of the XIV International Scientific Conference and VII Congress of the All-Ukrainian Association of Plant Biologists*. Kyiv. P. 373.
8. Altshull, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped blast and psiblast: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3.

9. Avdulov, N. P. (1931) Karyosystematic studies in the grass family. *Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant Breeding*, 44, 1-352.
10. Barberá, P., Soreng, R. J., Peterson, P. M., Romaschenko, K., Quintanar, A., & Aedo, C. (2020). Molecular phylogenetic analysis resolves *Trisetum* (Poaceae: Pooideae: Koeleriinae) polyphyletic: Evidence for a new genus, *Sibirotrisetum* and resurrection of *Acrospelion*. *J Syst Evol*, 58(4), 517-526. doi:10.1111/jse.12523
11. Barciszewska, M., Erdman, V.A., & Barciszewski, J. (1994). A new model for the tertiary structure of 5S ribonucleic acid in plants. *Plant Mol Biol Rep*, 12,116-131.doi:10.1007/BF02668373
12. Barciszewska, M. Z., Szymański, M., Erdmann, V. A., & Barciszewski, J. (2001). Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim Polon*, 48(1), 191-198. doi:10.18388/abp.2001\_5126
13. Baum, B. R., & Rajhathy, T. (1976). A study of *Avena macrostachya*. *Can J Bot*, 54(21), 2434-2439. doi:10.1139/b76-258
14. Baum, B. R., & Johnson, D. A. (1994). The molecular diversity of the 5S rRNA gene in barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*, 37(6), 992-998. doi:10.1139/g94-140
15. Baum, B. R., & Bailey, L. G. (2004). The origin of the A genome donor of wheats (*Triticum*: Poaceae) – a perspective based on the sequence variation of the 5S DNA gene units. *Genet Resour Crop Evol*, 51, 183-196. doi:10.1023/B:GRES.0000020861.96294.f4
16. Baum, B. R., Bailey, L. G., Belyayev, A., Raskina, O., & Nevo, E. (2004). 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*, 47(3), 590-599. doi: 10.1139/g03-146
17. Baum, B. R., & Johnson, D. A. (2008a). Molecular confirmation of the genomic constitution of *Douglasdeweya* (Triticeae: Poaceae): demonstration of the utility of the 5S rDNA sequence as a tool for haplome identification. *Mol Genet Genomics*, 279(6), 621-628. doi:10.1007/s00438-008-0338-1

18. Baum, B. R., Edwards, T., & Johnson, D. A. (2008b). Loss of 5S rDNA units in the evolution of *Agropyron*, *Pseudoroegneria* and *Douglasdeweya*. *Genome*, 51(8), 589-598. doi:10.1139/G08-045
19. Baum, B. R., Edwards, T., & Johnson, D. A. (2009). Phylogenetic relationships among diploid *Aegilops* species inferred from 5S rDNA units. *Mol Phylogenetics Evol*, 53(1), 34-44. doi:10.1016/j.ympev.2009.06.005
20. Baum, B. R., & Feldman, M. (2010a). Elimination of 5S DNA unit classes in newly formed allopolyploids of the genera *Aegilops* and *Triticum*. *Genome*, 53(6), 430-438. doi.org/10.1139/G10-017.
21. Baum, B. R., Edwards, T., & and Johnson, A. (2010b). Codependence of repetitive sequence classes in genomes: phylogenetic analysis of 5S rDNA families in *Hordeum* (Triticeae: Poaceae). *Genome*, 53(3), 180-202. doi:10.1139/g09-096
22. Baum, B. R., Edwards, T., Mamuti, M., & Johnson, D. A. (2012). Phylogenetic relationships among the polyploid and diploid *Aegilops* species inferred from the nuclear 5S rDNA sequences (Poaceae: Triticeae). *Genome*, 55(3), 177-193. doi:10.1139/g2012-006
23. Baum, B. R., Edwards, T., & Johnson D. A. (2014). What does the nr5S DNA multigene family tell us about the genomic relationship between *Dasypyrum breviaristatum* and *D. villosum* (Triticeae: Poaceae)? *Mol Genet Genomics*, 289(4), 553-565. doi:10.1007/s00438-014-0825-5
24. Baum, B. R., & Johnson, D. A. (2018). *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*, 65, 161-186. doi:10.1007/s10722-017-0519-z
25. Bednarska, I., & Brazauskas, G. (2017). *Festuca galiciensis*, a new species of the *F. valesiaca* group (Poaceae) from Ukraine. *Phytotaxa*, 306(1), 21-36. doi:10.11646/phytotaxa.306.1.2
26. Benabdelmouna, A., Abirached-Darmency, M., & Darmency, H. (2001a). 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*, 103, 668-677. doi:10.1007/s001220100596
27. Benabdelmouna, A., Shi, Y., Abirached-Darmency, M., & Darmency, H. (2001b). Genomic *in situ* hybridization (GISH) discriminates between the A and the B genomes in diploid and tetraploid *Setaria* species. *Genome*, 44(4), 685-690. doi:10.1139/g01-032.
28. Bentham, G. (1881). Notes on Gramineae. *J Linn Soc Bot*, 19, 14-134. doi:10.1111/j.1095-8339.1881.tb00355.x
29. Bentham, G. & Hooker, J. D. (1883). *Genera plantarum*. L. Reeve and Co.: London.
30. Betekhtin, A., Jenkins, G., & Hasterok, R. (2014). Reconstructing the Evolution of Brachypodium Genomes Using Comparative Chromosome Painting. *PLoS ONE*, 9(12), e115108. doi:10.1371/journal.pone.0115108
31. Bhatia, S., Singh, K., Jagannathan, V., & Lakshmikumaran, M. (1993). Organization and sequence analysis of the 5S rRNA genes in *Brassica campestris*. *Plant Sci*, 92(1), 47-55. doi:10.1016/0168-9452(93)90065-8
32. Bonasora, M. G., López, A., Vaio, M., Speranza, P. R., Honfi, A. I., & Rua, G. H. (2018). Origins of polyploidy in *Paspalum stellatum* and related species (Poaceae, Panicoideae, Paspaleae) inferred from phylogenetic and cytogenetic analyses. *Bot J Linn Soc*, 188(1), 21-33. doi:10.1093/botlinnean/boy046
33. Brown R. (1814). *Gramineae*. In: *Flinders M ed. A voyage to Terra Australis*. London: W. Bulmer & Company.
34. Campell, B. R., Song, Y., Posch, T. E., Cullis, C. A., & Town, C. D. (1992). Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 112(2), 225-228. doi:10.1016/0378-1119(92)90380-8
35. Cardone, S., Sawatani, P., Rush, P., García, A. M., Poggio, L., & Schrauf, G. (2009). Karyological studies in *Deschampsia antarctica* Desv.(Poaceae). *Polar Biol*, 32(3), 427-433. doi: 10.1007/s00300-008-0535-8
36. Caro, J. A. (1982). Sinopsis taxonomica de las gramineas Argentinas. *Dominguezia*, 4(1), 1-51.

37. Catalán, P., Torrecilla, P., López Rodríguez, J.A., & Olmstead, R.G. (2004). Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe Loliinae and allies (Poaceae, Pooideae) inferred from ITS and trnL–F sequences, *Mol Phylogen Evol*, 31(2), 517-541. doi:10.1016/j.ympev.2003.08.025
38. Catalán, P., Torrecilla, P., López-Rodríguez, J. A., Müller, J., & Stace, C. A. (2007). A systematic approach to subtribe Loliinae (Poaceae: Pooideae) based on phylogenetic evidence. *Aliso*, 23 (1), 380-405. doi:10.5642/aliso.20072301.31
39. Cheng, Y., Zhou, K., Humphreys, M. W., Harper, J. A., Ma, X., Zhang, X., & Huang, L. (2016). Phylogenetic relationships in the *Festuca-Lolium* complex (Loliinae; Poaceae): new insights from chloroplast sequences. *Fron Ecol Evol*, 4, 89. doi: 10.3389/fevo.2016.00089
40. Chiapella, J. (2007). A molecular phylogenetic study of *Deschampsia* (Poaceae: Aveneae) inferred from nuclear ITS and plastid *trnL* sequence data: support for the recognition of *Avenella* and *Vahlodea*. *Taxon*, 56 (1), 55-64. doi:10.2307/25065735
41. Chiapella, J., & Zuloaga, F. O. (2010). A Revision of *Deschampsia*, *Avenella*, and *Vahlodea* (Poaceae, Poaceae, Airinae) in South America. *Ann Missouri Bot Gard*, 97 (2), 141-162. doi:10.3417/2008115
42. Christenhusz, M. J. M., & Byng, J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa*, 261(3), 201-217. doi:10.11646/phytotaxa.261.3.1.
43. Chwedorzewska, K. J., Bednarek, P. T., & Puchalski, J. (2004). Molecular variation of antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. from King George Island (Antarctica). *Acta Societ Botan Pol*, 73(1), 23-29.
44. Clayton, W.D. & Renvoize, S.A. (1986). Genera graminum. Grasses of the world. *Kew Bull, Additional Series* 13: 1-389.
45. Cloix, C., Tutois, S., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagno, M.C., Picard, C., & Tourmente, S. (2000). Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genome Res*, 10(5), 679-690. doi:10.1101/gr.10.5.679

46. Cloix, C., Yukawa, Y., Tutois, S., Sugiura, M., & Tourmente, S. (2003). In vitro analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant J*, 35(2), 251-261. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01793.x
47. Cohen, S., Houben, A., & Segal, D. (2008). Extrachromosomal circular DNA derived from tandemly repeated genomic sequences in plants. *Plant J*, 53(6), 1027-1034. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03394.x
48. Davis, J. I., & Soreng, R. J. (2007). A preliminary phylogenetic analysis of the grass subfamily Pooideae (Poaceae), with attention to structural features of the plastid and nuclear genomes, including an intron loss in GBSSI. *Aliso*, 23, 335-348.
49. de Souza, T. B., Gaeta, M. L., Martins, C., & Vanzela, A. L. L. (2020). IGS sequences in *Cestrum* present AT-and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol Biol Reports*, 47, 55-66. doi:10.1007/s11033-019-05104-y
50. Dewey, D. R. (1984). *The genomic system of classification as a guide to intergeneric hybridization with perennial Triticeae*. In Gene manipulation in plant improvement, Gustafson, J. P. (ed)., Springer, Boston, MA.
51. Ding, C., & Dong, Q. (2020). Characterization of the complete chloroplast genome of *Festuca sinensis* (Gramineae). *Mitochondrial DNA Part B*, 5(1), 358-359. doi: 10.1080/23802359.2019.1704192
52. Döring, E., Schneider, J., Hilu, K., & Röser, M. (2007). Phylogenetic relationships in the Aveneae/Poeae complex (Pooideae, Poaceae). *Kew Bull*, 62 (3), 407-424.
53. DNASTAR (1998). MegAlign 3.18 edit. DNASTAR. Inc., Madison, WI.
54. Douet, J., & Tourmente, S. (2007). Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*, 99, 5-13. doi:10.1038/sj.hdy.6800964

55. Douet, J., Tutois, S., & Tourmente, S. (2009). A Pol V–Mediated Silencing, Independent of RNA–Directed DNA Methylation, Applies to 5S rDNA. *PLoS Genet*, 5(10), e1000690. doi:10.1371/journal.pgen.1000690
56. Drouin, G., & de Sá, M. M. (1995). The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Mol Biol Evol*, 12(3), 481-493. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040223
57. Duval-Jouve, M. (1875). Histotaxie des feuilles de Graminées. *Bulletin de la Société Botanique de France*, 22(3), 115-117.
58. Duvall, M. R., Davis, J. I., Clark, L. G., Noll, J. D., Goldman, D. H., & Sánchez-Ken G. (2007). Phylogeny of the Grasses (Poaceae) revisited. *J Syst Evol Bot* 23(1), 237-247. doi:10.5642/aliso.20072301.18.
59. Dvořák, J., McGuire, P. E., & Cassidy, B. (1988). Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome*, 30(5), 680-689. doi:10.1139/g88-115
60. Dvorak, J., Zhang, H.-B., Kota, R. S., & Lassner, M. (1989). Organization and evolution of the 5s ribosomal RNA gene family in wheat and related species. *Genome*, 32, 1003-1016. doi:10.1139/g89-545
61. Dvořák, J., & Zhang, H. B. (1990). Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc Natl Acad Sci*, 87(24), 9640-9644. doi:10.1073/pnas.87.24.9640
62. Dvořák, J., Terlizzi, P. di, Zhang, H.-B., & Resta, P. (1993). The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome*, 36(1), 21-31. doi:10.1139/g93-004
63. Eubanks, M. (1997). Molecular analysis of crosses between *Tripsacum dactyloides* and *Zea diploperennis* (Poaceae). *Theor Appl Genet*, 94, 707-712. doi:10.1007/s001220050469
64. Falistocco, E., Passeri, V., & Marconi, G. (2007). Investigations of 5S rDNA of *Vitis vinifera* L.: sequence analysis and physical mapping. *Genome*, 50(10), 927-938. doi:10.1139/G07-070

65. Fasanella, M., Premoli, A.C., Urdampilleta, J.D., González, M.L., & Chiapella, J.O. (2017). How did a grass reach Antarctica? The Patagonian connection of *Deschampsia antarctica* (Poaceae). *Bot J Lin Soc*, 185(4), 511-524. doi: 10.1093/botlinnean/box070
66. Ferreira, M. T. M., Chaves, A. L. A., Rocha, L. C., da Silva, L. N., Kalthuk-Santos, E. & Techio, V. H. (2020). Identification of ribosomal sites and karyotype analysis in *Festuca ulochaeta* Steud. and *Festuca fimbriata* Ness., grasses native to Brazil. *Mol Biol Rep*, 47(1), 261-267. doi:10.1007/s11033-019-05126-6
67. Fukunaga, K., Ichitani, K., & Kawase, M. (2006). Phylogenetic analysis of the rDNA intergenic spacer subrepeats and its implication for the domestication history of foxtail millet, *Setaria italica*. *Theor Appl Genet*, 113, 261-269. doi:10.1007/s00122-006-0291-5
68. Fulneček, J., Lim, K., Leitch, A., Kovařík, A., & Matyášek, R. (2002). Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species. *Heredity*, 88, 19-25. doi:10.1038/sj.hdy.6800001.
69. Garcia, S., Yoong Lim, K., Chester, M., Garnatje, T., Pellicer, J., Vallès, J., Andrew R. Leitch, A. R., & Aleš Kovařík, A. (2009.) Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. *Chromosoma*, 118, 85-97. doi: 10.1007/s00412-008-0179-z
70. Garcia, S., Panero, J.L., Siroky, J., & Kovarik, A. (2010). Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *BMC Plant Biology*, 10, 176. doi:10.1186/1471-2229-10-176
71. Garcia, S., Wendel, J. F., Borowska-Zuchowska, N., Aïnouche, M., Kuderova, A., & Kovarik, A. (2020). The Utility of Graph Clustering of 5S ribosomal DNA homoeologs in plant allopolyploids, homoploid hybrids, and cryptic introgressants. *Front Plant Sci*, 11, 41. doi:10.3389/fpls.2020.00041
72. Garcia-Suarez, R., Alonso-Blanco, C., Fernandez-Carvajal, M. C., Fernandez-Prieto, J. A., Roca, A., & Giraldez, R. (1997). Diversity and systematics of *Deschampsia* sensu lato (Poaceae), inferred from karyotypes, protein

- electrophoresis, total genomic DNA hybridization and chloroplast DNA analysis. *Plant Syst Evol*, 205, 99-110. doi:10.1007/BF00982800
73. Gaut, B. S., Tredway, L. P., Kubik, C., Gaut, R. L. & Meyer, W. (2000). Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of the *Festuca-Lolium* complex (Poaceae) based on ITS sequence data. *Pl Syst Evol*, 224, 33-53. doi:10.1007/BF00985265
74. Geiduschek, E. P., & Tocchini-Valentini, G. P. (1988). Transcription by RNA polymerase III. *Annu Rev Biochem*, 57(1), 873-914. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.004301
75. Givnish, T. J., Ames, M., McNeal, J. R., McKain, M. R., Steele, P. R., de Pamphilis, C. W., Graham S. W., Pires, J. C., Stevenson, D. W., Zomlefer, W. B., Briggs, B. G., Duvall, M. R., Moore, M. J., Heaney, J. M., Soltis, D. E., Soltis, P. S., Thiele, K., & Leebens-Mack, J. H. (2010). Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. *Ann Miss Bot Gard*, 97(4), 584-616. doi:10.3417/2010023
76. González, M. L., Urdampilleta, J. D., Fasanella, M., Premoli, A.C., & Chiapella, J. O. (2016). Distribution of rDNA and polyploidy in *Deschampsia antarctica* E. Desv. in Antarctic and Patagonic populations. *Polar Biol*, 39(9), 1663-1677. doi:10.1007/s00300-016-1890-5
77. González, M. L., Chiapella, J. O., & Urdampilleta, J. D. (2017). Characterization of some satellite DNA families in *Deschampsia antarctica* (Poaceae). *Polar Biol*, 41(3), 457-468. doi: 10.1007/s00300-017-2205-1.
78. Grabiele, M., Chalup, L., Robledo, G., & Seijo, G. (2012). Genetic and geographic origin of domesticated peanut as evidenced by 5S rDNA and chloroplast DNA sequences. *Plant Syst Evol*, 298(6), 1151-1165. doi:10.1007/s00606-012-0627-3
79. Grass Phylogeny Working Group, Barker, N. P., Clark, L. G., Davis, J. I., Duvall, M. R., Guala, G. F., Hsiao, C., Kellogg, E. A., Linder, H. P., Mason-Gamer, R. J., Mathews, S. Y., Simmons, M. P., Soreng, R. J., & Spangler, R. E. (2001).

- Phylogeny and Subfamilial Classification of the Grasses (Poaceae). *Ann Mo Bot Gard*, 88(3), 373-457. doi:10.2307/3298585
80. Grass Phylogeny Working Group II. (2012). New grass phylogeny resolves deep evolutionary relationships and discovers C4 origins. *New Phytol*, 193, 304-312. doi:10.1111/j.1469-8137.2011.03972.x
81. Hackel, E. (1887). Gramineae. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, 2, 70-89.
82. Haider, N., & Wilkinson, M. (2020). Caps DNA barcoding for field laboratory identification of grass species (British grasses as a model), *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)*, 66(2), 74-86. doi:10.2478/agri-2020-0008
83. Hand, M. L., Cogan, N. O., Stewart, A. V., & Forster, J. W. (2010). Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetics of the *Lolium-Festuca* species complex. *BMC Evol Biol*, 10(1), 303. doi:10.1186/1471-2148-10-303
84. Hand, M. L., Spangenberg, G. C., Forster, J.W., & Cogan, N. O. (2013). Plastome sequence determination and comparative analysis for members of the *Lolium-Festuca* grass species complex. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(4), 607-616. doi:10.1534/g3.112.005264
85. Hemleben, V., & Werts, D. (1988). Sequence organization and putative regulatory elements in the 5S rRNA genes of two higher plants (*Vigna radiata* and *Matthiola incana*). *Gene*, 62,165-169. doi:10.1016/0378-1119(88)90591-4
86. Hilu, K., Alice, L., & Liang, H. (1999). Phylogeny of Poaceae Inferred from matK Sequences. *Ann Mo Bot Gard*, 86(4), 835-851. doi:10.2307/2666171
87. Hilu, K. W. (2004). Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). *Aust J Bot*, 52(1), 13-22. doi:10.1071/BT03103
88. Hitchcock, A. S. (1935). *Manual of Grasses of the United States*. US Department of Agriculture Miscellaneous Publication.
89. Hitchcock, A. S., & Chase, A. (1951). *Manual of the grasses of the United States* (Vol. 2). US Government Printing Office.
90. Hsiao, C., Jacobs, S. W. L., Chatterton, N. J., & Asay, K. H. (1998). A molecular phylogeny of the grass family (Poaceae) based on the sequences of

- nuclear ribosomal DNA (ITS). *Aust Syst Bot*, 11(6), 667-688. doi:10.1071/SB97012
91. Hu, X., Yu, F., Huang, Y., Sun, L., Li, X., Yang, S., Chen, Ke., Huang, F., Zeng, K., Zhang, M., & Deng, Z. (2019). Characterization analysis of the 35S rDNA intergenic spacers in *Erianthus arundinaceus*. *Gene*, 694, 63-70. doi:10.1016/j.gene.2019.01.026
92. Humphreys, M. W., Thomas, H. M., Morgan, W. G., Meredith, M. R., Harper, J. A., Thomas, H., Zwierzykowski, Z., & Ghesquiére, M. (1995). Discriminating the ancestral progenitors of hexaploid *Festuca arundinacea* using genomic *in situ* hybridization, *Heredity*, 75, 171-174. doi:10.1038/hdy.1995.120
93. Hyun, D. Y., Sebastin, R., Lee, K. J., Lee, G. A., Shin, M. J., Kim, S. H., Lee J. R. & Cho, G. T. (2020). Genotyping-by-sequencing derived single nucleotide polymorphisms provide the first well-resolved phylogeny for the genus *Triticum* (Poaceae). *Front Plant Sci*, 11, 688. doi:10.3389/fpls.2020.00688
94. Inda, L. A., Sanmartín, I., Buerki, S., & Catalán, P. (2014). Mediterranean origin and Miocene–Holocene Old World diversification of meadow fescues and ryegrasses (*Festuca* subgenus *Schedonorus* and *Lolium*). *J Biogeogr*, 2014, 41(3), 600-614. doi:10.1111/jbi.12211
95. Ishchenko, O. O., Panchuk, I. I., Andreev, I. O., Kunakh, V. A., & Volkov, R. A. (2018a). Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol Genet*, 52(6), 416-421. doi:10.3103/S0095452719010146
96. Ishchenko, O. O., & Panchuk, I. I. (2018b). Molecular organization of 5S rDNA of perennial ryegrass *Lolium perenne* L. *Bull Vavilov Soc Genet Breed Ukraine*, 16(2), 166-173.
97. Ishchenko, O. O., Derevenko, T. O., & Panchuk, I. I. (2018c). 5S rDNA of Timothy-grass *Phleum pratense* L. *Scientific Herald of Chernivtsy University. Biology (Biological Systems)*, 10(2), 107-112.
98. Ishchenko, O. O., Mel'nyk, V. M., Parnikoza, I. Y., Budzhak V. V. & Panchuk, I. I. (2020a). Molecular organization of 5S ribosomal DNA and taxonomic status



- of *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (Poaceae). *Cytol Genet*, 54(6), 505-513. doi:10.3103/S0095452720060055
99. Ishchenko O. O., & Volkov R. A. (2020b). Organization of 5S ribosomal DNA of *Poa pratensis* L. *Scientific Herald of Chernivtsy University. Biology (Biological Systems)*, 12 (2), 135-140. doi:10.31861/biosystems2020.02.135
100. Ishchenko, O. O., Mel'nyk, V. M., Kunakh, V. A., & Volkov, R. A. (2020c). Application of 5S rDNA for clarification of taxonomic status of *Avenella flexuosa*. *Biological section "The importance of G. Gamow's ideas for the biology of the 21st century": Coll. materials of the XX International Gamow School Conference*. Odesa. P. 198
101. Ishchenko, O. O., Poburyan, O. M., & Volkov, R. A. (2020d). Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia cespitosa*. *Genetics and biotechnology of the XXI century: problems, achievements, prospects: materials of the IV International Scientific Conference dedicated to the 55th anniversary of the Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus*. Minsk. P. 83.
102. Kalendar, R., Tanskanen, J., Chang, W., Antonius, K., Sela, H., Peleg, O., & Schulman, A. H. (2008). Cassandra retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105(15), 5833-5838. doi:10.1073/pnas.0709698105
103. Kassavetis, G. A., Letts, G. A., & Geiduschek, E. P. (2001). The RNA polymerase III transcription initiation factor TFIIB participates in two steps of promoter opening. *EMBO J*, 20(11), 2823-2834. doi:10.1093/emboj/20.11.2823
104. Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199
105. Kerby, K., & Kuspira, J. (1987). The phylogeny of the polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). *Genome*, 29(5), 722-737. doi:10.1139/g87-124

106. Kolano, B., McCann, J., Orzechowska, M., Siwinska, D., Tensch, E., & Weiss-Schneeweiss, H. (2016). Molecular and cytogenetic evidence for an allotetraploid origin of *Chenopodium quinoa* and *C.berlandieri* (Amaranthaceae). *Mol Phylogenet Evol*, 100, 109-123. doi:10.1016/j.ympev.2016.04.009
107. Kolano, B. M, Cann, J., Oskędra, M., Chrapek, M., Rojek, M., Nobis, A., & Weiss-Schneeweiss, H. (2019). Parental origin and genome evolution of several Eurasian hexaploid species of *Chenopodium* (Chenopodiaceae). *Phytotaxa*, 392(3), 163-185. doi: 10.11646/phytotaxa.392.3.1
108. Komarnytsky, S. I., & Komarnytsky, I. K. (2000). Organization and evolution of 5S rRNA genes in the genus *Nicotiana*. *Biopolym Cell*, 16 (3), 205-211.
109. Kopecký, D., Loureiro, J., Zwierzykowski, Z., Ghesquière, M. & Doležel, J. (2006). Genome constitution and evolution in *Lolium* × *Festuca* hybrid cultivars (*Festulolium*). *Theor Appl Genet*, 113, 731–742. doi:10.1007/s00122-006-0341-z
110. Kopecký, D., Lukaszewski, A. J. & Doležel, J. (2008). Cytogenetics of *festulolium* (*Festuca* × *Lolium* hybrids). *Cytogenet Genome Res*, 120(3-4), 370-383. doi:10.1186/s12864-019-5766-2
111. Krause, E. H. L. (1909). Ein Besserungsversuch am System der Gramineen. *Beih Bot Centralbl* 25: 421-489.
112. Krause, E. H. L. (1910). Weitere Besserungen am System der Gramineen. *Beih Bot Centralbl* 27: 412-424.
113. Kubis, S., Schmidt, T., & Heslop-Harrison, J. S. (1998). Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes. *Ann Bot*, 82, 45-55. doi:10.1006/anbo.1998.0779
114. Layat E., Sáez-Vásquez J., & Tourmente S. (2012). Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 53(2), 267-276. doi:10.1093/pcp/pcr177
115. Lee, S. I., & Kim, N. S. (2014). Transposable elements and genome size variations in plants. *Genomics Inform*, 12(3), 87-97. doi:10.5808/GI.2014.12.3.87
116. Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum*. Holmiae: Impensis Laurentii Salvii. doi:10.5962/bhl.title.669.

117. Luo, X., Tinker, N. A., Fan, X., Zhang, H., Sha, L., Kang, H., Ding, C., Liu, J., Zhang, L., Yang R., & Zhou, Y. (2012). Phylogeny and maternal donor of *Kengyilia* species (Poaceae: Triticeae) based on three cpDNA (*matK*, *rbcL* and *trnH-psbA*) sequences. *Biochem Syst Ecol*, 44, 61-69. doi:10.1016/j.bse.2012.04.004
118. Mahelka, V., Kopecký, D., & Baum, B. R. (2013). Contrasting patterns of evolution of 45S and 5S rDNA families uncover new aspects in the genome constitution of the agronomically important grass *Thinopyrum intermedium* (Triticeae). *Mol Biol Evol*, 30(9), 2065-2086. doi:10.1093/molbev/mst106
119. Matyasek, R., Fulnecek, J., & Lim, K. Y. (2002). Evolution of 5S rDNA unit arrays in the plant genus *Nicotiana* (Solanaceae). *Genome*, 4, 556-562. doi:10.1139/g02-017
120. Mazzella, C., Rodríguez, M., Vaio, M., Gaiero, P., López-Carro, B., Santiñaque, F. F., Folle G.A., & Guerra, M. (2010). Karyological features of *Achyrocline* (Asteraceae, Gnaphalieae): stable karyotypes, low DNA content variation and linkage of rRNA genes. *Cytogenet Genome Res*, 128(1-3), 169-176. doi:10.1159/000290689
121. McFadden E. S., & Sears E.R. (1944). The artificial synthesis of *Triticum spelta*. *Rec Soc Gene. Am*, 13, 26-27.
122. McIntyre, C. L., Winberg, B., Houchins, K., Appels, R. & Baum, B. R. (1992). Relationships between *Oryza* species (Poaceae) based on 5S DNA sequences. *Pl Syst Evol*, 183, 249-264. doi:10.1007/BF00940807
123. Mlinarec, J., Franjević, D., Bočkor, L., & Besendorfer, V. (2016). Diverse evolutionary pathways shaped 5S rDNA of species of tribe Anemoneae (Ranunculaceae) and reveal phylogenetic signal. *Bot J Linn Soc*, 182(1), 80-99. doi:10.1111/boj.12452
124. Mosyakin, S. L., Bezusko, L. G., & Mosyakin, A. S. (2007). Origins of native vascular plants of Antarctica: comments from a historical phytogeography viewpoint. *Cytol Genet*, 41(5), 308-316. doi: 10.3103/S009545270705009X.

125. Muravenko, O. V., Amosova, A. V., Samatadze, T. E., Semenova, O., Nosova, I. V., Popov, K. V., Shostak, N. G, Zoshchuk, S. A., & Zelenin, A. V. (2004). Chromosomal localization of 5S and 45S ribosomal DNA in species of *Linum* L. section *Linum* (syn= *Protolinum* and *Adenolinum*). *Genetika*, 40(2), 256-260.
126. Muravenko, O. V., Yurkevich, O. Y., Bolsheva, N. L., Samatadze, T. E., Nosova, I. V., Zelenina, D. A., Volkov, A. A., Popov, K. V. & Zelenin, A. V. (2009). Comparison of genomes of eight species of sections *Linum* and *Adenolinum* from the genus *Linum* based on chromosome banding, molecular markers and RAPD analysis. *Genetika*, 135(2), 245-255. doi:10.1007/s10709-008-9273-7
127. Nakai, T. (1930). Notulæ ad Plantas Japoniæ & Koreæ XXXIX. *Shokubutsugaku Zasshi*, 44(526), 507-537.
128. Navrotska, D., Andreev, I., Betekhtin, A., Rojek, M., Parnikoza, I., Myryuta, G., Szymanowska-Pułka, J., Grakhov, V., Ivannikov, R., Hasterok, R., & Kunakh, V. (2018). Assessment of the molecular cytogenetic, morphometric and biochemical parameters of *Deschampsia antarctica* from its southern range limit in maritime Antarctic. *Pol Polar Res*, 39(4), 525-548.
129. Negi, M. S., Rajagopal, J., Chauhan, N., Cronn, R., & Lakshmikumaran, M. (2002). Length and sequence heterogeneity in 5S rDNA of *Populus deltoides*. *Genome*, 45(6), 1181-1188. doi:10.1139/g02-094
130. Orioli, A., Pascali, C., Pagano, A., Teichmann, M., & Dieci, G. (2012). RNA polymerase III transcription control elements: themes and variations. *Gene*, 493(2), 185-194. doi:10.1016/j.gene.2011.06.015
131. Palisot de Beauvois, A. M. F. J. (1812). *Essai d'une nouvelle Agrostographie; ou nouveau genres des Graminées; avec figures représentant les caractères de tous les genres*. Paris: Chez l'auteur, Rue de Turenne.
132. Parnikoza, I. Y., Maidanuk, D. N., & Kozeretska, I. A. (2007). Are *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. migratory relicts? *Cytol Genet*, 41(4), 226-229. doi:10.3103/S0095452707040068.

133. Parnikoza, I., Kozeretska, I., & Kunakh, V. (2011). Vascular plants of the Maritime Antarctic: origin and adaptation. *Am J Plant Sci*, 2(3), 381-395. doi: 10.4236/ajps.2011.23044
134. Paule, M. R., & White, R. J. (2000). Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res*, 28(6), 1283-1298. doi:10.1093/nar/28.6.1283
135. Peng, Y.Y., Wei, Y.M., Baum, B.R., & Zheng, Y.L. (2008). Molecular diversity of the 5S rRNA gene and genomic relationships in the genus *Avena* (Poaceae: Aveneae). *Genome*, 51(2), 137-154. doi: 10.1139/G07-111
136. Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hershkovits, E., Xue, Y., Waterbury, C. C., Hsiao, C., Stepanov, V. G., Gaucher, E. A., Grover, M. A., Harvey, S. C., Hud, N. V., Wartell, R. M., Fox, G. E., & Williams, L. D. (2013). Secondary structure and domain architecture of the 23S and 5S rRNAs. *Nucleic Acids Res*, 41(15), 7522-7535. doi:10.1093/nar/gkt513
137. Pieler, T., Hamm, J., & Roeder, R.G. (1987). The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell*, 48, 91-100. doi:10.1016/0092-8674(87)90359-X
138. Quintanar, A., Castroviejo, S., & Catalán, P. (2007). Phylogeny of the tribe Aveneae (Pooideae, Poaceae) inferred from plastid trnT-F and nuclear ITS sequences. *Amer J Bot*, 94(9), 1554-1569. doi:10.3732/ajb.94.9.1554.
139. Raven, P. H. (1975). The bases of Angiosperm phylogeny: cytology. *Ann Mo Bot Gard*, 62(3), 724-764. doi:10.2307/2395272
140. Röser, M., Winterfeld, G., Grebenstein, B., & Hemleben, V. (2001). Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae). *Mol Phylogen Evol*, 21(2), 198-217. doi:10.1006/mpev.2001.1003
141. Rua, G. H., Speranza, P. R., Vaio, M., & Arakaki, M. (2010). A phylogenetic analysis of the genus *Paspalum* (Poaceae) based on cpDNA and morphology. *Plant Syst Evol*, 288(3-4), 227-243. doi:10.1007/s00606-010-0327-9

142. Rusak, O. O., Petrashchuk, V. I., Panchuk, I. I., & Volkov, R. A. (2016). Molecular organization of 5S rDNA in two Ukrainian populations of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Bull Vavilov Soc Genet Breed Ukraine*, 14(2), 216-220. doi:10.7124/visnyk.utgis.14.2.691
143. Saarela, J. M., Liu, Q., Peterson, P. M., Soreng, R. J. & Paszko, B. (2010). *Phylogenetics of the grass' Aveneae-type plastid DNA clade' (Poaceae: Pooideae, Poeae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequence data. Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledons*. Aarhus: Aarhus University Press.
144. Saini, A., & Jawali, N. (2009). Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Syst Evol*, 280(3-4),187-206. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4
145. Schneeberger R. G., Creisse, G. P., & Cullis, C. A. (1989). Chromosomal and molecular analysis of 5S RNA gene organization in the flax, *Linum usitatissimum*. *Gene*, 83(1), 75-84. doi:10.1016/0378-1119(89)90405-8
146. 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. (2018). Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl Acids Res*, 46(6), 301-3033. doi: 10.1093/nar/gky163
147. Singh, D., & Singh, M. (2001). Organization of 5S ribosomal RNA genes in tea (*Camellia sinensis*). *Genome*, 44(1), 143-146. doi:10.1139/g00-095
148. Singh, D., & Ahuja, P. S. (2006). 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification. *Genome*, 49(1), 91-96. doi:10.1139/g05-065
149. Šmarda, P., & Stančík, D. (2006). Ploidy level variability in South American fescues (*Festuca* L., Poaceae): use of flow cytometry in up to 5 ½ -year-old caryopses and herbarium specimens. *Plant Biol*, 8(1), 73-80. doi:10.1055/s-2005-872821
150. Soreng, R. J., Davis, J. I., & Voionmaa, M. A. (2007). A phylogenetic analysis of Poaceae tribe Poeae sensu lato based on morphological characters and

sequence data from three plastid-encoded genes: evidence for reticulation, and a new classification for the tribe. *Kew Bull*, 62(3), 425-454.

151. Soreng, R. J., Peterson, P. M., Romschenko, K., Davidse, G., Zuloaga, F. O., Judziewicz, E. J., Filgueiras, T. S., Davis, J. I., & Morrone, O. (2015). A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *J Syst Evol*, 53(2), 117-137. doi:10.1111/jse.12150

152. Soreng, R. J., Peterson, P. M., Romaschenko, K., Davidse, G., Teisher, J. K., Clark, L. G., Barberá, P., Gillespie, L. J., & Zuloaga, F. O. (2017). A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. *J Syst Evol*, 55(4), 259-290. doi:10.1111/jse.12262

153. Souto, D. P. F., Catalano, S. A., Tosto, D., Bernasconi, P., Sala, A., Wagner, M., & Corach, D. (2006). Phylogenetic relationships of *Deschampsia antarctica* (Poaceae): insights from nuclear ribosomal ITS. *Plant Syst Evol*, 261, 1-9. doi:10.1007/s00606-006-0425-x.

154. Rajjicic, T. S., Lübberstedt, T., Jensen, L. B., Scholz, U., Weber, W. E., Graner, A., & Dehmer, K. J. (2015). Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for allele quantification in *Lolium* (Poaceae): development and first applications. In *Molecular Breeding of Forage and Turf* (pp. 143-163). Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-319-08714-6\_13

155. Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1994). Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In *Plant molecular biology manual* (pp. 183-190). Springer, Dordrecht.

156. Stebbins, G. L. (1982). Major trends of evolution in the Poaceae and their possible significance. *Grasses and grasslands: systematics and ecology*, 1-36.

157. Stebbins, G. L. (1985). Polyploidy, hybridization and the invasion of new habitats. *Ann Mo Bot Gard*, 72, 824-832. doi:10.2307/2399224

158. Takhtajan, A. L. (1966). *System and phylogeny of flowering plants*. «Nauka», Leningrad.

159. Takhtajan, A. L. (1980). Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *Bot Rev*, 46(3), 225-359.
160. Thomas, H. M., Morgan, W. G., & Humphreys, M. W. (2003). Designing grasses with a future-combining the attributes of *Lolium* and *Festuca*. *Euphytica*, 133(1), 19-26. doi:10.1023/A:1025694819031
161. Thomas, H., & Humphreys, M. O. (1991). Progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. *J Agric Sci*, 117(1), 1-8. doi:10.1017/S0021859600078916
162. Tkach, N., Schneider, J., Döring, E., Wölk, A., Hochbach, A., Nissen, J., Winterfeld, G., Meyer, S., Gabriel, J., Hoffmann M. H. & Röser, M. (2019). Phylogeny, morphology and the role of hybridization as driving force of evolution in grass tribes Aveneae and Poeae (Poaceae). *bioRxiv* 707588, doi:10.1101/707588
163. Torrecilla, P., & Catalán, P. (2002). Phylogeny of broad-leaved and fine-leaved *Festuca* lineages (Poaceae) based on nuclear ITS sequences. *Syst Bot*, 27(2), 241-251. doi:10.1043/0363-6445-27.2.241
164. Tsvelev, N. N. (1976). *Cereals of the USSR*. «Наука», Ленинград.
165. Tsvelev, N. N. (1987). *The system of cereals (Poaceae) and their evolution*. «Nauka», Leningrad.
166. Tynkevich, Y. O., & Volkov, R. A. (2014a). Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol Genet*, 48(1), 1-6. doi:10.3103/S0095452714010095
167. Tynkevich, Y. O., & Volkov, R. A. (2014b). Novel structural class of 5S rDNA of *Rosa wichurana* Crep. *Dopov Nac akad nauk Ukr*, 5, 143-148.
168. Tynkevich, Y. O., Nevelska, A. O., Chorney I. I. & Volkov R. A. (2015). Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *Bull Vavilov Soc Genet Breed Ukraine*, 13(1), 81-87.
169. Tynkevich, Y. O., & Volkov, R. A. (2019). 5S Ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol Genet*, 53, 459-466. doi:10.3103/S0095452719060100



170. Udovicic, F., McFadden, G. I., & Ladiges, P. Y. (1995). Phylogeny of *Eucalyptus* and *Angophora* based on 5S rDNA spacer sequence data. *Mol Phylogenet Evol*, 4(3), 247-256. doi:10.1006/mpev.1995.1023
171. Vaillant, I., Tutois, S., Cuvillier, C., Schubert, I., & Tourmente, S. (2007). Regulation of *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant Cell Physiol*, 48(5), 745-752. doi:10.1093/pcp/pcm043
172. Vannini, A. (2013). A structural perspective on RNA polymerase I and RNA polymerase III transcription machineries. *Biochim Biophys Acta*, 1829, 258-264. doi:10.1016/j.bbagr.2012.09.009
173. Venkateswarlu, K., Lee, S. W., & Nazar, R.N. (1991). Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene*, 105(2), 249-253. doi:10.1016/0378-1119(91)90158-8
174. Volkov, A. R., & Panchuk, I. I. (2014). 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Bull Vavilov Soc Genet Breed Ukraine*, 1, 3-11.
175. Volkov, R. A., Zanke, C., Panchuk, I. I., & Hemleben, V. (2001). Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. Petota): application for molecular phylogeny and breeding. *Theor Appl Genet*, 103(8), 1273-1282. doi:10.1007/s001220100670
176. Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Borisjuk, L. G., & Borisjuk, M. V. (2003). Plant rDNA: Organization, evolution, and use. *Cytol Genet*, 37(1), 68.
177. Volkov, R. A., Medina, F. J., Zentgraf, U., & Hemleben, V. (2004). Molecular cell biology: organization and molecular evolution of rDNA, nucleolar dominance, and nucleolus structure. *Progr Bot*, 65, 106-146.
178. Volkov, R. A., Kozeretska, I. A., Kyryachenko, S. S., Andreev, I. O., Maidanyuk, D. N., Parnikoza, I. Yu., & Kunakh, V. A. (2010). Molecular evolution and variability of ITS1 and ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the Maritime Antarctic. *Polar Sci*, 4(3), 469-478. doi: 10.1016/j.polar.2010.04.011.

179. Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Borisjuk, N. V., Hosiawa-Baranska, M., Maluszynska, J., & Hemleben, V. (2017). Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol*, 17(1), 1-15. doi:10.1186/s12870-017-0978-6.
180. Wei, L., Liu, B., Zhang, C., Yu, Y., Yang, X., Dou, Q., & Dong, Q. (2020). Identification and characterization of satellite DNAs in *Poa* L. *Mol Cytogenet*, 13(1), 1-8. doi:10.1186/s13039-020-00518-x
181. White, R. J. (2011). Transcription by RNA polymerase III: more complex than we thought. *Nature Rev Genet*, 12, 459-463. doi:10.1038/nrg3001
182. Winterfeld, G., Schneider, J., & Röser, M. (2009). Allopolyploid origin of Mediterranean species in *Helictotrichon* (Poaceae) and its consequences for karyotype repatterning and homogenisation of rDNA repeat units. *System Biodivers*, 7(3), 277-295. doi:10.1017/s1477200009003041
183. Wolfe, A. D., & Liston, A. (1998). Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In *Molecular systematics of plants II* (pp. 43-86). Springer, Boston, MA. doi:10.1007/978-1-4615-5419-6\_2
184. Wouw, M. V. D., Dijk, P. V., & Huiskes, A. H. (2008). Regional genetic diversity patterns in Antarctic hairgrass (*Deschampsia antarctica* Desv.). *J Biogeogr*, 35(2), 365-376. doi.:10.1111/j.1365-2699.2007.01784.x.
185. Yamada, T. (2011). *Festuca*. In: Kole C. (eds) *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, Springer, Berlin: Heidelberg, 2011.
186. Yang, C. R., Baum, B. R., Johnson, D. A., Zhang, H. Q., & Zhou, Y. H. (2019). Molecular diversity of the 5S nuclear ribosomal DNA in *Campeiostrachys* with StHY haplome constitution. *J Syst Evol*, 58(1), 69-76. doi:10.1111/jse.12484
187. Yen, C., Yang, J. L., & Baum, B. R. (2005). *Douglasdeweya*: a new genus, with new species and a new combination (Triticeae: Poaceae). *Can J Bot*, 83, 413-419. doi: 10.1139/b05-018
188. Zhu, X. Y., Cai, D. T., & Ding, Y. (2008). Molecular and cytological characterization of 5S rDNA in *Oryza* species: genomic organization and phylogenetic implications. *Genome*, 51(5), 332-340. doi:10.1139/G08-016