

ОРГАНІЗАЦІЯ МІЖГЕННОГО СПЕЙСЕРА 5S рДНК ТА ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ В МОЛЕКУЛЯРНІЙ СИСТЕМАТИЦІ РОДУ *ACONITUM* L.

Ю.О. ТИНКЕВИЧ¹, А.В. НОВІКОВ², І.І. ЧОРНЕЙ¹, Р.А. ВОЛКОВ¹

¹ Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, 58012, Чернівці, Україна

² Національний науково-природничий музей Національної академії наук України,
вул. Театральна, 18, 79008, Львів, Україна

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

Рід *Aconitum* L. налічує у своєму складі велику кількість токсичних та фармацевтично-важливих рослин. Один із центрів різноманіття цього роду розташований на території Східних Карпат. У цьому регіоні зустрічається багато представників роду із нечітко визначеним таксономічним статусом, зокрема, представники комплексу *A. anthora* s. l. Суперечливим питанням також залишається таксономічне положення цього комплексу в межах роду, оскільки використані для філогенетичного аналізу ділянки хлоропластного та ядерного геномів виявились недостатньо мінливими. Тому актуальним залишається пошук оптимального молекулярного маркера з високим рівнем поліморфізму в межах роду *Aconitum*. IGS (intergenic spacer) 5S рДНК являє собою еволюційно мінливу ділянку ядерного геному, яку раніше з успіхом використовували для реконструкції філогенезу у багатьох групах Покритонасінних. В цій роботі, використовуючи молекулярно-генетичні та біоінформатичні методи ми отримали послідовності IGS 5S рДНК для представників комплексу *A. anthora* та філогенетично віддалених видів роду *Aconitum*. Аналіз послідовностей IGS виявив, що у видів роду ця ділянка має порівняно велику довжину від 574 до 619 нп. Мінливість IGS обумовлена численними нуклеотидними замінами, тоді як короткі олігонуклеотидні індели зустрічаються лише на 5'-кінці спейсера. У IGS *Aconitum* знайдено чотири консервативні ділянки, дві з яких відповідають зовнішнім елементам промотора та термінатора РНК-полімерази III, тоді як функція двох інших ділянок залишається невідомою. Перша з них демонструє гомологію до кодувальної ділянки 5S рРНК, тоді як друга має високу подібність із послідовностями з геномів представників таксономічно віддалених родин одно- та дводольних рослин, що може бути наслідком горизонтального переносу генів. Філогенетичний аналіз з використанням IGS 5S рДНК підтримує трактування *A. anthora* s. l. в якості окремого підроду в межах роду *Aconitum*.

© Ю.О. ТИНКЕВИЧ, А.В. НОВІКОВ, І.І. ЧОРНЕЙ,
Р.А. ВОЛКОВ, 2022

Ключові слова: горизонтальний перенос генів, міжгенний спейсер 5S рДНК, молекулярна еволюція та таксономія, *Aconitum*, Ranunculaceae.

Вступ. Рід Тоя, або аконіт (*Aconitum* L.) за різними оцінками налічує від 250 до 400 видів трав'янистих рослин. Представники роду поширені у регіонах Північної півкулі з помірним кліматом. Центром видоутворення для роду вважається Східна Азія: Гімалаї, Південно-Західний Китай і Японія, де налічується 166 видів (Liangqian and Kadota, 2001; Luo et al, 2005; Jabbour and Renner, 2012; Kim et al, 2019; Boron et al, 2020). В Східних Карпатах знаходиться один із основних центрів родового різноманіття в Європі (Novikoff et al, 2011; Boron et al, 2020). Тут зустрічається 13 видів, з яких шість є ендемічними для цієї частини Карпат, один є ендеміком для Карпатського регіону в цілому та три види мають субендемічний статус (Novikoff et al, 2011).

Завдяки високому вмісту нейротоксичних алкалоїдів, значна частина видів є отруйними рослинами, але за тієї ж причини аконіти активно використовуються як у традиційній, так і в народній, зокрема, східній медицині (Bruni et al, 2010; He et al, 2010). Розуміння еволюції метаболічних шляхів алкалоїдів потребує докладного вивчення філогенії та систематики роду. Проте, з огляду на значну морфологічну мінливість та поширення міжвидової гібридації, *Aconitum* є досить складною групою у таксономічному відношенні (Mitka et al, 2007; Ziman et al, 2011; Garrido-Cardenas et al, 2018; Kumari et al, 2020).

Рід *Aconitum* відноситься до триби Delphinieae родини Ranunculaceae. В межах цієї триби, він разом з родом *Delphinium* є одним з

двох найбільших родів. Використання ядерних та пластидних ділянок ДНК для філогенетичного аналізу показало, що *Aconitum*, на відміну від *Delphinium* утворює монофілетичну групу (Jabbour and Renner, 2012). Базуючись на порівнянні повних хлоропластних геномів, вдалося встановити, що Delphinieae разом з трибами Calthaeae, Asteropyrgeae та Nigelleae утворюють одну з трьох основних клад в межах групи корових жовтецевих (Zhai et al, 2019).

В межах роду *Aconitum* традиційно виділяють три підроди: *Aconitum*, *Lycostonum* і *Gymnaconitum*. Проте, новіші дослідження з використанням молекулярних маркерів показали, що *A. gymnanthum* є сестринською групою для всіх інших представників роду *Aconitum* та суттєво дивергований від них. Тому зараз його виділяють у монотиповий рід *Gymnaconitum* (Wang et al, 2013).

Досі немає чіткого уявлення стосовно систематичного положення і внутрішньої таксономічної структури агрегатного комплексу видів *A. anthora* s. l. Представники цього комплексу поширені у Лісостеповій зоні Євразії, і зокрема утворюють значне різноманіття форм у західних регіонах України. На сьогодні, використання молекулярних методів не дозволило однозначно визначити, чи *A. anthora* належить до підроду *Aconitum*, чи представляє окремий підрід *Anthora* (Utelli et al, 2000; Jabbour and Renner, 2012; Tynkevich et al, 2022a).

В межах комплексу *Anthora* виділяють низку підвидів і рас, які іноді розглядаються як окремі види. Зокрема, такий статус мають, *A. jacquinii* Rechb., який зустрічається у високогір'ях Українських Карпат та *A. pseudanthora* Blocki ex Pacz Wissjul., розповсюджений на Західному Поділлі. Обидві рослини занесені до Червоної книги України в ранзі видів (Didukh, 2009). Аналіз ділянки хлоропластного геному *psbA-trnH* показав, що вона є ідентичною у обох згаданих вище таксонів, проте дещо відрізняється від зразків *A. anthora* та *A. anthoroideum* з територій Західної Європи та Китаю (Tynkevich et al, 2022a). З огляду на ці дані, актуальним видається пошук більш мінливих ділянок геному для ДНК-баркодингу та з'ясування рангу таксонів в межах комплексу *Anthora* та прояснення філогенетичних зв'язків у роді *Aconitum*, в цілому.

Однією із найбільш мінливих ділянок ядерного геному є послідовність міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS) 5S рДНК. Раніше її використання дозволило уточнити філогенетичні відносини у багатьох групах рослин (Blösch et al, 2009; Saini and Jawali, 2009; Tynkevich and Volkov, 2019; Ishchenko et al, 2021; Fehrer et al, 2021; Vozárová et al, 2021; Cardoni et al, 2022; Tynkevich et al, 2022b). Однак для родини Ranunculaceae аналіз цієї ділянки застосовувався раніше лише для триби Anemoneae (Mlinarec et al, 2012; Mlinarec et al, 2016). 5S рДНК в геномі організована у вигляді тандемних повторюваних одиниць (повторів), які складаються з еволюційно консервативної кодувальної ділянки (coding sequence – CDS) та мінливого IGS. У рослин на гаплоїдний хромосомний набір може припадати один або декілька локусів 5S рДНК, кожен з яких містить від кількох сотень до тисяч повторів (Navrotska et al, 2018; Pastova et al, 2019; Vozárová et al, 2021; Stepanenko et al, 2022).

На противагу 35S рДНК (Wendel et al, 1995; Volkov et al, 1999a,b; Matyásek et al, 2007; Stepanenko et al, 2022), індивідуальні варіанти 5S рДНК можуть тривалий час існувати в геномі рослин, не зазнаючи гомогенізації між собою (Saini and Jawali, 2009; Mlinarec et al, 2016; Volkov et al, 2017; Ishchenko et al, 2018). Особливо яскраво ця властивість 5S рДНК проявляється для варіантів, локалізованих на різних хромосомах (Cronn et al, 1996; Vozárová et al, 2021) та батьківських варіантів 5S рДНК в геномі гібридів (Fulnecsek et al, 2002; Garcia et al, 2020).

В цій роботі ми вперше аналізуємо молекулярну організацію, еволюцію та поліморфізм IGS 5S рДНК у представників роду *Aconitum* та обговорюємо можливість використання цієї ділянки геному для філогенетичних досліджень цієї групи.

Матеріали і методи. Рослинний матеріал та виділення ДНК. Рослинний матеріал був зібраний на території Західної України впродовж польових сезонів 2004–2009 рр. Зразок *A. anthora* (AcAnt2) був зібраний у Закарпатській області (с. Княгиня, схил г. Стика), *A. moldavicum* nsubsp. *simonkaianum* (AcSim1) – у Івано-Франківській області (г. Велика Будичевська), а зразки *A. jacquinii* (AcJac1 та AcJac3) – у Івано-

Франківській (г. Товста) та Закарпатській (г. Петрос) областях (табл. 1).

Геномну ДНК виділяли з гербарних зразків цетовлоновим методом (Pogebski et al, 1997). На стадії лізису зразки ДНК додатково обробляли протеїназою (Sigma-Aldrich, США).

Ампліфікація, клонування та секвенування. Повторювані одиниці 5S рДНК ампліфікували

за допомогою ПЛР з використанням праймерів Pr5S-L і Pr5S-R, які комплементарні до CDS 5S рДНК. Ці праймери дозволяють ампліфікувати повний IGS разом із фланкуючими ділянками CDS (Tynkevich and Volkov, 2014; Volkov et al, 2017). ПЛР-ампліфікацію проводили як було описано раніше (Tynkevich and Volkov, 2019). Продукти ПЛР клонували в плазмідний вектор

Таблиця 1. Характеристика IGS 5S рДНК досліджуваних видів

Рослинний матеріал	Клон/Фрагмент ДНК		IGS		Посилання
	Назва	GenBank Acc. No	Довжина, нп	Вміст GC-пар, %	
<i>Aconitum anthora L./AcAnt2</i>	AcAnt2-1	OP186115	618	45,2	Ця стаття
	AcAnt2-6	OP186116	618	43,7	Ця стаття
	AcAnt2-8	OP186117	618	45,2	Ця стаття
<i>Aconitum jacquinii Rehb./AcJac1</i>	AcJac1-1	OP186118	600	43,7	Ця стаття
	AcJac1-34	OP186119	618	45,5	Ця стаття
<i>Aconitum jacquinii Rehb./AcJac3</i>	AcJac3-1	OP186120	619	43,6	Ця стаття
	AcJac3-13	OP186121	617	43,8	Ця стаття
<i>Aconitum moldavicum nsubsp. simonkaianum (Gayer) Starmühl./AcSim1</i>	AcSim1-1	OP186122	610	49,7	Ця стаття
<i>Aconitum bulleyanum Diels/AcBul</i>	AcBul-C1R1	SRX13230939	576	46,5	Ця стаття
	AcBul-C2R1	SRX13230939	577	46,6	Ця стаття
	AcBul-C4R1	SRX13230939	579	46,8	Ця стаття
	AcBul-C4R2	SRX13230939	576	46,5	Ця стаття
	AcBul-C5R1	SRX13230939	576	46,5	Ця стаття
	AcBul-C5R2	SRX13230939	574	45,8	Ця стаття
	AcBul-C15R1	SRX13230939	576	46,5	Ця стаття
	AcBul-C44R1	SRX13230939	577	47,0	Ця стаття
	<i>Aconitum kusnezoffii Rehb./AcKus</i>	—	AY334493.1	580	46,9
<i>Anemone baldensis L.</i>	Abal15	JQ724083.1	412	44,9	Mlinarec et al, 2012
<i>Anemone cylindrica A. Gray</i>	Acy11	JQ724091.1	413	46,7	Mlinarec et al, 2012
<i>Anemone multifida Poir.</i>	AmulM21NTS	KX019890.1	411	49,4	Mlinarec et al, 2016
<i>Anemone nemorosa L.</i>	Anem12NTS	KX019899.1	415	50,1	Mlinarec et al, 2016
<i>Anemone parviflora Michx.</i>	Apar12NTS	KX019918.1	416	49,3	Mlinarec et al, 2016
<i>Anemone ranunculoides L.</i>	Aran12NTS	KX019926.1	272	50,0	Mlinarec et al, 2016
<i>Anemone sylvestris L.</i>	Asyl3	JF422858.1	414	50,5	Mlinarec et al, 2012
<i>Anemone trifolia L.</i>	Atrif10NTS	KX019935.1	417	48,9	Mlinarec et al, 2016
<i>Pulsatilla dahurica (Fisch. ex DC.) Spreng.</i>	Pdav3NTS	KX019974.1	414	53,4	Mlinarec et al, 2016
<i>Pulsatilla rubra (Lam.) Delarbre</i>	Prub5	JF422875.1	417	57,0	Mlinarec et al, 2012
<i>Pulsatilla vulgaris Mill.</i>	Pgra2NTS	KX019976.1	414	56,8	Mlinarec et al, 2016
<i>Fraxinus pennsylvanica Marshall</i>	—	OU503049.1	—	—	Huff et al, 2022
<i>Allium ursinum L.</i>	—	MK770767.1	—	—	Peška et al, 2019

pJET 1.2/blunt за допомогою набору CloneJET PCR Cloning Kit («ThermoFisher Scientific», США). Скринінг рекомбінантних клонів та відбір вставок за розміром проводили методом ПЛР на колоніях, використовуючи прямий та зворотній праймери pJET 1.2.

Перевірка якості, анотування нуклеотидних послідовностей та розрахунок рівня подібності послідовностей проводились з використанням програмного забезпечення Chromas та пакету програм DNASTAR. Отримані послідовності депонували в базі даних GenBank під номерами, зазначеними в табл. 1.

Асемблінг повторів 5S рДНК з коротких рідів Illumina. Асемблінг повторів 5S рДНК був виконаний *de novo* з використанням попередньо відфільтрованих бібліотек парних рідів Illumina з необроблених геномних даних, доступних в базі даних Sequence Read Archive (SRA). Ріди фільтрували шляхом зіставлення з фрагментами CDS 5S рДНК довжиною 20 нп, використовуючи вбудований інструмент на сторінці завантаження послідовності: https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?view=search_seq_name. *De novo* асемблінг проводили за допомогою програми SeqMan NGen 14 (DNASTAR Lasergene suite). Для бібліотеки відфільтрованих рідів проводили автоматичний трімінг за якістю, застосовуючи наступні параметри асемблінгу: mer size – 31, мінімальний відсоток збігу (minimum match percentage) – 100 % та coverage threshold – 100 рідів. В отриманих контігах з найбільшим покриттям було ідентифіковано та анотовано від одного до двох повторів 5S рДНК, які містять один повний IGS, фланкований двома фрагментами CDS.

Філогенетичний аналіз. Вирівнювання послідовностей IGS 5S рДНК проводили на сервері MAFFT з використанням методу G-INS-I, який найбільше підходить для послідовностей із гомологією по всій довжині (Kato et al, 2019). Отримане вирівнювання перевірялося та коригувалося вручну за допомогою програми UGENE. Модель найкращої відповідності нуклеотидних замінів оцінювали за найменшим значенням Баєсового інформаційного критерію (BIC) за допомогою інструмента Find Best-Fit Substitution Model програми Mega X (Kumar et al, 2018). Філогенетичне дерево було обраховано методом Maximum Likelihood за до-

помогою PhyML плагіну для Geneious Prime 2021.0.3.2. Підтримка гілок розраховувалася за допомогою aLRT-Chi2 тесту (Anisimova and Gascuel, 2006). Отримане дерево було експортоване у формат Newick та візуалізоване за допомогою онлайн-інструменту «Інтерактивне дерево життя» (iTOL v6).

Результати та обговорення. Електрофоретичний аналіз показав, що в результаті ПЛР-ампліфікації для кожного з використаних зразків ДНК утворюється лише один продукт із довжиною близько 750 нп. Це свідчить про однорідність за довжиною повторів 5S рДНК в межах геному. Після клонування ПЛР-продуктів та скринінгу клонів, для кожного зразку було сиквененовано від однієї до трьох рекомбінантних плазмід. Послідовність IGS було розшифровано для двох видів, які належать до комплексу *A. anthora* (*A. anthora* та *A. jacquinii*) та для *A. moldavicum* subsp. *simonkaianum* – представника підроду *Lycostonium* (табл. 1). Аналіз отриманих сиквенсів показав, що всі клони містять послідовності IGS 5S рДНК, фланковані з обох боків фрагментами CDS, включаючи послідовності використаних для ПЛР праймерів.

Крім послідовностей IGS, отриманих експериментально, ми також використали *in silico* асемблінг для коротких рідів з повногеномної бібліотеки *A. bulleyanum*, сиквененованої методом Illumina. В результаті було отримано 8 варіантів повторів 5S рДНК (риботипів), які є найбільш розповсюдженими в геномі цього виду. Також для порівняння було використано єдину наявну в базі даних Genbank послідовність IGS 5S рДНК представників роду *Aconitum*, а саме – *A. kusnezoffii* (табл. 1). Обидва згадані види належать до підроду *Aconitum*.

В результаті первинного аналізу послідовностей IGS було встановлено, що їхня довжина у представників роду *Aconitum* знаходиться в межах від 574 до 619 нп. Такі значення суттєво перевищують типові довжини IGS для більшості груп Покритонасінних (Saini and Jawali, 2009; Tynkevich and Volkov, 2019; Ishchenko et al, 2021; Fehrer et al, 2021; Vozárová et al, 2021; Cardoni et al, 2022; Tynkevich et al, 2022b), хоча у деяких видів були ідентифіковані IGS подібної довжини (Chen et al, 2021). Вміст GC-пар в IGS 5S рДНК у представників

Організація міжгенного спейсера 5S рДНК та його використання в молекулярній систематиці

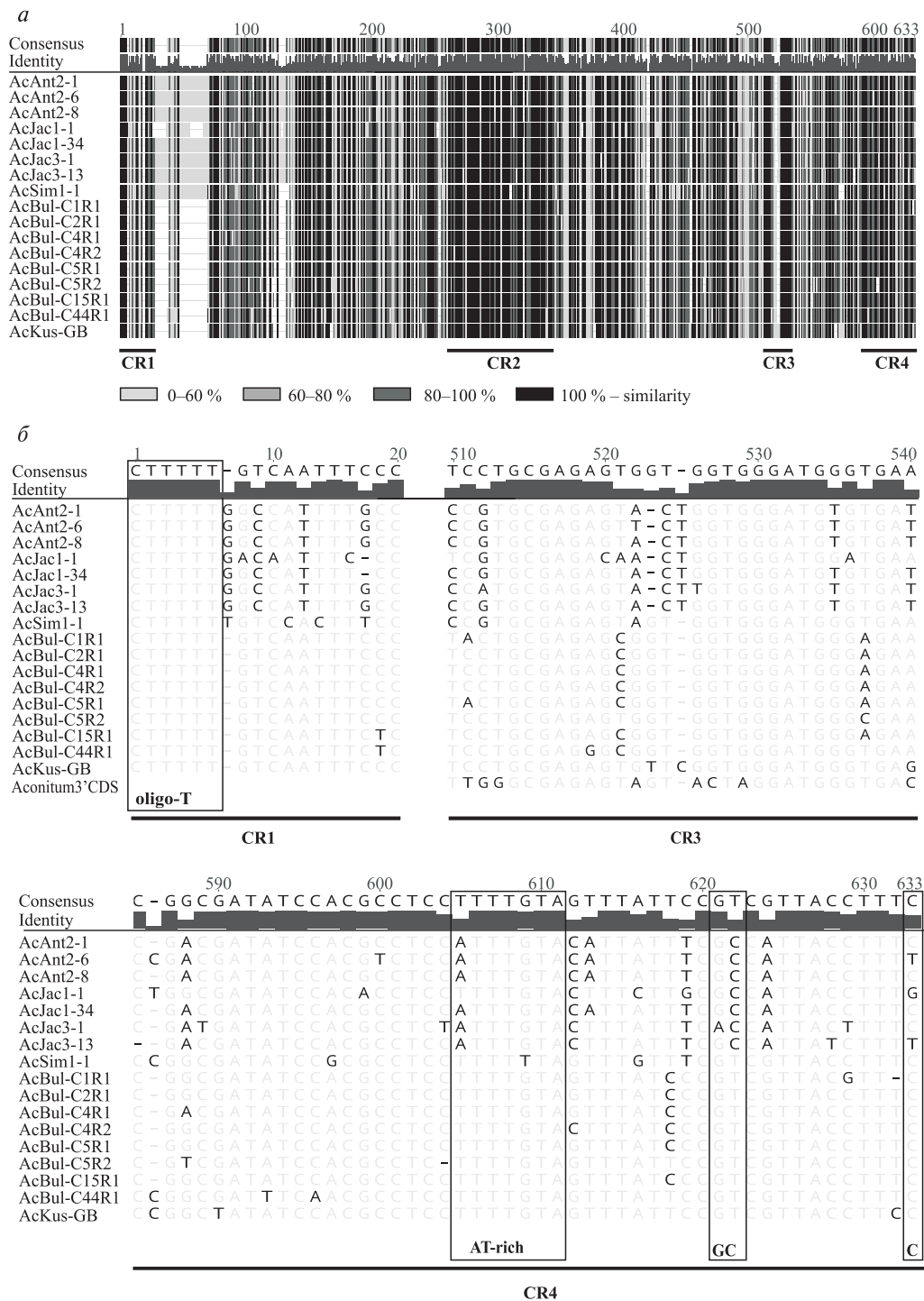


Рис. 1. Структурна організація IGS 5S рДНК видів роду *Aconitum*. (а) схематичне зображення вирівнювання послідовностей IGS. Градацією відтінків сірого показано рівень подібності (%). Підкреслено консервативні ділянки IGS (conservative regions, CR1-4), які детально розглянуто на рис. 1, б та 2. (б) порівняння послідовностей ділянок CR1, CR3 та CR4; прямокутниками виділено оліго-Т послідовність термінатора транскрипції та потенційні елементи зовнішнього промотора РНК-полімерази III.

роду *Aconitum* варіює в незначних межах, від 43,6 до 49,7 %, та знаходиться в діапазоні, типовому для цієї ділянки геному у рослин (Tynkevich and Volkov, 2014; Ishchenko et al, 2018; Tynkevich and Volkov, 2019; Tynkevich et al, 2022b).

Для всіх наявних 17-и послідовностей IGS аконітів було отримане множинне вирівнювання, довжина якого склала 633 нп (рис. 1, а). Кількість ідентичних нуклеотидних сайтів для всіх послідовностей становить 266 (42 %), а середня попарна подібність послідовностей – 78,9 %. По всій довжині вирівнювання присутні точкові нуклеотидні заміни та короткі інсерції/делеції (індели). Лише на 5'-кінці IGS виявлено три індели більшої довжини (6–22 нп). В межах IGS знайдено чотири консервативні ділянки (Conservative Regions, CR1-4; рис. 1)

На початку IGS у досліджених представників роду *Aconitum* присутній ідентичний мотив СТТТТТ, який входить до складу CR1. Відомо, що в еукаріотичних організмів подібні тимін-багаті мотиви виконують функцію термінації транскрипції генів 5S рДНК (Douet and Tourmente, 2007; Richard and Manley 2009). Зокрема, оліго-Т мотиви різної довжини знайдено на 5' кінці IGS у всіх проаналізованих раніше груп Покритонасінних (Tynkevich and Volkov, 2014; Tynkevich and Volkov, 2019; De Souza et al, 2020; Ishchenko et al, 2018; Tynkevich et al, 2022b).

Відомо, що у рослин в ініціації транскрипції РНК-полімеразою III беруть участь зовнішні елементи промотора, розташовані на 3'-кінці IGS. У *Arabidopsis thaliana* (родина Brassicaceae) вони представлені шестинуклеотидним ТАТАТА-боксом, GC-динуклеотидом та цитозином у позиціях -28, -13, -1, відповідно (Douet and Tourmente, 2007; Simon et al, 2018). Ідентичні мотиви знайдено й у представників деяких інших родин, напр., Rosaceae (Tynkevich and Volkov, 2014), проте у багатьох групах Покритонасінних вони можуть суттєво відрізнятися (Ishchenko et al, 2018; Tynkevich and Volkov, 2019; De Souza et al, 2020; Tynkevich et al, 2022b). У представників роду *Aconitum* в межах CR4 в позиції -1 переважно присутній цитозин, але у кількох риботипах спостерігаються нуклеотидні заміни (рис. 1, б). GC-мотив у позиції -13 присутній лише у представників комплексу *Anthora*, тоді як у інших ви-

дів у ньому відбулася транзиція С→Т. В позиції -28, в якій у інших таксонів як правило розташовуються ТАТА-подібні мотиви, у видів роду *Aconitum* присутня послідовність ТТТГ-ТА. Водночас, мотив, що нагадує ТАТА-бокс знаходиться в позиції -43. Отже, складається враження, що відносна консервативність 3'-ділянки IGS, яка видається необхідною для забезпечення взаємодії зовнішніх елементів промотора з факторами ініціації транскрипції РНК-полімерази III, у Покритонасінних спостерігається лише в межах родин.

Окрім розглянутих вище CR1 та CR4, які імовірно беруть участь у транскрипції 5S рДНК, в центральній частині IGS видів роду *Aconitum* нами виявлено ще дві еволюційно консервативні ділянки CR2 та CR3 (рис. 1).

Порівняльний аналіз свідчить, що консенсусна послідовність ділянки CR3 демонструє суттєву подібність (74,2 %) із 3'-фрагментом CDS 5S рДНК. Зокрема, в межах цього фрагменту CDS розміщені внутрішні елементи промотора генів 5S рДНК, ІЕ-елемент та С-бокс. Раніше інсерції фрагментів CDS спостерігались в IGS 5S рДНК представників родин Rosaceae (роди *Rosa* та *Sanguisorba* – Tynkevich and Volkov, 2014) та Solanaceae (*Solanum melongena* – Tynkevich et al, 2022b). У *S. melongena* в IGS виявлена еволюційно молода, специфічна для цього виду дуплікація, яка складається з 3' фрагменту CDS довжиною 32 нп та суміжного фрагменту IGS довжиною 114 нп. Показано, що нуклеотидні заміни в дуплікованому фрагменті присутні лише в ділянці, гомологічній IGS. У представників родів *Rosa* та *Sanguisorba* інсерція фрагменту CDS має незначну довжину – 7 нп, проте представлена у вигляді чотирьох субповторів в центральній частині IGS. Отже, інсерції фрагментів CDS у IGS видається одним із трендів молекулярної еволюції 5S рДНК. Причому у всіх згаданих випадках таких інсерцій спостерігалась менша швидкість їхньої еволюції, порівняно з іншими частинами IGS.

Консервативна ділянка CR2 в центральній частині IGS аконітів має довжину 74 нп (рис. 1, а). Blast-пошук (Ye et al, 2006) в базі даних Genbank виявив гомологію між цією ділянкою та IGS 5S рДНК представників родів *Anemone* та *Pulsatilla* (рис. 2), які належать до триби

	1	10	20	30	40	50	60	70	74
Consensus Identity	CACGGAAAAGGCTG	TATCTTTCCAAACCGTA	ACTCGAAACTGAGCA	AGGCGGTTGGC	GTTGGATTTCG	TATCGTATCGTCC			
AcAnt-2.1	CACGGAAAAC	CGTATCTCTCAAACCGAA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
AcSim-1.1	CACGGAAAAC	CGTATCTCTCAAACCGAA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
AcBul-1.1	CGCGGAAAAC	CGCGTATCTCTCAAACCGAA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
AcKus-GB	CACGGAAAAC	CGCGTATCTCTCAAACCGAA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
P.dahurica-5S	CACGGAAAAGGC	CGTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
P.vulgaris-5S	CACGGAAAAGGC	CGTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
P.rubra-5S	CACGGAAAAGGC	CGTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
An.parviflora-5S	CACGGAAAAGGC	CGTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
An.baldensis-5S	CACGGAAAAGGC	CGTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
An.nemorosa-5S	CACGGAAAAGGC	CGTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
An.sylvestris-5S	CACGGAAAAT	GCTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
An.cylindrica-5S	CACGGAAAAGGC	CGTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
An.trifolia-5S	CACGGAAAAGGC	CGTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
An.ranunculoides-5S	CACGGAAAAT	GCTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
An.multifida-5S	CACGGAAAAGGC	CGTATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
F.pennsylvanica_ch14	CACCAAAAC	CGATGATCTTTCAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			
Al.ursinum-5S	CACCGTTTCGG	GCGTATCTTTAAACCGTA	AGTCAAAACAGGA	GAACTGGTGGGG	GTTGTATTTCG	TATCGTATCGTCC			

CR2

Рис. 2. Порівняння центральної частини (ділянка CR2 – див. рис. 1) IGS 5S рДНК представників роду *Aconitum* з гомологічними послідовностями, знайденими в базі даних Genbank для представників родів *Pulsatilla*, *Anemoneae*, *Fraxinus* та *Allium*

Анемонеає родини Ranunculaceae (Zhai et al, 2019). Наявність гомологічних послідовностей у центральній частині IGS у віддалено споріднених видів, які належать до різних триб, є рідкісним явищем, яке крім родини Ranunculaceae спостерігалось лише для представників триб Roseae і Sanguisorbeae родини Rosaceae (Tynkevich and Volkov, 2014).

Ще більш неочікуваним результатом Blast-пошуку є виявлення подібності між CR2 та послідовностями геномів філогенетично віддалених видів *Fraxinus pennsylvanica* (родина Oleaceae) та *Allium ursinum* (родина Amaryllidaceae). Причому, для *Allium ursinum* гомологічна до CR2 послідовність виявлена в IGS 5S рДНК, тоді як в геномному асемблінгу *Fraxinus pennsylvanica* вона зустрічалась на 16-и різних хромосомах незалежно від 5S рДНК. Цікаво, що ані в 5S рДНК, ані в повногеномних бібліотеках інших представників родів *Allium* та *Fraxinus* цю послідовність виявити не вдалося. Можливим поясненням присутності високоподібної послідовності у 5S рДНК представників трьох філогенетично віддалених родин може бути явище горизонтального переносу генів. Останнім часом з'являється все більше свідчень розповсюдженості цього процесу в еволюції геномів рослин, включаючи випадки переносу рДНК (Krak et al, 2021; Bartha et al, 2021).

Розрахований на основі вирівнювання відсоток подібності між послідовностями IGS 5S рДНК представників роду *Aconitum* знаходиться в межах 67,0–97,2 % (табл. 2) та є значно нижчим, ніж рівень подібності між послідовностями ділянки *psbA-trnH* (Tynkevich et al, 2022a), тобто, IGS 5S рДНК еволюціонує з більшою швидкістю, ніж ділянка *psbA-trnH*. Відповідно, порівняння послідовностей IGS може бути рекомендовано для філогенетичного аналізу в межах роду *Aconitum*.

Вирівнювання послідовності IGS було використано для створення невикоріненої філогенетичної дендрограми методом Maximum Likelihood. На отриманій дендрограмі з високою статистичною підтримкою візуалізуються дві клади, перша з яких охоплює всі послідовності IGS *A. bulleyanum* та *A. kusnezoffii*, які належать до підроду *Aconitum*, а друга – всі послідовності IGS представників комплексу *Anthora* (рис. 3). Більшість послідовностей в межах другої клади є високо подібними, за виключенням послідовності *AcJas1-1*, яка помітно відрізняється від них. Поясненням цього може бути псевдогенізація цієї послідовності – явище, яке було раніше описано для 5S рДНК інших родів Покритонасінних (Volkov et al, 2017). Представник підроду *Lycostonum*, *A. simonkaianum* займає на філограмі ізольоване положення.

Таблиця 2. Рівень подібності (%), вгорі праворуч) та показник дивергенції (внизу ліворуч) послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Acontium*

Назва послідовності	AcAnt2-1	AcAnt2-6	AcAnt2-8	AcIac1.1	AcIac1-34	AcIac3-1	AcIac3-13	AcSim1-1	AcBul-C1R1	AcBul-C2R1	AcBul-C4R1	AcBul-C4R2	AcBul-C5R1	AcBul-C5R2	AcBul-C15R1	AcBul-C44R1	AcKus-GB
AcAnt2-1	—	95,3	100,0	80,3	97,2	94,0	93,8	74,6	69,2	69,7	69,7	70,3	69,4	68,1	69,4	68,6	69,2
AcAnt2-6	4,4	—	95,3	79,1	95,7	92,3	92,6	73,6	68,1	68,6	68,9	69,2	68,4	67,0	68,2	67,8	68,7
AcAnt2-8	0,0	4,4	—	80,3	97,2	94,0	93,8	74,6	69,2	69,7	69,7	70,3	69,4	68,1	69,4	68,6	69,2
AcIac1.1	17,3	19,2	17,3	—	80,7	80,3	79,6	71,1	71,9	72,4	72,2	72,5	72,0	70,6	72,0	71,6	71,7
AcIac1-34	2,6	3,8	2,6	17,0	—	94,9	95,1	74,9	69,7	70,0	70,3	70,8	70,0	68,7	69,8	69,2	69,8
AcIac3-1	5,9	7,6	5,9	17,5	4,9	—	94,9	73,8	68,6	68,9	69,0	69,5	68,7	67,8	68,6	68,1	68,6
AcIac3-13	5,8	6,8	5,8	17,9	4,4	4,7	—	73,8	68,2	68,7	68,9	69,4	68,7	67,1	68,4	67,8	68,4
AcSim1-1	27,4	28,5	27,4	28,1	26,5	28,0	27,6	—	74,6	75,0	74,7	75,5	74,7	74,1	74,9	74,4	73,3
AcBul-C1R1	30,3	31,2	30,3	28,1	29,0	30,6	30,7	23,0	—	97,6	95,6	97,5	97,8	91,6	97,5	89,4	89,4
AcBul-C2R1	29,6	30,6	29,6	27,6	28,7	30,2	30,1	22,5	2,5	—	96,4	97,9	97,6	92,1	97,9	90,2	89,7
AcBul-C4R1	30,2	31,1	30,2	28,8	28,6	30,5	30,4	23,4	4,1	3,4	—	95,9	96,4	92,3	96,8	90,7	89,9
AcBul-C4R2	28,4	29,4	28,4	27,1	27,2	29,0	28,9	21,6	2,5	2,1	3,8	—	97,8	92,6	97,8	90,2	90,0
AcBul-C5R1	30,0	30,8	30,0	27,9	28,5	30,4	30,0	22,8	2,1	2,5	3,2	2,5	—	92,6	98,1	90,8	90,5
AcBul-C5R2	31,8	32,8	31,8	29,8	30,2	31,5	32,2	23,4	7,6	7,2	7,4	6,8	6,8	—	93,0	90,2	90,2
AcBul-C15R1	30,1	31,1	30,1	27,9	28,8	30,7	30,5	22,6	2,5	2,1	2,7	2,5	2,1	6,2	—	91,2	90,4
AcBul-C44R1	31,1	32,5	31,1	29,3	29,5	31,1	31,3	23,4	10,5	9,7	9,8	9,9	9,1	10,3	8,7	—	91,0
AcKus-GB	29,3	30,1	29,3	28,3	27,8	29,6	29,4	23,9	9,4	9,2	9,7	9,0	8,4	9,2	8,6	8,7	—

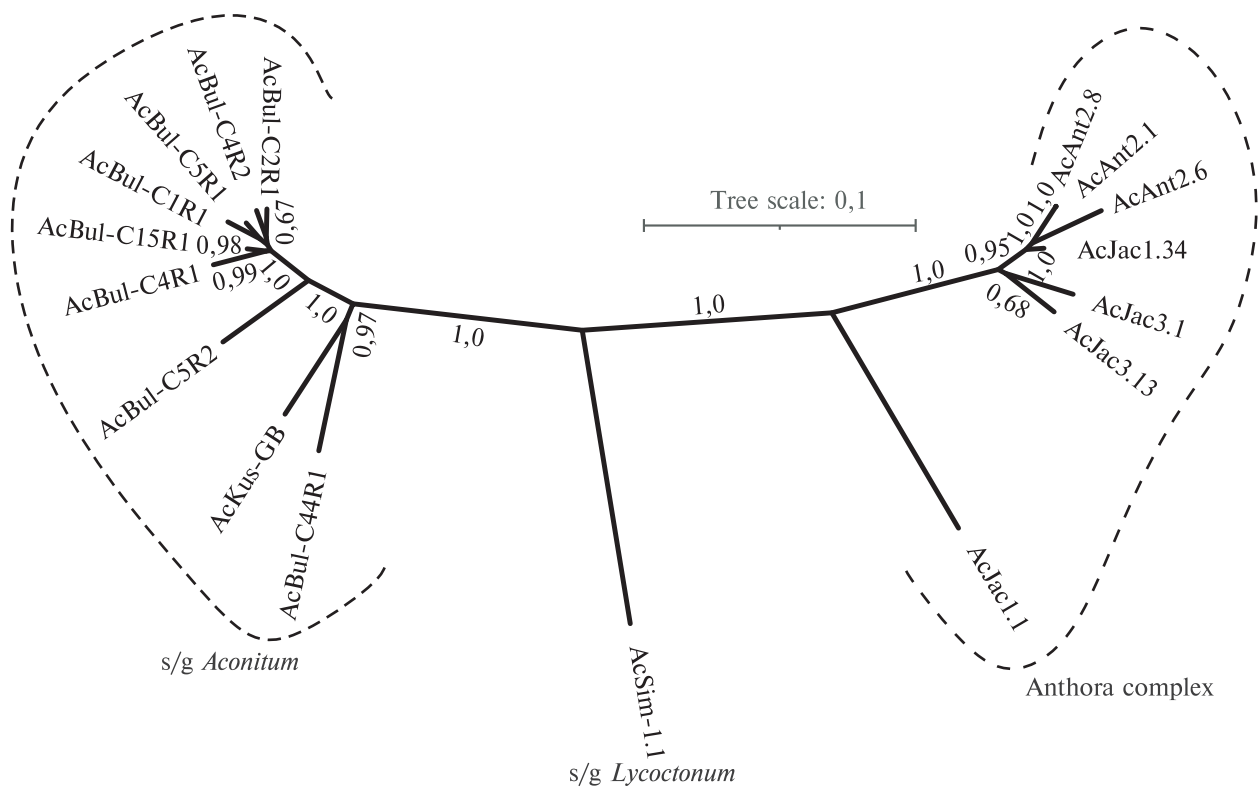


Рис. 3. Невкорінена Maximum-Likelihood філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК для представників роду *Aconitum*. Цифрами на дендрограмі вказано значення aLRT-Chi2 статистичної підтримки відповідних гілок

Раніше представники комплексу *A. anthora* та споріднені види лише у поодиноких випадках включалися у філогенетичні дослідження роду *Aconitum*. За результатами аналізу ділянок хлоропластного геному *trnL-F* та *trnL*, а також ITS ядерної 35S рДНК *A. anthora* разом з *A. brunneum* Hand.-Mazz. та *A. racemulosum* Franch. утворювали сестринську групу по відношенню до всіх інших видів підроду *Aconitum* (Jabbour and Renner, 2012). В роботі Utelli з співавторами (2000) були отримані суперечливі дані: з використанням ділянки ITS *A. anthora* групувався в межах клади підроду *Aconitum*, проте, на дендрограмі, побудованій за ділянкою хлоропластного геному *psbA-trnH*, цей вид показав вищу спорідненість до підроду *Lycocotnum* (Utelli et al, 2000). Аналіз із застосуванням послідовностей *psbA-trnH* для більшої кількості зразків представників комплексу *A. anthora* підтвердив спорідненість із підродом *Lycocotnum* (Тункевич et al, 2022a). Водночас, за

морфологічними ознаками *A. anthora* s. l. інколи розглядають у якості окремого підроду *Anthora* (Novikoff, et al, 2011). Результати, отримані нами у цьому дослідженні при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК свідчать про наявність значної генетичної дистанції між *A. anthora* + *A. jacquinii* та представниками підродів *Aconitum* та *Lycocotnum*, що є аргументом на користь трактування комплексу *A. anthora* як окремого підроду.

Суперечливі філогенетичні результати, отримані з використанням різних послідовностей, можуть бути наслідком ретикулярного характеру еволюції геномів видів роду *Aconitum*. Відповідно, подальше прояснення філогенетичних відносин в роді *Aconitum* потребує порівняльного аналізу кількох ділянок геному та залучення більшої кількості зразків рослин.

Висновки. IGS 5S рДНК представників роду *Aconitum* має порівняно велику довжину, від 574 до 619 нп. Основним джерелом мінливості

цієї ділянки у аконітів є точкові нуклеотидні заміни, тоді як короткі олігонуклеотидні індели зустрічаються лише на 5'-кінці IGS. Потенційні зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III, розташовані на 3'-кінці IGS у видів роду *Aconitum* відрізняються від таких у представників інших таксонів Покритонасінних. У IGS також знайдено консервативні ділянки, функція яких невідома. Висока швидкість молекулярної еволюції робить IGS 5S рДНК зручним інструментом ідентифікації видів та реконструкції філогенезу в межах роду *Aconitum*.

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

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Дослідження проводились за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (грант № 0122U001335).

ORGANIZATION OF THE 5S rDNA INTERGENIC SPACER AND ITS USE IN MOLECULAR TAXONOMY OF THE GENUS *ACONITUM* L.

Y.O. Tynkevich, A.V. Novikov, I.I. Chorney, R.A. Volkov

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University
Kotsiubynsky str. 2, 58012 Chernivtsi, Ukraine
State Museum of Natural History, National Academy
of Sciences of Ukraine,
Teatralna str. 18, 79008 Lviv, Ukraine;

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

The genus *Aconitum* L. includes a large number of toxic and pharmaceutical important plants. One of the centers of diversity of this genus is located on the territory of the Eastern Carpathians. In this region there are many representatives of the genus with unclear taxonomic status, in particular, members of the complex *A. anthora* s. l. The taxonomic position of this complex within the genus also remains controversial, as the regions of the chloroplast and nuclear genomes previously used for phylogenetic analysis appeared to be insufficiently variable. Therefore, the search for an optimal molecular marker with a high level of polymorphism within the genus *Aconitum* remains a relevant task. The 5S rDNA IGS (intergenic spacer) is an evolutionarily variable region of the nuclear genome, which was previously successfully used for phylogeny reconstruction in many groups of angiosperms. In this work, using methods

of molecular genetics and bioinformatics, we obtained 5S rDNA IGS sequences for representatives of the *A. anthora* complex and phylogenetically distant species of the genus *Aconitum*. Analysis of IGS sequences showed that this region is relatively long in species of the genus, 574–619 bp. The IGS variability is due to numerous nucleotide substitutions, while short oligonucleotide indels occur only at the 5' end of the spacer. Four conserved regions were found in the IGS of *Aconitum*, two of which correspond to the external promoter and terminator elements of RNA polymerase III, while the function of the other two regions remains unknown. First of them shows homology to the 5S rRNA coding region, while the second one demonstrates high similarity to the sequences from the genomes of representatives of taxonomically distant families of monocots and dicots, suggesting horizontal gene transfer. The phylogenetic analysis applying the 5S rDNA IGS supports the interpretation of *A. anthora* s. l. as a separate subgenus within the genus *Aconitum*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative, *Syst Biol* 55:539–552. <https://doi.org/10.1080/10635150600755453>.
- Bartha L, Mandakova T et al (2021) Intact rDNA arrays of *Potentilla*-origin detected in *Erythronium* nucleus suggest recent eudicot-to-monocot horizontal transfer, *New Phytol* 235(3):1246–1259. <https://doi.org/10.1111/nph.18171>.
- Blösch C, Weiss-Schneeweiss H et al (2009) Molecular phylogenetic analyses of nuclear and plastid DNA sequences support dysploid and polyploid chromosome number changes and reticulate evolution in the diversification of *Melampodium* (Milleriaceae, Asterales), *Mol Phylogenet Evol* 53:220–233. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.02.021>.
- Boron P, Wróblewska A et al (2020) Phylogeny of *Aconitum* subgenus *Aconitum* in Europe, *Acta Soc Bot Pol* 89(3). <https://doi.org/10.5586/asbp.8933>.
- Bruni I, De Mattia F et al (2010) Identification of poisonous plants by DNA barcoding approach, *Int J Legal Med* 124(6):595–603. <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0447-3>.
- Cardoni S, Piredda R et al (2022) 5S-IGS rDNA in wind-pollinated trees (*Fagus* L.) encapsulates 55 million years of reticulate evolution and hybrid origins of modern species, *Plant J* 109(4):909–926. <https://doi.org/10.1111/tpj.15601>
- Carles M, Cheung MKL et al (2005) A DNA microarray for the authentication of toxic traditional Chinese medicinal plants, *Planta Med* 71(6):580–584. <https://doi.org/10.1055/s-2005-864166>.

- Chen G, Stepanenko A et al (2021) Mosaic arrangement of the 5S rDNA in the aquatic plant *Landoltia punctata* (Lemnaceae), *Front. Plant Sci* 12(678689). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.678689>.
- Cronn RC, Zhao X et al (1996) Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons, *J Mol Evol* 42(6):685–705. <https://doi.org/10.1007/BF02338802>.
- De Souza TB, Gaeta ML et al (2020) IGS sequences in *Cestrum* present AT- and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA, *Mol Biol Rep* 47:55–66. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05104-y>.
- Didukh YP (2009) *Chervona knyha Ukrainy. Roslynniy svit* (Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom) Kyiv: Globalconsulting, 912 p.
- 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. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800964>.
- Fehrer J, Slavikova R et al (2021) Molecular evolution and organization of ribosomal DNA in the hawkweed tribe Hieraciinae (Cichorieae, Asteraceae), *Front Plant Sci* 12(647375). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.647375>.
- Fulnecek J, Lim KY et al (2002) Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species, *Heredity* 88(1):19–25. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800001>.
- Garcia S, Wendel JF et al (2020) The utility of graph clustering of 5S ribosomal DNA homoeologs in plant allopolyploids, homoploid hybrids, and cryptic introgressants, *Front Plant Sci* 11(41).
- Garrido-Cardenas JA, Mesa-Valle et al (2018) Trends in plant research using molecular markers, *Planta* 247(3):543–557. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2829-y>.
- He J, Wong KL et al (2010) Identification of the medicinal plants in *Aconitum* L. by DNA barcoding technique, *Planta Med* 76(14):1622–1628. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240967>.
- Huff M, Seaman J et al (2022) A high-quality reference genome for *Fraxinus pennsylvanica* for ash species restoration and research, *Mol Ecol Resour* 22(4):1284–1302. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13545>.
- Ishchenko OO, Bednarska IO et al (2021) Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae), *Cytol Genet* 55(1):10–18. <https://doi.org/10.3103/S0095452721010096>.
- Ishchenko OO, Panchuk II et al (2018) Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*, *Cytol Genet* 52(6):416–421. <https://doi.org/10.3103/S0095452718060105>.
- Jabbour F, Renner SS (2012) A phylogeny of Delphinieae (Ranunculaceae) shows that *Aconitum* is nested within *Delphinium* and that Late Miocene transitions to long life cycles in the Himalayas and Southwest China coincide with bursts in diversification, *Mol Phylogenet Evol* 62(3):928–942. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.005>.
- Katoh K, Rozewicki J et al (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization, *Brief Bioinform* 20:1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>.
- Kim Y, Yi JS et al (2019) The complete chloroplast genome of *Aconitum coreanum* (H. Lévl.) Rapaport (Ranunculaceae), *Mitochondrial DNA Part B* 4(2):3404–3406. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1674213>.
- Krak K, Caklová P et al (2021) Horizontally Acquired nrDNAs persist in low amounts in host *Hordeum* genomes and evolve independently of native nrDNA, *Front Plant Sci* 12(672879). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.672879>.
- Kumar S, Stecher G et al (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol Biol Evol* 35(635):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Kumari K, Bhargava S et al (2020) Molecular depiction of thirteen Indian toxic plants with ITS markers, *Arab J Forens Sci Forens Med* 2(2):159–169. <https://doi.org/10.26735/YGUY5295>.
- Liangqian L, Kadota Y (2001) *Aconitum* L. Flora of China, vol. 6. (Science Press/Missouri Botanical Garden, Beijing, St. Louis), pp. 149–222.
- Luo Y, Zhang FM et al (2005) Phylogeny of *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae) inferred from ITS sequences, *Plant Syst Evol* 252(1):11–25. <https://doi.org/10.1007/s00606-004-0257-5>.
- Matyásek R, Tate JA et al (2007) Concerted evolution of rDNA in recently formed *Tragopogon* allotetraploids is typically associated with an inverse correlation between gene copy number and expression, *Genet* 176(4):2509–2519. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.072751>.
- Mitka J, Sutkowska A et al (2007) Reticulate evolution of high-alpine *Aconitum* (Ranunculaceae) in the Eastern Carpathians (Central Europe), *Acta Biol Cracoviensia Series Botanica* 49(2):15–26.
- Mlinarec J, Franjevic D et al (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. <https://doi.org/10.1111/boj.12452>.
- Mlinarec J, Satovic Z et al (2012) Evolution of the tetraploid *Anemone multifida* (2n = 32) and hexaploid *A. baldensis* (2n = 48) (Ranunculaceae) was accompanied by rDNA loci loss and intergenomic translo-

- cation: Evidence for their common genome origin 110(3):703–712. <https://doi.org/10.1111/boj.12452>.
- Navrotska D, Andreev I et al (2018) Assessment of the molecular cytogenetic, morphometric and biochemical parameters of *Deschampsia antarctica* from its southern range limit in maritime Antarctic, Polish Polar Res. 39. <https://doi.org/10.24425/118759>.
- Novikoff AV, Mitka J (2011) Taxonomy and ecology of the genus *Aconitum* L. in the Ukrainian Carpathians, Wulfenia 18:37–61.
- Pařtová L, Belyayev A et al (2019) Molecular cytogenetic characterisation of *Elytrigia* × *mucronata*, a natural hybrid of *E. intermedia* and *E. repens* (Triticeae, Poaceae), BMC Plant Biol 19(1):1–15. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1806-y>.
- Peřka V, Mandaková T et al (2019) Comparative dissection of three giant genomes: *Allium cepa*, *Allium sativum*, and *Allium ursinum*, Int J Mol Sci 20(3):733. <https://doi.org/10.3390/ijms20030733>.
- Porebski S, Bailey LG et al (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components, Plant Mol Biol Rep 15(1):8–15. <https://doi.org/10.1007/BF02772108>.
- Richard P, Manley JL (2009) Transcription termination by nuclear RNA polymerases. Genes Dev 23:1247–1269. <https://doi.org/10.1101/gad.1792809>.
- Saini A, Jawali N (2009) Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications, Plant Syst Evol 280(3):187–206. <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0178-4>.
- Simon L, Rabanal FA et al (2018) Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*, Nucl Acids Res 46:3019–3033. <https://doi.org/10.1093/nar/gky163>.
- Stepanenko A, Chen G et al (2022) The ribosomal DNA loci of the ancient monocot *Pistia stratiotes* L. (Araaceae) contain different variants of the 35S and 5S Ribosomal RNA gene units, Front Plant Sci 13(819750). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.819750>.
- Tynkevich YO, Volkov RA (2014) Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa* Cytol Genet 48(1):1–6. <https://doi.org/10.3103/S0095452714010095>.
- Tynkevich YO, Volkov RA (2019) 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application, Cytol Genet 53(6):459–466. <https://doi.org/10.3103/S0095452719060100>.
- Tynkevich YO, Biliai DV et al (2022a) Utility of the *trnH-psbA* region for DNA barcoding of *Aconitum anthora* L. and related taxa, Factors Experiment Evol Organisms, 31.
- Tynkevich YO, Shelyfist AY et al (2022b) 5S Ribosomal DNA of genus *Solanum*: molecular organization, evolution, and taxonomy, Front Plant Sci 13(852406). <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.852406>.
- Utelli AB, Roy BA et al (2000) Molecular and morphological analyses of European *Aconitum* species (Ranunculaceae), Plant Syst Evol 224(3):195–212. <https://doi.org/10.1007/BF00986343>.
- Volkov RA, Bachmair A et al (1999a) 25S-18S rDNA intergenic spacer of *Nicotiana sylvestris* (Solanaceae): Primary and secondary structure analysis, Plant Syst Evol 218(1):89–97. <https://doi.org/10.1007/BF01087037>.
- Volkov RA, Borisjuk NV et al (1999b) Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*, Mol Biol Evol 16(3):311–320. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026112>.
- Volkov RA, Panchuk II et al (2017) Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*, BMC Plant Biol 17(1):1–15. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0978-6>.
- Vozárová R, Herklotz V et al (2021) Ancient origin of two 5S rDNA families dominating in the genus *Rosa* and their behavior in the Canina-type meiosis, Front Plant Sci 12(643548). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.643548>.
- Wang W, Liu Y et al (2013) *Gymnaconitum*, a new genus of Ranunculaceae endemic to the Qinghai-Tibetan Plateau. Taxon 62(4):13–722. <https://doi.org/10.12705/624.10>.
- Wendel JF, Schnabel A et al (1995) Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*), PNAS 92(1):280–284. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.280>.
- Ye J, McGinnis S et al (2006) BLAST: improvements for better sequence analysis, Nucl Acids Res 34(2):6–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl164>.
- Zhai W, Duan X et al (2019) Chloroplast genomic data provide new and robust insights into the phylogeny and evolution of the Ranunculaceae, Mol Phylogenet Evol 135:12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.024>.
- Ziman SM, Bulakh OV (2011) Genus *Aconitum* L. (Ranunculaceae Juss.) within the flora of the Ukrainian Carpathians: comparative-morphological and taxonomic study, Scient Herald Chernivtsi Univ Biol (Biol Syst) 3(2):142–149.

Надійшла в редакцію 03.07.22
Після доопрацювання 07.07.22
Прийнята до друку 18.11.22