

УДК 577.113.5/582.542.1

## МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК І ТАКСОНОМІЧНИЙ СТАТУС *AVENELLA FLEXUOSA* (L.) DREJER (РОАСЕАЕ)

О.О. ІЩЕНКО<sup>1</sup>, В.М. МЕЛЬНИК<sup>1,2</sup>, І.Ю. ПАРНІКОЗА<sup>2,3</sup>, В.В. БУДЖАК<sup>1</sup>,  
І.І. ПАНЧУК<sup>1</sup>, В.А. КУНАХ<sup>2</sup>, Р.А. ВОЛКОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича МОН України, вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58012, Україна

<sup>2</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

<sup>3</sup> ДУ Національний антарктичний науковий центр МОН України, бульвар Тараса Шевченка, 16, Київ, 01601, Україна

E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

*Авінелла звивиста*, *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (також відома як щучник звивистий (*Deschampsia flexuosa* (L.) Trin.), або лерхенфельдія звивиста (*Lerchenfeldia flexuosa* (L.) Schur)) – вид багаторічних трав'янистих рослин родини Злакові (Poaceae), який широко розповсюджений на території Євразії, Африки, Північної та Південної Америки. Приналежність цього виду до роду *Deschampsia* протягом довгого часу залишається відкритим питанням. Враховуючи, що порівняння 5S рДНК є зручним інструментом у молекулярній таксономії рослин, ми клонували та сиквенували цю ділянку геному *A. flexuosa* і визначили генетичні дистанції між цим видом та іншими видами триби Pooae. Встановлено, що в геномі *A. flexuosa* присутні щонайменше два структурні класи повторів 5S рДНК. Спейсерні ділянки у складі 5S рДНК *A. flexuosa* та *D. antarctica* мають низький рівень подібності, який не перевищує рівень подібності з представниками кількох інших родів триби Pooae. Клони 5S рДНК *A. flexuosa* та *D. antarctica* утворюють дві окремі клади на філодендрограмі. На загал отримані результати свідчать на користь виділення *A. flexuosa* в окремий рід *Avenella*.

**Ключові слова:** молекулярна еволюція і систематика, міжгенний спейсер 5S рДНК, *Avenella*, *Deschampsia*, Pooae.

**Вступ.** Авінелла звивиста – широко розповсюджений на території Євразії, Африки, Північної та Південної Америки вид багаторічних трав'янистих рослин, який належить до триби Pooae родини Злакові (Poaceae). Хоча цей

вид згадується під назвою *Aira flexuosa* L. ще у першому виданні Species Plantarum [1], його таксономічний статус все ще викликає дискусії. У першій половині XIX ст., з огляду на морфологічну подібність, авінеллу звивисту було включено до роду *Deschampsia* P. Beauv. [2] під назвою *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin., 1836, хоча деякі ботаніки пропонували виділити її в окремий одновидовий рід *Avenella* (*A. flexuosa* (L.) Drejer, 1838) або *Lerchenfeldia* (*L. flexuosa* (L.) Schur, 1866) [3, 4]. Пізніше, спираючись на дослідження морфології та анатомії листків, коренів та колосків, а також будови хромосом Albers також вважав, що цей вид має бути перенесений у рід *Avenella* [5–7]. Проте, до початку XXI ст. багато ботаніків продовжували розглядати його у складі роду *Deschampsia* [4, 8, 9].

Нова ера у систематиці злаків розпочалася після широкого впровадження молекулярних методів. Зокрема було сиквенувано кілька пластидних генів та спейсерні ділянки (ITS1/2, ETS) ядерної 45S рДНК [10–14]. Зокрема, використання хпДНК дозволило розділити трибу Pooae на дві великі групи. Водночас було встановлено, що філогенетичні дерева, отримані для хпДНК, не відповідають таким для ділянки ядерного геному ITS1/2. Це пояснюється широким розповсюдженням міжвидової гібридизації та сітчастої еволюції у трибі Pooae. Також було з'ясовано, що для цієї групи порівняння морфологічних ознак є малоінформативним, оскільки

© О.О. ІЩЕНКО, В.М. МЕЛЬНИК, І.Ю. ПАРНІКОЗА,  
В.В. БУДЖАК, І.І. ПАНЧУК, В.А. КУНАХ,  
Р.А. ВОЛКОВ, 2020

вони, як правило, демонструють дуже високий ступінь гомоплазії та здатні змінюватися впродовж порівняно короткого еволюційного часу [8, 12, 14–16].

Молекулярні методи було застосовано і у таксономії роду *Deschampsia* [4, 17–20]. Зокрема, для уточнення таксономічного статусу авіanelли звивистої було використано послідовності пластидного гена *trnL* та ядерної ділянки ITS1/2 [4, 17, 18, 20]. Отримані результати показали, що цей вид має бути виключений з роду *Deschampsia* і виділений в окремий рід *Avenella*. Ця точка зору була також підтверджена методами молекулярної цитогенетики, які виявили суттєву різницю між цим видом та кількома представниками роду *Deschampsia* [21].

З урахуванням цих даних останнім часом у багатьох каталогах та флорах вид наводиться під назвою *A. flexuosa*. Водночас автори згаданих досліджень 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 [4]. Відповідно, з огляду на сітчасту еволюцію триби Pooae, видається очевидним, що для прояснення філогенії та дослідження можливого гібридного походження ряду таксонів необхідно залучити більше ядерних маркерів [4, 12].

У дослідженнях молекулярної еволюції та таксономії покритонасінних рослин широко використовується 5S рДНК (тобто ділянка геному, яка кодує 5S рРНК) [22–29], яка належить до класу тандемно організованих повторюваних послідовностей. Кожна повторювана одиниця (повтор) 5S рДНК складається з консервативної кодувальної ділянки та варіабельного міжгенного спейсера (intergenic spacer, IGS) [22, 30]. Завдяки високій мінливості, IGS зручно використовувати для з'ясування філогенетичних зв'язків в межах роду [22, 23, 31–33], або навіть між різними популяціями одного виду [26, 34]. Раніше порівняння 5S рДНК було успішно використано для прояснення філогенії кількох родів родини Злакові [28, 34–39].

Враховуючи, що у авіanelли звивистої молекулярна організація 5S рДНК все ще залишається не описаною, для з'ясування таксономічного статусу цього виду ми вирішили кло-

нувати і сиквенувати 5S рДНК й провести порівняльний аналіз її будови у *A. flexuosa* та у споріднених видів, які належать до триби Pooae.

**Матеріали та методи.** Матеріалом для дослідження були гербаризовані зразки *A. flexuosa* з двох різних популяцій: Українські Карпати (перевал Шурдан, г. Магура, Вишнецький р-н, Чернівецька обл.; N47.963 E25.253) та Польща (околиці с. Бжезіна, Ельблонзький повіт, Вармінсько-Мазурське воєводство; N54.267 E19.617). Сумарну ДНК екстрагували з гербаризованої листової тканини рослин за модифікованою методикою виділення ДНК з цетавлоном [40].

Клонування та сиквенування 5S рДНК здійснювали як було описано нами раніше [34] з незначними модифікаціями. Для ПЛР ампліфікації повторюваної ділянки 5S рДНК використовували пару праймерів, Pr5S-L-Ph (5'-GCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3') + Pr5S-R-Not (5'-CATTGC GGCCGCTTAACCTCGGAGTTCTGATGGGA-3'), які комплементарні до консервативної ділянки, що кодує 5S рРНК у покритонасінних рослин. Застосовані праймери забезпечують ампліфікацію повного IGS та фланкуючих ділянок кодувальної послідовності. Праймер Pr5S-L-Ph містив на 5'-кінці фосфатну групу, що дозволяє збільшити ефективність лігування при клонуванні ПЛР-продуктів за тупим кінцем, а праймер Pr5S-R-Not – додатковий сайт впізнання ендонуклеази рестрикції NotI (GCGGCCGC), який було використано при клонуванні.

Реакційна суміш для ПЛР загальним об'ємом 25 мкл містила такі компоненти: 10–30 нг ДНК, 1,0 од. акт ДНК-полімерази (Phusion DNA polymerase, Thermoscientific), 0,1 мМ суміші дезоксирибонуклеотидфосфатів, 1×буфер для ПЛР та 0,5 мкМ кожного з двох праймерів. ПЛР проводилася з використанням ампліфікатора BioRad T100 (BioRad, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95 °С, 2 хв; (2) денатурація ДНК – 95 °С, 45 с; (3) гібридизація праймерів – 58 °С, 30 с; (4) синтез ДНК – 72 °С, 1 хв; (5) закінчення ампліфікації – 72 °С, 8 хв; припинення реакції – 4 °С; загальна кількість циклів ампліфікації – 35.

Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу у 1,5%-вому агарозному гелі та використовували для клонування. Для цього їх

обробляли ендонуклеазою рестрикції NotI та лігували в плазмідний вектор *pBluescript SK*, оброблений ендонуклеазами рестрикції SmaI та Eco52. Трансформацію продуктів лігування у компетентні клітини лінії *Escherichia coli* XL-blue проводили методом електропорації з використанням пристрою E. coli Pulser («BioRad», США). Колонії, які містили рекомбінантні плазмиди, виявляли методом blue-white colony selection. Плазмиди виділяли методом лужного лізису [41].

Наявність вставки у плазмідах перевіряли, застосовуючи ПЛР із стандартними праймерами M13/pUC forward (For) та reverse (Rev), сайти гібридизації яких знаходяться в плазмідній ДНК з двох боків від полілінкеру. Отримані ПЛР-продукти сиквенували на фірмі GATC (Німеччина).

Первинну обробку отриманих нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNA-STAR. Отримані послідовності задепоновано у базі даних Genbank (табл. 1). Вирівнювання

нуклеотидних послідовностей проводили, застосовуючи алгоритм Clustal W [42]. Філогенетична дендрограма була побудована за допомогою плагіну RAxML [43] у середовищі програми Geneious Prime 2019.0.4.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Електрофоретичний аналіз отриманих ПЛР-продуктів ділянки 5S рДНК *A. flexuosa* двох популяцій показав, що їх довжина складає 310 нп. У раніше дослідженого виду *D. antarctica*, типового представника роду *Deschampsia* [4, 20], довжина відповідного ПЛР-продукту складала 350 нп для трьох різних популяцій [34]. Отже, ці два види відрізняються за довжиною повторюваної ділянки 5S рДНК.

В ході подальших експериментів з клонування для обох популяцій *A. flexuosa* було відібрано по декілька рекомбінантних клонів. Розмір вставки у цих клонах було оцінено за допомогою ПЛР з використанням праймерів M13/pUC For та Rev. За результатами електрофоретичного розділення отриманих ПЛР-продуктів було встановлено, що вони мають

Таблиця 1. Характеристика IGS 5S рДНК видів триби Pooae

Вид	Клон		IGS		Посилання
	назва	GenBank Acc. No	довжина, нп	вміст GC-пар, %	
<i>Avenella flexuosa</i>	Avfle1	MT335693	173	55,49	Ця стаття
	Avfle4	MT335694	173	54,91	Ця стаття
	Avfle8	MT335696	176	56,82	Ця стаття
	Avfle7	MT335695	190	53,68	Ця стаття
	Avfle9	MT335697	176	56,82	Ця стаття
<i>Helictochloa bromoides</i>	Hebro	AJ390158.1	187	54,01	[35]
<i>Dactylis glomerata</i>	Daglo1	KF743553	140	53,57	[38]
	Daglo3	KF743555.1	140	53,57	[38]
	<i>Avena macrostachya</i>	Avmac1	AJ390215.1	172	54,65
	Avmac2	EF064638.1	186	53,23	[36]
<i>Trisetum spicatum</i>	Trspi	AJ390233.1	175	56,00	[35]
<i>Helictotrichon convolutum</i>	Hecon	AJ390078.1	178	56,74	[35]
<i>Deschampsia antarctica</i>	DeantA1.11	MH071971	204	53,43	[34]
	DeantA8.10	MH071973	203	54,90	[34]
	DeantA8.5	MH071972	197	54,59	[34]
	DeantA10.11	MH071974	203	54,19	[34]
	DeantA1.1	MH071970	199	55,28	[34]
	DeantA10.13	MN519101	211	53,55	Ця стаття
<i>Lolium perenne</i>	Loper4	MT335698	189	47,62	[46]
	Loper7	MT335699	188	46,81	[46]
	<i>Phalaris coerulea</i>	Phcoe	Y09573.1	188	48,94
<i>Phleum pratense</i>	Plpra1	MT335700	208	52,88	[47]
	Plpra3	MT335701	209	53,11	[47]

однакову довжину для всіх проаналізованих клонів. Два клони для *A. flexuosa* з Карпат та три клони – з Польщі було сиквеновано.

Аналіз отриманих послідовностей виявив, що всі сиквеновані клони містять IGS 5S рДНК, фланкований з обох боків фрагментами кодуючої ділянки включно з послідовностями праймерів Pr5S-L-Ph та Pr5S-R-Not. У *A. flexuosa* довжина IGS знаходиться в діапазоні від 173 до 190 нп (табл. 1); у *D. antarctica* довжина IGS становить 197–204 нп [34], а в інших представників триби *Roeae* – 88–329 нп [35, 36, 38]. Така різноманітність в довжині свідчить, що у видів цієї триби впродовж еволюції неодноразово відбувались делеції/інсерції у IGS 5S рДНК.

Порівняння отриманих послідовностей показало, що два клони (Avfle1, Avfle4) 5S рДНК *A. flexuosa* з України мають однакову довжину

IGS, а рівень подібності між ними становить 94,8 % (табл. 2). У *A. flexuosa* з Польщі, два клони (Avfle7, Avfle9) виявились ідентичними, тоді як третій (Avfle8) помітно відрізнявся від них, демонструючи рівень подібності 81,2 %. Цікаво, що цей клон є більш подібним до клонів з українського зразка *A. flexuosa* – 87,9–90,5 %. Серед усіх клонів *A. flexuosa*, 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 (рис. 1). На загал, отримані дані свідчать, що в геномі *A. flexuosa* присутні як мінімум два структурні класи повторів 5S рДНК. До першого класу можна віднести клони Avfle1, Avfle4 та Avfle8, а до другого – Avfle7, Avfle9. Для більш детальної оцінки поліморфізму 5S рДНК *A. flexuosa* необхідні подальші дослідження із залучен-

Таблиця 2. Рівень подібності (%) IGS 5S рДНК видів триби *Roeae*

Назва клону	Avfle1	Avfle4	Avfle8	Avfle7	Avfle9	Hebro	Daglo1	Daglo3	Avmac1	Avmac2	Trspi	Hecon	DeantA1.11	DeantA8.10	DeantA8.5
Avfle1	100	94,8	90,5	86,4	86,4	61,0	50,5	49,3	60,9	59,2	68,1	68,1	59,6	60,6	63,2
Avfle4		100	87,9	88,1	88,1	62,9	52,9	51,9	62,3	60,7	69,0	69,5	60,9	61,8	65,0
Avfle8			100	81,2	81,2	63,1	51,6	50,5	62,0	62,2	69,1	69,9	62,5	63,5	66,2
Avfle7				100	100	60,2	51,3	49,2	60,1	58,4	67,9	67,4	59,3	60,3	63,4
Avfle9					100	60,2	51,3	49,2	60,1	58,4	67,9	67,4	59,3	60,3	63,4
Hebro						100	53,5	53,5	60,0	62,5	68,4	69,3	61,4	62,3	65,7
Daglo1							100	97,1	56,3	55,9	54,4	53,8	49,0	50,0	52,8
Daglo3								100	54,0	55,4	52,8	52,2	47,6	48,5	51,3
Avmac1									100	66,7	65,4	65,8	54,9	55,8	58,3
Avmac2										100	67,5	66,8	62,0	63,0	64,9
Trspi											100	81,0	65,4	66,3	69,7
Hecon												100	66,0	67,0	68,8
DeantA1.11													100	98,5	90,7
DeantA8.10														100	92,2
DeantA8.5															100
DeantA10.11															
DeantA1.1															
DeantA10.13															
Loper4															
Loper7															
Phcoe															
Plpra1															
Plpra3															

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

нями більшої кількості зразків, які мають різне географічне походження.

Для того, щоб оцінити генетичну дистанцію між *A. flexuosa* та *D. antarctica*, 5S рДНК цих видів було порівняно між собою. Раніше в геномі *D. antarctica* нами було знайдено два структурні класи IGS, що суттєво відрізняються за послідовністю [34]. В ході подальших досліджень для популяції *D. antarctica* з о. Кінг-Джордж ми виявили новий, третій клас IGS. Відповідно, для порівняння з *A. flexuosa* було використано три класи (клас 1: клони DeantA1.11, DeantA8.5, DeantA8.10, DeantA10.11; клас 2: DeantA1.1; клас 3: DeantA10.13) 5S рДНК *D. antarctica* (рис. 1). Встановлено, що рівень подібності IGS *A. flexuosa* та *D. antarctica* знаходиться у межах від 55,9 до 66,2 %. Тобто, ці два види суттєво відрізняються між собою за нуклеотидною послідовністю IGS.

Для того, щоб оцінити подібність 5S рДНК *A. flexuosa* та *D. antarctica* у більш широкому

таксономічному контексті, ми порівняли між собою послідовності IGS цих двох видів та кількох інших представників триби Pooae, які наявні у Genbank та/або були отримані нами раніше (рис. 2). Було встановлено, що найбільшу подібність з *A. flexuosa* та *D. antarctica* демонструють послідовності *Trisetum spicatum* та *Helictotrichon convolutum* – 67,4–69,9 % та 63,6–69,7 %, відповідно (табл. 2). Отже, генетична дистанція між *A. flexuosa* та *D. antarctica* є більшою, ніж між кожним з цих видів та представниками родів *Trisetum* та *Helictotrichon*. Цей результат свідчить, що *A. flexuosa* та *D. antarctica* мають розглядатись як представники різних родів.

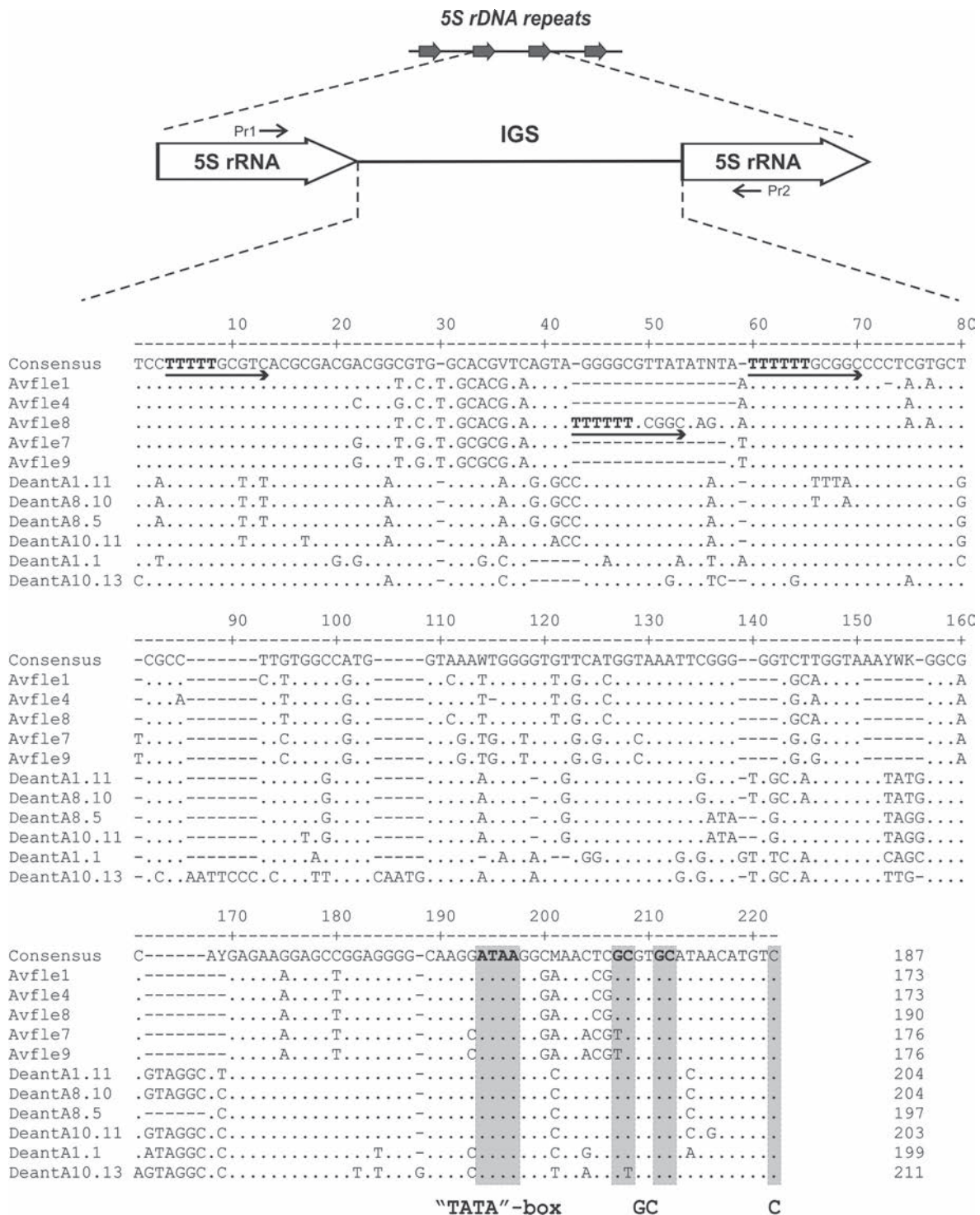
Відомо, що у вищих рослин IGS 5S рДНК містить зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III. Зокрема, в *Arabidopsis thaliana* ці елементи представлені АТ-багатим мотивом ТАТАТА, динуклеотидом GC та нуклеотидом С, які розташовані, відповідно, на відстані –28, –13, та –1 перед початком кодувальної ділянки [30, 44]. Подібні консервативні мотиви знайдені в інших дводольних [26, 27, 45] та однодольних рослин [46, 47].

Порівняння послідовностей IGS *A. flexuosa* та споріднених видів триби Pooae показало присутність консервативного мотиву АТАА у позиції –29 перед початком кодувальної ділянки (рис. 1). У більшості видів динуклеотид GC присутній двічі – у позиціях –12 та –16. Проте, у IGS *H. bromoides* мотив GC знайдено лише у позиції –14, а у двох клонів *A. flexuosa* – лише у позиції –12. Консервативний нуклеотид С знайдено в позиції –1 в усіх порівнювальних видів.

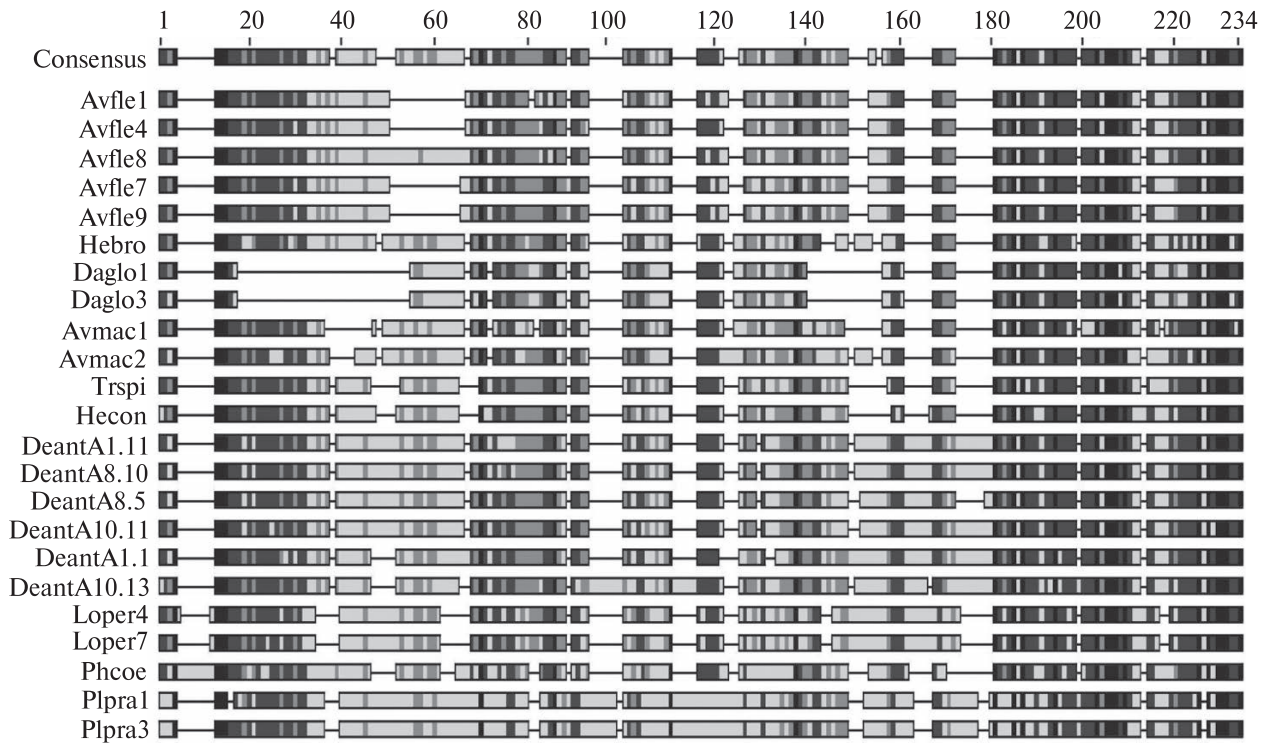
Крім того, на початку IGS у *A. flexuosa*, як і у більшості покритонасінних рослин, знаходиться оліго-Т мотив, який імовірно бере участь у термінації транскрипції. Цей мотив входить до складу субповтору ТТТТТGCGКС, дві копії якого знайдено у більшості клонів *A. flexuosa*, за виключенням клону Avfle8, у якого наявні три копії цього субповтору (рис. 1). У всіх досліджених клонах *D. antarctica* оліго-Т мотив присутній двічі.

Використовуючи отримані послідовності 5S рДНК, ми побудували ML-дендрограму, яка відображає філогенетичні відносини досліджуваних видів (рис. 3). На цій дендрограмі клони

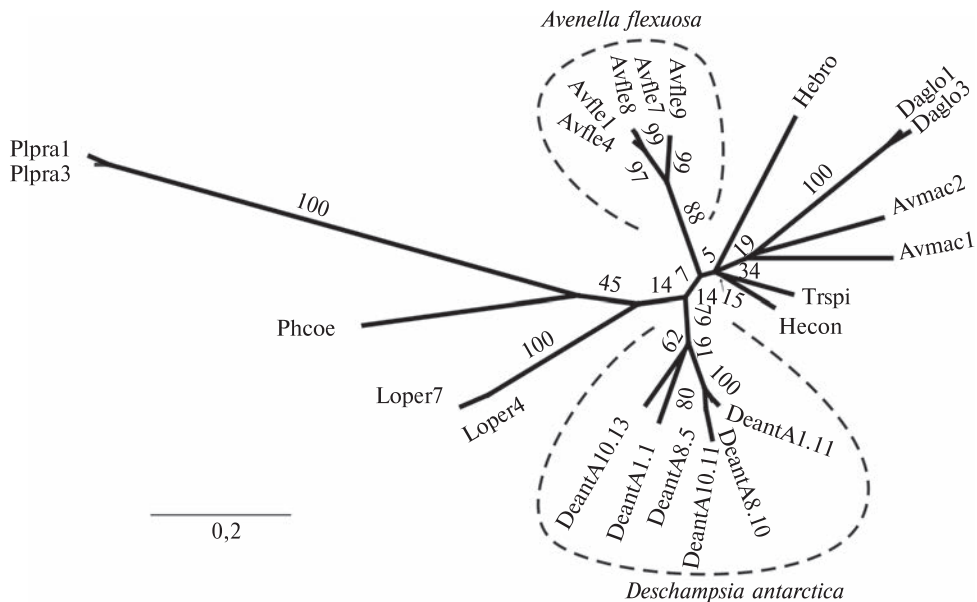
DeantA10.11	DeantA1.1	DeantA10.13	Lope4	Lope7	Phoe	Ppra1	Ppra3
61,4	58,7	56,0	57,5	58,3	51,8	41,6	42,1
63,1	60,4	57,1	58,3	59,1	52,0	40,9	42,1
64,3	61,2	57,7	58,0	58,8	52,5	43,3	41,4
61,5	61,2	55,9	57,9	57,2	55,3	41,9	43,7
61,5	61,2	55,9	57,9	57,2	55,3	41,9	42,3
64,3	58,7	59,2	56,9	55,7	51,2	41,0	41,9
50,7	49,3	44,1	44,2	44,4	42,3	31,6	31,6
48,8	48,3	42,3	42,1	42,9	42,9	31,1	31,1
56,6	54,1	52,5	54,0	53,3	48,2	40,8	41,2
62,0	60,8	55,7	52,0	52,7	50,0	40,5	41,4
62,7	68,8	65,4	54,7	54,0	57,9	43,5	44,4
65,9	65,7	63,6	59,2	58,0	54,0	42,6	43,5
90,2	79,2	75,7	61,2	59,6	52,3	44,6	45,5
91,7	80,7	77,1	61,2	60,6	52,3	44,6	45,5
93,6	76,3	72,5	61,8	61,1	56,5	41/8	42,7
100	77,8	74,8	59,8	59,1	54,4	43,4	44,3
	100	76,6	59,0	57,9	54,2	43,0	43,9
		100	57,0	57,3	50,2	46,4	47,3
			100	96,3	51,9	40,5	41,9
				100	51,0	38,9	40,3
					100	41,2	42,5
						100	96,2
							100



**Рис. 1.** Структурна організація міжгенного спейсера 5S рДНК *Avenella flexuosa* (Avfle) та *Deschampsia antarctica* (Deant). Pr1 та Pr2 – праймери 5S-L та 5S-R, відповідно. Виділено потенційні зовнішні елементи промотора; жирним шрифтом вказано оліго-Т послідовність термінатора; стрілками позначено розташування субповторів у IGS *A. flexuosa*. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1



**Рис. 2.** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК видів триби Rorae. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1. Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: □ – менше 60 %, ▒ – від 60 до 80 %, ▓ – від 80 до 100 %, ■ – 100 %



**Рис. 3.** Філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК представників триби Rorae методом максимальної правдоподібності з використанням GTR моделі заміншення. Цифри на дендрограмі показують величину бутстреп-підтримки, яка розрахована у відсотках для 1000 реплікацій

*A. flexuosa* та *D. antarctica* утворюють окремі клади з високою бутстреп підтримкою, що цілком узгоджується з думкою про необхідність виділення авіnellі звивистої до окремого роду *Avenella*.

Слід зазначити, що на отриманій нами дендрограмі поєднання представників різних родів у клади має низьку бутстреп-підтримку. Тобто, наявний матеріал не дозволяє розкрити філогенетичні відносини між різними родами триби Poeae. Причиною цього може бути висока швидкість еволюції IGS та/або недостатня кількість послідовностей, використана при побудові дендрограми. Аналогічна ситуація була раніше виявлена при застосуванні для побудови дендрограм послідовностей ITS1/2 ядерної 45S рДНК [16].

**Висновки.** В геномі *A. flexuosa* присутні як мінімум два структурні класи повторів 5S рДНК. IGS *A. flexuosa* та *D. antarctica* мають низький рівень подібності, який не перевищує рівень подібності з представниками кількох інших родів, які належать до триби Poeae. Клонні IGS *A. flexuosa* та *D. antarctica* утворюють дві окремі клади на дендрограмі. На загал отримані результати свідчать на користь виділення *A. flexuosa* в окремий рід *Avenella*.

Автори висловлюють щире подяку І.О. Андрєєву (Інститут молекулярної біології і генетики НАН України) за участь у обговоренні отриманих результатів.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей і тварин в якості об'єктів досліджень.

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

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

MOLECULAR ORGANIZATION  
OF 5S RIBOSOMAL DNA AND TAXONOMIC  
STATUS OF *AVENELLA FLEXUOSA* (L.)  
DREJER (POACEAE)

O.O. Ishchenko, V.M. Mel'nyk, I.Y. Parnikozha,  
V.V. Budzhak, I.I. Panchuk, V.A. Kunakh, R.A. Volkov

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University  
Ministry of Education and Science of Ukraine  
Kotsiubynski str. 2, 58012 Chernivtsi, Ukraine

Institute of Molecular Biology and Genetics,  
National Academy of Sciences of Ukraine  
Zabolotnogo str., 150, 03143 Kyiv, Ukraine  
State Institution National Antarctic Scientific Centre,  
Ministry of Education and Science of Ukraine  
Boulevard of Taras Shevchenko 16, 01601 Kyiv, Ukraine  
E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

The wavy hair-grass, *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (also known as *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin. or *Lerchenfeldia flexuosa* (L.) Schur), is a species of perennial herbaceous plants of the Poaceae family that is widespread in Eurasia, Africa, North and South America. Whether this species belongs to the *Deschampsia* genus has long been an open question. Taking into account that the 5S rDNA comparison is a convenient tool in the molecular taxonomy of plants, we cloned and sequenced this region of the *A. flexuosa* genome and evaluated the genetic distances between this species and other species of the Poeae tribe. It has been found that at least two structural classes of 5S rDNA repeats are present in the *A. flexuosa* genome. The spacer regions in the 5S rDNA of *A. flexuosa* and *D. antarctica* have a low level of similarity that does not exceed the level of similarity with representatives of several other genera of the Poeae tribe. The 5S rDNA clones of *A. flexuosa* and *D. antarctica* form two distinct clades on the phyllo dendrogram. Taking together, our results support the idea that *A. flexuosa* belongs to a separate genus *Avenella*.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ  
5S РИБОСОМНОЙ ДНК И  
ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ СТАТУС  
*AVENELLA FLEXUOSA* (L.) DREJER (POACEAE)

О.О. Ищенко, В.М. Мельник, И.Ю. Парникоза,  
В.В. Буджак, И.И. Панчук, В.А. Кунах, Р.А. Волков

Овсик извилистый, *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (также известный как луговик извилистый (*Deschampsia flexuosa* (L.) Trin.), или лерхенфельдия извилистая (*Lerchenfeldia flexuosa* (L.) Schur)) – вид многолетних травянистых растений семейства Poaceae, который широко распространен на территории Евразии, Африки, Северной и Южной Америки. Принадлежность этого вида к роду *Deschampsia* в течение долгого времени остается открытым вопросом. Учитывая, что сравнение 5S рДНК является удобным инструментом в молекулярной таксономии растений, мы клонировали и секвенировали этот участок генома *A. flexuosa* и определили генетические дистанции между этим видом и другими видами трибы Poeae. Установлено, что в геноме *A. flexuosa* присутствуют не менее двух структурных классов повторов 5S рДНК. Спейсерные участки в составе 5S рДНК *A. flexuosa* и *D. antarctica* имеют низкий



уровень сходства, который не превышает уровень сходства с представителями нескольких других родов трибы Poeae. Клоны 5S рДНК *A. flexuosa* и *D. antarctica* образуют две отдельные клады на филодендрограмме. В целом полученные результаты свидетельствуют в пользу выделения *A. flexuosa* в отдельный род *Avenella*.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Linnaeus, C., *Species Plantarum*. Holmiae: Impensis Laurentii Salvii, 1753. doi:10.5962/bhl.title.669.
- Palisot de Beauvois, A.M.F.J., *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, 1812.
- Mosyakin, S.L., Fedoronchuk, M.M., *Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist*, Kiev: M.G. Kholodny Institute of Botany, 1999. doi: 10.13140/2.1.2985.0409.
- Chiapella, J., 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*, 2007, vol. 56, no. 1, p. 55–64. doi: 10.2307/25065735.
- Albers, F., Cytotaxonomie und B-Chromosomen bei *Deschampsia cespitosa* (L.) P.B. und verwandten Arten, *Beitr. Biol. Pflanzen*, 1972, vol. 48, pp. 1–62.
- Albers, F., Cytosystematische Untersuchungen in der Subtribus Deschampsiiinae Holub (Tribus *Aveneae* Nees). II. Die Gattungen *Vahlodea* Fr. und *Avenella* Koch, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 1972, vol. 85, pp. 279–85.
- Albers, F., Vergleichende Karyologie der Gräser-Subtriben Aristaveninae und Airinae (Poaceae-*Aveneae*), *Plant Syst. Evol.*, 1980, vol. 136, pp. 137–67.
- Quintanar, A., Castroviejo, S., and Catalán, P. Phylogeny of the tribe *Aveneae* (Pooideae, Poaceae) inferred from plastid trnT-F and nuclear ITS sequences. *Amer. J. Bot.*, 2007, vol. 94, no. 9, pp. 1554–69. doi:10.3732/ajb.94.9.1554.
- Chiapella, J., Zuloaga, F.O., A Revision of *Deschampsia*, *Avenella*, and *Vahlodea* (Poaceae, Poeae, Airinae) in South America, *Ann. Missouri Bot. Garden*, 2010, vol. 97, no 2, pp. 141–62. doi: 10.3417/2008115.
- Volkov, R.A., Panchuk, I.I., Borisjuk, L.G., and Borisjuk, M.V., Plant rDNA: Organization, evolution, and using. *Cytol. Genet.*, 2003, vol. 37, no 1, pp. 68–72.
- Davis, J.I., Soreng, R.J., 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*, 2007, vol. 23, pp. 335–48.
- Soreng, R.J., Davis, J.I., and Voionmaa, M.A., 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 Bulletin*, 2007, vol. 62, no. 3, pp. 425–54.
- Soreng, R.J., Peterson, P.M., Romschenko, K., Davise, G., Zuloaga, F.O., Judziewicz, E.J., Filgueiras, T.S., Davis, J.I., and Morrone, O.A., A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae), *J. Syst. Evol.*, 2015, vol. 53, no. 2, pp. 117–37. doi: 10.1111/jse.12150.
- Tkach, N., Schneider, J., Döring, E., Wölk, A., Hochbach, A., Nissen, J., Winterfeld, G., Meyer, S., Gabriel, J., Hoffmann M.H., and Röser, M., Phylogeny, morphology and the role of hybridization as driving force of evolution in grass tribes *Aveneae* and *Poeae* (Poaceae), 2019, *bioRxiv* 707588. doi: 10.1101/707588.
- Döring, E., Schneider, J., Hilu, K., and Röser, M., Phylogenetic Relationships in the *Aveneae*/*Poeae* Complex (*Pooideae*, Poaceae), *Kew Bulletin*, 2007, vol. 62, no. 3, pp. 407–424.
- Saarela, J.M., Liu, Q., Peterson, P.M., Soreng, R.J., and Paszko, B., 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, 2010.
- García-Suarez, R., Alonso-Blanco, C., Fernández-Carvajal, M.C., Fernández-Prieto, J.A., Roca, A., and Giraldez, R., Diversity and systematics of *Deschampsia* sensu lato (Poaceae), inferred from karyotypes, protein electrophoresis, total genomic DNA hybridization and chloroplast DNA analysis. *Plant Syst. Evol.*, 1997, vol. 205, pp. 99–110. doi: 10.1007/BF00982800.
- Souto, D.P.F., Catalano, S.A., Tosto, D., Bernasconi, P., Sala, A., Wagner, M., and Corach, D., Phylogenetic relationships of *Deschampsia antarctica* (Poaceae): insights from nuclear ribosomal ITS. *Plant Syst. Evol.*, 2006, vol. 261, pp. 1–9. doi: 10.1007/s00606-006-0425-x.
- Andreev, I.O., Spiridonova, E.V., Kyryachenko, S.S., Parnikoz, I.Yu., Maidanyuk D.N., Volkov, R.A., Kozeretka, I.A., and Kunakh, V.A., Population-genetic analysis of *Deschampsia antarctica* from two regions of Maritime Antarctica, *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.*, 2010, vol. 65, no. 4, pp. 208–210. doi: 10.3103/S0096392510040243.
- Volkov, R.A., Kozeretka, I.A., Kyryachenko, S.S., Andreev, I.O., Maidanyuk, D.N., Parnikoz, I.Yu., and Kunakh, V.A., Molecular evolution and variabil-

- ity of ITS1 and ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the Maritime Antarctic, *Polar Sci.*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 469–78. doi: 10.1016/j.polar.2010.04.011.
21. 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., and Muravenko, O.V., Comparative molecular cytogenetic characterization of seven *Deschampsia* (Poaceae) species, *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 4, e0138878. doi: 10.1371/journal.pone.0175760.
  22. Volkov, R.A., Zanke, C., Panchuk, I.I., and Hemleben, V., Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding, *Theor. Appl. Genet.*, 2001, vol. 103, no. 8, pp. 1273–82. doi: 10.1007/s001220100670.
  23. Saini, A., Jawali, N., Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications, *Plant Syst. Evol.*, 2009, vol. 280, no. 3–4, p. 187–206. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4.
  24. Garcia, S., Panero, J.L., Siroky, J., and Kovarik, A., Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family, *BMC Plant Biol.*, 2010, vol. 10, no. 1, pp. 176–95. doi: 10.1186/1471-2229-10-176.
  25. Garcia, S., Garnatje, T., and Kovarik, A. Plant rDNA database: ribosomal DNA loci information goes online, *Chromosoma*, 2012, vol. 121, no. 4, pp. 389–394. doi: 10.1007/s00412-012-0368-7.
  26. Rusak, O.O., Petrashchuk, V.I., Panchuk, I.I., and Volkov, R.A., Molecular organization of 5S rDNA in two Ukrainian populations of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*), *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*, 2016, vol. 14, no. 2, pp. 216–20.
  27. Volkov, R.A., Panchuk, I.I., Borishuk, N.V., Hosiawa-Baranska, M., Maluszynska, J., and Hemleben, V., Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*, *BMC Plant Biol.*, 2017, vol. 17, no. 1, pp. 1–15. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6.
  28. Baum, B.R., Johnson, D.A., *Lophopyrum* Á. Löve (1980), *Thinopyrum* Б. Löve (1980), *Trichopyrum* Á. Löve (1986): one, two or three genera? A study based on the nuclear 5S DNA. *Genet. Resour. Crop. Evol.*, 2018, vol. 65, pp. 161–86. doi: 10.1007/s10722-017-0519-z.
  29. Vaio, M., Mazzella, C., Guerra, M., and Speranza, P., Effects of the diploidisation process upon the 5S and 35S rDNA sequences in the allopolyploid species of the *Dilatata* group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae), *Austral. J. Bot.*, 2019, vol. 67, no. 7, pp. 521–30. doi: 10.1071/BT18236.
  30. Cloix, C., Tutois, S., Mathieu, O., Cuvillier, C., Espagnolo, M.C., Picard, C., and Tourmente, S., Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms, *Genome Res.*, 2000, vol. 10, no. 5, pp. 679–90. doi: 10.1101/gr.10.5.679.
  31. Simeone, M.C., Cardoni, S., Piredda, R., Imperatori, F., Avishai, M., Grimm, G.W., and Denk, T., Comparative systematics and phylogeography of *Quercus* section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation, *PeerJ*, 2018, vol. 6, e5793. doi: 10.7717/peerj.5793.
  32. Kolano, B.M., Cann, J., Oskędra, M., Chrapek, M., Rojek, M., Nobis, A., and Weiss-Schneeweiss, H., Parental origin and genome evolution of several eurasian hexaploid species of *Chenopodium* (Chenopodiaceae), *Phytotaxa*, 2019, vol. 392, no. 3, pp. 163–85. doi: 10.11646/phytotaxa.392.3.1.
  33. Tynkevich, Y.O., Volkov, R.A., 5S Ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application, *Cytol. Genet.*, 2019, vol. 53, no. 6, pp. 459–66. doi: 10.3103/S0095452719060100.
  34. Ishchenko, O.O., Panchuk, I.I., Andreev, I.O., Kunakh, V.A., and Volkov, R.A., Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*, *Cytol. Genet.*, 2018, vol. 52, no. 6, pp. 416–21. doi: 10.3103/S0095452719010146.
  35. Röser, M., Winterfeld, G., Grebenstein, B., and Hemleben, V. Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae), *Mol. Phylog. Evol.*, 2001, vol. 21, no. 2, pp. 198–217. doi: 10.1006/mpev.2001.1003.
  36. Peng, Y.Y., Wei, Y.M., Baum, B.R., and Zheng, Y.L., Molecular diversity of the 5S rRNA gene and genomic relationships in the genus *Avena* (Poaceae: Aveneae), *Genome*, 2008, vol. 51, no. 2, pp. 137–54. doi: 10.1139/G07-111.
  37. Baum, B.R., Edwards, T., Mamuti, M., and Johnson, D.A., Phylogenetic relationships among the polyploid and diploid *Aegilops* species inferred from the nuclear 5S rDNA sequences (Poaceae: Triticeae), *Genome*, 2012, vol. 55, no. 3, pp. 177–93. doi: 10.1139/g2012-006.
  38. Volkov, A.R., Panchuk, I.I., 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application, *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*, 2014, vol. 12, no. 1, pp. 3–11.
  39. Nani, T.F., Cenzi, G., Pereira, D.L., Davide, L.C., and Techio, V.H. Ribosomal DNA in diploid and polyploid *Setaria* (Poaceae) species: number and dis-

- tribution, *Comparative Cytogenetics*, 2015, vol., 9, no. 4, pp 645–60. doi: 10.3897/CompCytogen.v9i4.5456.
40. Porebski, S., Bailey, L.G., and Baum, B.R., Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1997, vol. 15, no. 1, pp. 8–15. doi: 10.1007/BF02772108.
41. Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T., *Molecular cloning*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
42. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucl. Acids Res.*, 1994, vol. 22, no. 22, pp. 4673–80. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
43. Stamatakis, A. RAxML Version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies, *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 9, pp. 1312–3. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
44. 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., and Probst, A.V., Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*, *Nucl. Acids Res.*, 2018, vol. 46, no. 6, pp. 3019–33. doi: 10.1093/nar/gky163.
45. Tynkevich, Y.O., Volkov, R.A., Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*, *Cytol. Genet.*, 2014, vol. 48, no. 1, pp. 1–6. doi: 10.3103/S0095452714010095.
46. Ishchenko, O.O., Panchuk, I.I., Molecular organization of 5S rDNA of perennial ryegrass *Lolium perenne* L., *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*, 2018, vol. 16, no. 2, pp. 166–73. doi: 10.7124/visnyk.utgis.16.2.1054.
47. Ishchenko, O.O., Derevenko, T.O., and Panchuk, I.I., 5S rDNA of Timothy-grass *Phleum pratense* L., *Scientific Herald of Chernivtsy University. Biology (Biological Systems)*, 2018, vol. 10, no. 2, pp. 107–12. doi: 10.31861/biosystems2018.02.107.

Надійшла в редакцію 13.06.20  
Після доопрацювання 05.07.20  
Прийнята до друку 18.11.20