

**5S РИБОСОМНА ДНК У РОДИНІ PLUMBAGINACEAE**Ю.О. ТИНКЕВИЧ<sup>1</sup>, М.О. ВАЛІН<sup>1</sup>, І.І. МОЙСІЄНКО<sup>1,2</sup>, І.І. ПАНЧУК<sup>1</sup>, Р.А. ВОЛКОВ<sup>1</sup><sup>1</sup> Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58012, Україна<sup>2</sup> Херсонський державний університет, вул. Університетська, 27, Херсон, 73000, Україна

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

Тандемно організовані повторювані ділянки (повтори), які кодують 5S рРНК (5S рДНК) є життєво важливим компонентом геномів еукаріот. Зазвичай повтори 5S рДНК є високо подібними в межах геному завдяки концертному характеру еволюції цього типу повторів. Кожен повтор 5S рДНК складається з еволюційно консервативної кодувальної ділянки (coding sequence – CDS) та мінливого міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS). 5S рДНК являє собою популярну модель для вивчення молекулярної еволюції повторюваних послідовностей, а висока швидкість накопичення мутацій у IGS обумовлює його широке використання у філогенетичному аналізі близькосторідних таксонів. Тим не менш, 5S рДНК все ще залишається недослідженою для багатьох груп вищих рослин, і зокрема, родини *Plumbaginaceae*. Деякі таксони цієї родини є ендеміками Півдня України, які занесені до Червоної книги. Проте, їх таксономічний статус є суперечливим, і для його прояснення необхідно застосування методів молекулярної філогенетики. У цій роботі ми дослідили молекулярну організацію 5S рДНК представників чотирьох родів найбільшої у родині *Plumbaginaceae* триби *Limoniae*. Встановлено, що у CDS 5S рДНК представників родів *Limonium*, *Artemisia* та *Ceratolimon* наявні поодинокі мутації, які не вважають формуванню вторинної структури 5S рРНК. На противагу цьому, у геномах видів роду *Goniolimon*, окрім функціонально повноцінних повторів 5S рДНК знайдено численні псевдогени, що еволюціонують неконцертним способом та містять багато мутацій у CDS, які порушують вторинну структуру 5S рРНК. Значна філогенетична дистанція між представниками підродів *Pterocladus* та *Limonium* роду *Limonium* свідчить, що *Pterocladus* може вважатись окремим родом. Висока швидкість молекулярної еволюції робить IGS 5S рДНК зручним інструментом для реконструкції філогенетичних відносин в межах досліджуваних родів триби *Limoniae* та баркодингу українських ендеміків роду *Limonium*.

**Ключові слова:** 5S рДНК, генетичний поліморфізм, молекулярна еволюція та філогенія, повторювані послідовності, псевдогени, *Artemisia*, *Ceratolimon*, *Goniolimon*, *Limonium*.

© ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ НАН УКРАЇНИ, 2023

**Вступ.** Гени, які кодують 5S рРНК (5S рДНК) належать до фракції повторюваних послідовностей у геномах еукаріот (Manske and Chapman, 1987; Hemleben et al, 2021). У рослин кількість повторюваних одиниць (повторів) 5S рДНК знаходиться в межах від сотень до сотень тисяч копій (Sastri et al, 1992; Chen et al, 2021). Кожен повтор складається з ділянки, яка кодує 5S рРНК та некодувального міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS). Набори тандемно організованих повторів 5S рДНК утворюють кластери на одній або кількох хромосомах (Fulnecek et al, 2002; Besendorfer et al, 2005; Garcia et al, 2014; Volkov et al, 2017; Stepanenko et al, 2022)

Кодувальні ділянки 5S рДНК (coding sequences – CDS) є одними із найбільш еволюційно консервативних послідовностей геному еукаріотичних організмів і мають довжину 118–120 нп (Manske and Chapman, 1987; Symonová, 2019; Hemleben et al, 2021). Збереження послідовності 5S рРНК необхідне для її життєво важливої функції як компонента великої субодиниці рибосоми, зокрема – для формування вторинної та третинної структури 5S рРНК та її взаємодії із рибосомними білками (Barciszewska et al, 2001; Hemleben et al, 2021). Незмінність послідовності 5S рРНК також необхідна для її транскрипції, а саме – для взаємодії РНК-полімерази III із внутрішніми елементами промотора, які знаходяться в межах CDS (Cloix et al, 2003). Відповідно, вважається, що низька швидкість еволюції CDS є результатом дії стабілізуючого добору (Vierna et al, 2013; Symonová, 2019).

Дивовижною особливістю 5S рДНК, що необхідна для її функціонування є висока подібність окремих повторів в межах геному, яка підтримується впродовж еволюції. Цей феномен отримав назву концертної (узгодженої) еволюції, яка забезпечується гомогенізацією окремих повторів внаслідок кросинговеру та генної

конверсії. Завдяки цьому нова мутація, яка виникла в одному повторі, або видаляється з геному, або розповсюджується по всіх повторах (Nei and Rooney, 2005; Wang et al, 2023).

Тим не менш, було показано, що в межах одного геному можуть бути присутні декілька варіантів CDS (Mahelka et al, 2013; Garcia et al, 2020; Tynkevich et al, 2022b). Вважається, що за наявності окремих замінів нуклеотидів такі CDS можуть кодувати функціонально повноцінні 5S рРНК, тоді як накопичення значної кількості мутацій свідчить про перетворення таких повторів у нефункціонуючі псевдогени (Mahelka et al, 2013).

На протипагу CDS, IGS у складі 5S рДНК еволюціонує з високою швидкістю, що пов'язано з імовірною відсутністю функцій у більшій частині цієї ділянки. Виключення становлять лише фрагменти IGS безпосередньо перед та після CDS, де розташовані, відповідно, зовнішні елементи промотора та терміна́тор транскрипції (Cloix et al, 2003; Douet and Tourmente, 2007; Simon et al, 2018). Дослідження кількох родин покритонасінних показали, що ці фрагменти демонструють відносне зниження швидкості молекулярної еволюції порівняно з рештою IGS (Ishchenko et al, 2018; Tynkevich and Volkov, 2019; Ishchenko et al, 2021; Tynkevich et al, 2022a). Проте, рівень консервативності зовнішніх елементів промотору все ж значно нижчий за CDS.

Загальна довжина IGS у різних організмів змінюється в широких межах, від близько 100 нп до більш ніж 1000 нп (Gottlob-McHugh et al, 1990; Sastri et al, 1992; Stepanenko et al, 2022). Така значна різниця пояснюється високою частотою інсерцій/делецій (інделів) в еволюції цієї ділянки (Cherevatov and Volkov, 2011; Tynkevich et al, 2022b).

Незважаючи на високу швидкість молекулярної еволюції, в межах одного геному послідовності IGS можуть бути високо подібними і навіть майже ідентичними (Tynkevich et al, 2022b). Ці випадки тривалий час розглядалися як приклади концертної еволюції (Cronn et al, 1996; Eirín-Lopez et al, 2012). Проте, накопичення даних про еволюцію IGS у різних групах еукаріот виявило приклади суттєвого внутрішньогеномного поліморфізму цієї ділянки, внаслідок чого популярності набули

інші концепції, зокрема, неповної концертної еволюції, еволюції народження та смерті (birth-and-death) та змішаної еволюції (Rooney and Ward, 2005; Pinhal et al, 2011; Cherevatov and Volkov, 2011; Wang et al, 2023).

Висока швидкість накопичення змін у IGS 5S рДНК робить цю ділянку привабливим інструментом у дослідженнях молекулярної еволюції та філогенії таксонів низького рангу (Baker et al, 2000; Saini and Jawali, 2009; Mlinarec et al, 2016; Ishchenko et al, 2021; Tynkevich et al, 2022b). За останні роки значне зростання кількості робіт, присвячених вивченню рДНК у рослин (Hemleben et al, 2021), призвело до відкриття багатьох неочікуваних особливостей еволюційної динаміки 5S рДНК, таких як інсерція CDS 5S рДНК у спейсерні ділянки 35S рДНК у печіночників, голонасінних та айстрових (Garcia et al, 2010; Garcia and Kovařík, 2013; Sousa et al, 2020), експансія псевдогенів у геномах видів підроду *Tulipa* (Liu et al, 2022), горизонтальний перенос ділянок IGS між філогенетично віддаленими таксонами покритонасінних (Tynkevich et al, 2022a). Тим не менш, для більшій частини родин вищих рослин дослідження 5S рДНК досі не проводились. Це стосується і родини Plumbaginaceae Juss. Для цієї родини, яка включає 30 родів та 725 видів (Christenhusz and Byng, 2016), наявні лише окремі відомості про хромосомну локалізацію локусів 5S рДНК (Nieto Feliner et al, 2019; Rhazi et al, 2021).

У флорі України родина Plumbaginaceae представлена 3 родами: *Limonium*, *Armeria* та *Goniolimon*, які включають 18 таксонів видового та підвидового рівня. Частина цих таксонів, зокрема – *L. tschurjukiense* Lavr. ex Klok. та *G. orae-syvashicae* Klokov, вважаються ендеміками півдня України і занесені до Червоної книги (Didukh, 2009), проте, досить часто ці видові назви розглядаються як синоніми до *L. tomentellum* Kuntze та *G. rubellum* (S.G. Gmel.) Klokov, відповідно (Moysiienko, 2008). Отже, їх таксономічний статус потребує уточнення з використанням молекулярних маркерів.

В цій роботі ми дослідили молекулярну організацію, поліморфізм та еволюцію повторів 5S рДНК у видів родів *Limonium* Mill., *Armeria* Willd., *Ceratolimon* M.B. Crespo & M.D. Lledy та *Goniolimon* Boiss., які представляють

чотири основні клади найбільшої в родині *Plumbaginaceae* триби *Limoniae* (Koutroumpa et al, 2018) і оцінили можливість використання 5S рДНК як молекулярного маркеру у філогенетиці цієї триби.

**Матеріали і методи.** Рослинний матеріал та виділення ДНК. Рослинний матеріал був відібраний з природних популяцій на території України впродовж 2003–2018 рр. Зразок *L. platyphyllum* (LiPla1) був зібраний у Одеській області (с. Кошари), *L. tomentellum* (LiTom1) – у Херсонській області (с. Хорли), *L. gmelinii* (LiGme1) та *G. besserianum* (GoBes2) – у Херсонській області (с. Іванівка), а *G. rubellum* (GoRub1) – у Криму (Тарханкутський півострів).

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

**Ампліфікація, клонування та сиквенування.** 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 плазмідному векторі 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. Зразки рекомбінантної плазмідної ДНК, виділені методом лужного лізису, використовували як матриці для ПЛР ампліфікації вставок 5S рДНК. Отримані ПЛР-продукти очищали екстракцією хлороформом та сиквенували за Сенгером із застосуванням праймерів, використаних для ампліфікації, на фірмі LGC Genomics, Німеччина.

Перевірку якості, анотування нуклеотидних послідовностей та розрахунок рівня подібності послідовностей проводили з використанням програмного забезпечення Chromas та пакету програм DNASTAR (Burland, 1999). Отримані послідовності депонували в базі даних GenBank під номерами, зазначеними в табл. 1.

**Асемблінг повторів 5S рДНК з коротких рідів *Plumina*.** Асемблінг повторів 5S рДНК було виконано *de novo* з використанням попередньо відфільтрованих бібліотек парних рідів *Plumina* з необроблених геномних даних, доступних в базі даних Sequence Read Archive (SRA) (табл. 1). Риди 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](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 (Burland, 1999). 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 – 20 рідів.

**Аналіз нуклеотидних послідовностей.** Центроїдні вторинні структури гіпотетичних транскриптів 5S рРНК обраховували за допомогою веб-серверу RNAFold (Gruber et al, 2008). Вирівнювання послідовностей CDS та IGS 5S рДНК проводили на сервері MAFFT з використанням методів G-INS-i та E-INS-i, відповідно (Kato et al, 2019). Отримані вирівнювання перевірялися та коригувалися вручну за допомогою програми UGENE (Okonechnikov et al, 2012). Середню попарну подібність в групах послідовностей та середній вміст GC-пар визначали в програмі Geneious Prime 2021.0.3.2. Співвідношення швидкостей транзицій та трансверсій, значення транзитивного зсуву, кількість варіабельних та парсимоній-інформативних сайтів та середні значення дивергенції між групами розраховували в програмі Mega X (Kumar et al, 2018). Кількість варіабельних та парсимоній-інформативних сайтів виражали у відсотках відносно до довжини вирівнювання та кількості послідовностей у вирівнюванні. Дивергенцію розраховували як частку сайтів, за якими послідовності відрізняються між собою.

**Філогенетичний аналіз.** Модель найкращої відповідності нуклеотидних замін для вирівнювання IGS оцінювали за найменшим значенням Баєсового інформаційного критерію (BIC) за допомогою інструмента Find Best-Fit Substitution Model програми Mega X (Kumar et al, 2018). Для того, щоб включити інформацію

про індели у філогенетичний аналіз, використали простий метод кодування інделів як дискретних ознак (Simmons and Ochoterena, 2000). Кодування було здійснено інструментом Fast Gap 1.2 (Borchsenius, 2009). Загалом було кодовано та використано для аналізу 30 інделів. Філогенетичне дерево було обраховано методом Maximum Likelihood за допомогою 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.** Походження послідовностей 5S рДНК. В результаті клонування та сиквенування повторів 5S рДНК представників триби Limoniaceae нами було отримано повні послідовності IGS, фланковані фрагментами CDS для трьох видів роду *Limonium* та двох видів роду *Goniolimon* (табл. 1). Крім того, клон GoBes2-8 виявився димером, який

Таблиця 1. Рослинний матеріал та послідовності 5S рДНК, отримані у цій роботі

Вид	Назва зразку	Номер клону	GenBank Acc. No/SRA Experiment No	Посилання
Рід <i>Limonium</i> Mill., підрід <i>Pteroclados</i>				
<i>L. arboreum</i> (Willd.) Erben, A. Santos & Reyes-Bet.	LiArb	—	ERX4839896	Ця стаття; Baker et al, 2022
Рід <i>Limonium</i> Mill., підрід <i>Limonium</i>				
<i>L. aureum</i> (L.) Hill ex Kuntze	LiAur	—	SRX11323531	Ця стаття
<i>L. bicolor</i> Kuntze	LiBic	—	SRX11294670	Ця стаття; Yuan et al, 2022
<i>L. gmelinii</i> (Willd.) Kuntze	LiGmel	2	OR296441	Ця стаття
		5	OR296442	Ця стаття
		6	OR296443	Ця стаття
		7	OR296444	Ця стаття
			SRX11452929	Ця стаття
<i>L. otolepis</i> (Schrenk) Kuntze	LiOto			Ця стаття
<i>L. platyphyllum</i> Lincz.	LiPla1	1	OR296445	Ця стаття
		3	OR296446	Ця стаття
		6	OR296447	Ця стаття
<i>L. tomentellum</i> Kuntze syn. <i>L. tschurjukiense</i> Lavr. ex Klok.	LiTom1	1	OR296448	Ця стаття
		2	OR296449	Ця стаття
		5	OR296450	Ця стаття
<i>L. vulgare</i> Mill.	LiVul	—	SRX8928164	Ця стаття
Рід <i>Armeria</i> Willd.				
<i>A. maritima</i> Girard ex Boiss.	ArMar	—	ERX5334768	Ця стаття; NAVF
<i>A. scabra</i> Willd.	AcSea	—	ERX5334956	Ця стаття; NAVF
Рід <i>Ceratolimon</i> M.B. Crespo & M.D. Lledó				
<i>C. feei</i> (Girard) M.B. Crespo & M.D. Lledó	CeFeei	—	ERX7192337	Ця стаття; Baker et al, 2022
Рід <i>Goniolimon</i> Boiss.				
<i>G. besserianum</i> Nyman	GoBes2	7	OR296453	Ця стаття
<i>G. rubellum</i> (S.G.Gmel.) Klovov (syn. <i>G. orae-syvashicae</i> Klovov)	GoRub1	8	OR296454	Ця стаття
		1	OR296451	Ця стаття
<i>G. tataricum</i> Boiss.	GoTat	2	OR296452	Ця стаття
		—	ERX7192339	Ця стаття; Baker et al, 2022

Примітка. NAVF, 1500 Genome Skims from the Norwegian Arctic Vascular Flora.



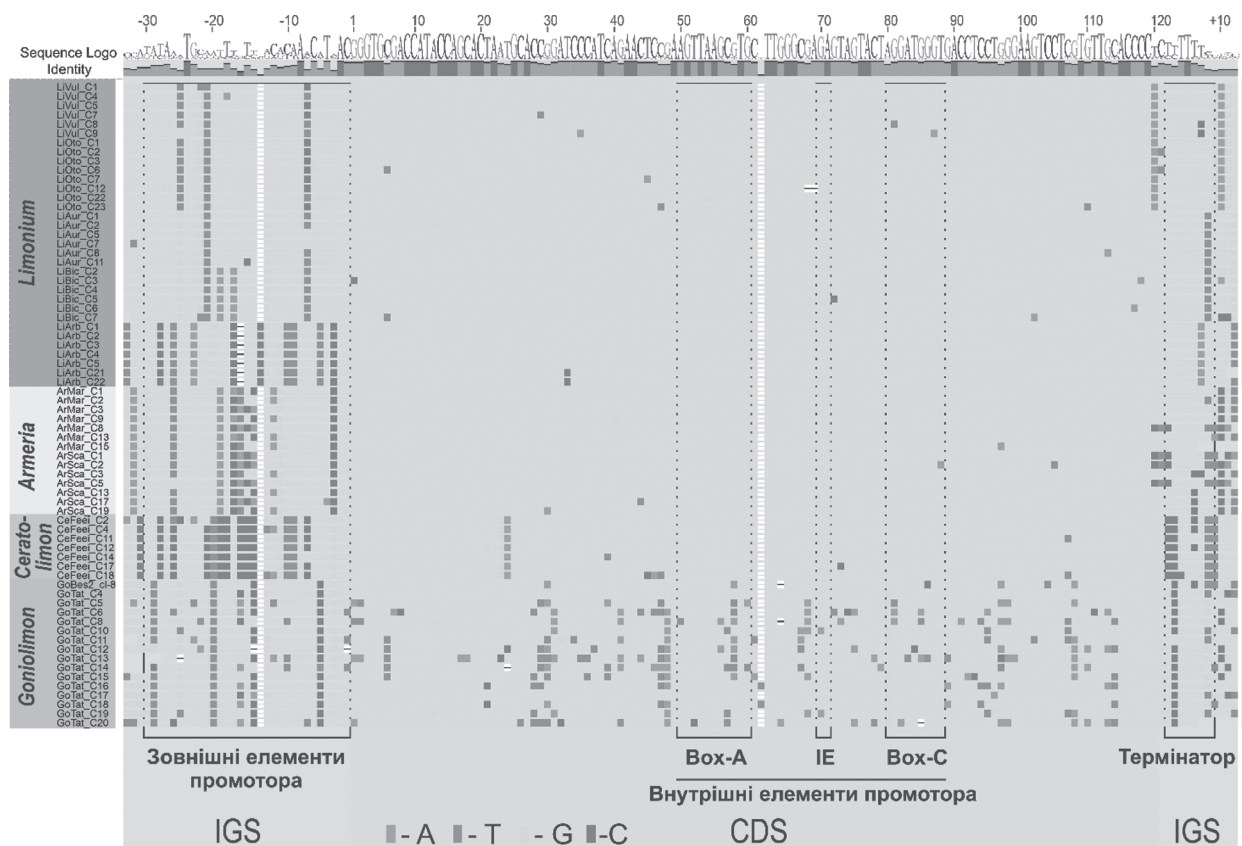


Рис. 1. Вирівнювання послідовностей CDS та фланкуючих фрагментів IGS 5S рДНК представників триби Limoniaceae. Інформація про використаний рослинний матеріал та послідовності 5S рДНК наведена в табл. 1

містити один повний повтор IGS+CDS та фрагмент другого IGS.

Також, *de novo* асемблінг 5S рДНК з бібліотек коротких рідів *Plumina* був проведений для п'яти видів *Limonium*, двох видів *Armeria* та по одному виду *Ceratolimon* та *Goniolimon*. Загалом, було отримано 78 контигів, довжина яких значною мірою залежала від глибини секвенування геному та довжини секвенуваних рідів. Тому, частина контигів містила повні повтори, тоді як інші містили лише повні IGS, фланковані фрагментами CDS, або, навпаки, повні CDS фланковані фрагментами IGS.

**Організація та мінливість CDS.** Вирівнювання 70-и повних послідовностей CDS 5S рДНК проводилось разом із короткими фланкуючими фрагментами IGS на 5'- та 3'- кінцях (рис. 1). Встановлено, що довжина CDS знаходиться в межах від 118 до 121 нп. Відповідно, загальна довжина вирівнювання CDS становить 121 нп,

що пов'язано із інсерцією тиміну в двох контигах *G. tataricum*: GoTat\_C16 та GoTat\_C18. Також, у послідовностях CDS видів роду *Goniolimon* зустрічалися одонуклеотидні делеції в позиціях 24 (GoTat\_C14), 65 (GoBes2-8, GoTat\_C8) та 86 (GoTat\_C20). Для представників трьох інших родів виявлено лише одну донуклеотидну делецію в позиції 69–70 нп контигу LiOto\_C12.

Крім інделів у послідовностях CDS також присутні нуклеотидні заміни. Для послідовностей з геномів представників трьох родів, *Limonium*, *Armeria* та *Ceratolimon*, виявлено дві позиції, в яких відмінності від консенсуса є специфічними для певних таксонів. Так, заміна T→A в останній позиції CDS відрізняє послідовності *L. vulgare* та *L. otolepis* від решти досліджених видів *Limonium* та всіх інших представників триби Limoniaceae. Заміна AT→GA в позиції 23–24 характерна для всіх CDS *C. feei*.

Ще одна заміна останнього нуклеотиду в CDS (Т→С) спостерігається в контигах обох видів *Armeria*. Однакові нуклеотидні заміни наявні у двох із семи контигів *L. arboreum* та двох з семи контигів *C. feei*. Одна заміна співпадає у контигах LiOto\_C6 та LiVic\_C7. Інші 25 замін є унікальними для окремих контигів. Слід зазначити, що в абсолютній більшості контигів спостерігається не більше однієї заміни порівняно з консенсусом. Лише в CeFeei\_18 наявні чотири нетипові для цього виду заміни, причому три з них розміщені підряд. Частка парсимоній-інформативних позицій від всіх варіабельних нуклеотидів в CDS представників родів *Limonium*, *Armeria* та *Ceratolimon* становить приблизно 20 % (табл. 2).

Інша картина спостерігається в CDS видів роду *Goniolimon* (рис. 1). Середня кількість варіабельних сайтів в цих послідовностях становить 3,7 %, тобто перевищує цей показник для інших трьох родів більше, ніж у 7 разів. Частка парсимоній-інформативних позицій від всіх варіабельних нуклеотидів для CDS *Goniolimon* наближається до 50 %. На відміну від CDS представників інших трьох родів, значна кількість мутацій у видів *Goniolimon* знаходиться у ділянках Вох-А, ІЕ та Вох-С, які є внутрішніми елементами промотора РНК-полімерази ІІІ. Цікаво, що у CDS видів роду *Goniolimon* абсолютну більшість нуклеотидних замін

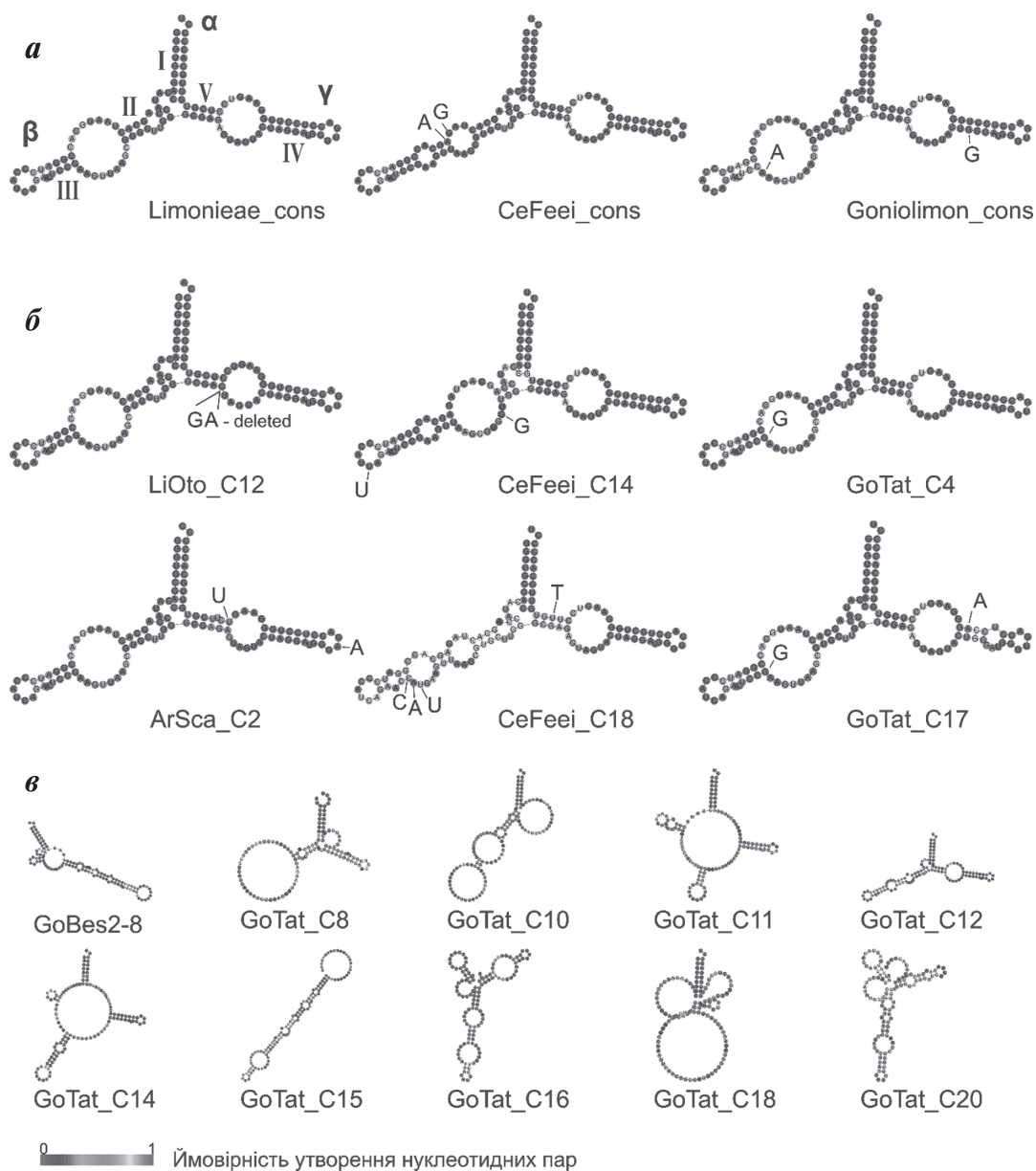
складають транзиції С→Т та G→А. Наслідком цих мутацій є зменшення вмісту GC-пар в CDS *Goniolimon* до 48,8 %, порівняно із середнім значенням 56,6 % для трьох інших проаналізованих родів.

*Аналіз вторинної структури CDS.* Наявність мутацій в CDS представників триби Limonieae, особливо у видів роду *Goniolimon*, може вказувати на присутність в геномах цих рослин псевдогенізованих копій 5S рДНК. З огляду на це, ми перевірили можливість утворення канонічних вторинних структур транскриптами CDS 5S рДНК для представників триби Limonieae. Встановлено, що консенсусна послідовність CDS для триби Limonieae (*Limonieae\_cons* – рис. 2), яка співпадає з послідовністю CDS для більшості контигів *L. aureum*, *L. bicolor*, *L. arboreum* та *A. maritima* може утворювати тридоменну Y-подібну вторинну структуру з п'ятьма спіралями та петлями. Ця структура є дуже подібною із описаною раніше для *Arabidopsis thaliana* та інших видів покритонасінних та демонструє всі типові для еукаріот елементи організації (Joachimiak et al, 1990; Barciszewska et al, 2001; Sun and Caetano-Anollés, 2009; Mahelka et al, 2013; Tynkevich et al, 2022b). Нуклеотидні заміни, наявні в останній позиції CDS у *L. vulgare*, *L. otolepis* та *A. scabra* не впливають на формування вторинної структури (дані не наводяться), оскільки цей нуклеотид не бере

Таблиця 2. Характеристика нуклеотидних послідовностей 5S рДНК представників триби Limonieae

Таксон	k1	k2	R	GC, %	V, %	Pi, %	Середня попарна подібність, %
<i>CDS</i>							
<i>Limonium + Armeria + Ceratolimon</i>	1,867	2,58	1,08	56,6	0,49	0,1	98,1
<i>Goniolimon</i>	6,414	5,428	2,97	48,8	3,7	1,8	82,8
<i>IGS</i>							
<i>Limonium</i>	2,731	1,599	0,91	31,5	1,9	1,6	73,6
<i>Armeria</i>	2,097	2,993	1,15	34,4	4,5	2	84,8
<i>Ceratolimon</i>	4,033	4,202	2,0	69,2	0,6	–	97,2
<i>Goniolimon</i>	5,153	3,156	2,14	50,3	7,7	4,4	59,7

*Примітка.* k – співвідношення швидкостей транзицій/трансверсій: для пуринів – k1, для піримідинів – k2; R – значення транзитивного зсуву; GC – середній вміст GC-пар для групи послідовностей; V – % варіабельних сайтів в розрахунку на одну послідовність; Pi – % парсимоній-інформативних сайтів в розрахунку на одну послідовність



**Рис. 2.** Прогнозовані моделі вторинних структур транскриптів 5S рРНК представників триби *Limoniae*. *a* – моделі на основі консенсусних послідовностей для таксономічних груп (вказані нуклеотиди, які відрізняються від консенсусної послідовності для триби); *б* – моделі для послідовностей, які відрізняються від консенсусних невеликою кількістю мутацій (вказані відмінності від консенсусних послідовностей для відповідних таксономічних груп); *в* – приклади структур з великою кількістю мутацій, отримані для послідовностей з геномів *Goniolimon*. Інформація про використані послідовності 5S рДНК наведена в табл. 1

участь у внутрішньомолекулярних взаємодіях (Barciszewska et al, 2001). Отже, складається враження, що всі ці варіанти CDS кодують функціональні молекули 5S рРНК.

Цікавим випадком є консенсусна послідовність CDS 5S рРНК *C. feei* (*CeFeei\_cons*), яка

містить дві підряд нуклеотидні заміни. Це призводить до зміни структури домену  $\beta$ , а саме – до утворення двох маленьких петель на місці великої петлі В. Але, оскільки ці заміни є в усіх CDS, виявлених у геномі *C. feei*, логічно припустити, що така зміна вторинної структу-

ри не має вирішального впливу на функціональність 5S рРНК.

Більшість CDS з геномів *Limonium*, *Armeria* та *Ceratolimon* відрізняються від відповідних консенсусних послідовностей не більше, ніж на одну заміну. Проте, деякі CDS містять дві або більше замін або інделів. Для таких CDS ми також побудували гіпотетичні вторинні структури (рис. 2, б). Отримані результати свідчать, що проаналізовані послідовності здатні укладатись у Y-подібну вторинну структуру, хоча вона може мати певні відхилення від канонічної. При цьому зміни у вторинній структурі транскриптів більше залежать від розташування мутацій, ніж від їх кількості. Питання про функціональність таких варіантів 5S рРНК залишається відкритим.

Загалом, аналіз CDS 5S рДНК показує, що для представників родів *Limonium*, *Armeria* та *Ceratolimon* характерний достатньо високий рівень подібності цієї ділянки, як на внутрішньогеномному рівні, так і між окремими видами та родами. При цьому, невеликий відсоток парсимоній-інформативних замін свідчить про активну роль стабілізуючого добору в еволюції цих послідовностей, що узгоджується з аналогічними даними для абсолютної більшості інших груп організмів (Vierna et al, 2013; Symonová, 2019). В той же час, наявність кількох внутрішньогеномних варіантів CDS може свідчити про недостатню швидкість концертної еволюції (Wang et al, 2023).

На відміну від *Limonium*, *Armeria* та *Ceratolimon* у представників роду *Goniolimon* виявлено неочікувано значну мінливість CDS 5S рДНК. При цьому, багато мутацій спостерігається у внутрішніх ділянках промотора, що має призводити до порушення ініціації транскрипції (Cloix et al, 2003) та втрати функціональності таких повторів 5S рДНК.

Для того, щоб перевірити, чи різні варіанти повторів рДНК *Goniolimon* являють собою псевдогени ми дослідили здатність відповідних транскриптів утворювати вторинні структури. Встановлено, що CDS контигу GoTat\_C4 формує вторинну структуру, яка ідентична до такої для консенсусної послідовності CDS триби Limonieae (*Limonieae\_cons* – рис. 2, а), а вторинна структура CDS GoTat\_C17 відрізняється лише появою невеликої додаткової

петлі в домені  $\gamma$ . Окрім того, консенсусна послідовність CDS для роду *Goniolimon*, *Goniolimon\_cons*, яка відрізняється двома замінами нуклеотидів від послідовності *Limonieae\_cons*, здатна укладатись у структуру, яка лише незначно відрізняється від канонічної. Проте, вторинні структури, які було отримано для переважної більшості послідовностей CDS видів роду *Goniolimon*, суттєво відрізняються від канонічної (рис. 2, в), і, ймовірно, не можуть виконувати свою функцію в рибосомі.

На загал, отримані нами дані свідчать, що в геномах видів роду *Goniolimon* більшість повторів 5S рДНК являють собою псевдогени, які уникають концертної еволюції.

Для того, щоб більш детально охарактеризувати молекулярну еволюцію 5S рДНК ми розрахували значення транзитивного зсуву для CDS (табл. 2). Цей показник відображає переважання транзицій над трансверсіями, яке часто зустрічається у ході молекулярної еволюції (Vogel and Korun, 1977; Arndt et al, 2003). Виявилось, що у роді *Goniolimon* значення транзитивного зсуву для CDS становить 2,97, порівняно до 1,08 для родів *Limonium*, *Armeria* та *Ceratolimon* (табл. 2). Причиною зростання транзитивного зсуву можна вважати підвищену частоту транзицій C→T та G→A у CDS *Goniolimon*, яка була описана нами вище. Отже, з огляду на те, що більшість повторів 5S рДНК *Goniolimon* є псевдогенами, складається враження, що псевдогенізація пов'язана із зростанням частоти транзицій C→T та G→A у ході молекулярної еволюції. Раніше накопичення транзицій C→T та G→A було описано для 5S рДНК псевдогенів у геномі *Atropa belladonna* (Volkov et al, 2017).

Відомо, що переважання транзицій C→T та G→A є типовим для еукаріот (Takano-Shimizu, 2001; Arndt et al, 2003; Šmarda and Bureš, 2012), хоча причини цього явища не до кінця зрозумілі. Однією із найбільш вірогідних причин вважається відносна легкість дезамінування 5-метил цитозину (5 mC) і перетворення його у тимін (Duncan and Miller, 1980; Keller et al, 2007). Цей механізм був визнаний основним джерелом транзицій в CDS 5S рДНК в геномі арабідопсису (Simon et al, 2018), що, імовірно, є наслідком високого рівню метилювання цитозину у 5S рДНК рослин (Fulneček et al, 1998;



Fulneček et al, 2002; Simon et al, 2018). Тож, ми припускаємо, що дезамінування 5 мС є джерелом збільшення С→Т та G→А транзицій в еволюції 5S рРНК-псевдогенів у роді *Goniolimon*.

**Молекулярна організація та поліморфізм IGS.** Клонування 5S рДНК та асемблінг рідів Illumina дозволили ідентифікувати 57 варіантів IGS для представників триби Limonieae. Встановлено, що довжина IGS знаходиться в межах від 197 нп у *G. tataricum* (GoTat\_C7) до 312 нп у *L. arboreum* (LiArb\_C22) та попадає в діапазон, типовий для вищих рослин (Besendorfer et al, 2005; Ishchenko et al, 2018; Tynkevich and Volkov, 2019; Stepanenko et al, 2022; Tynkevich et al, 2022b).

Досліджені роди триби Limonieae суттєво різняться за вмістом GC-пар в IGS (табл. 2). Найнижчий середній вміст GC-пар, 31,5 % знайдено в IGS представників роду *Limonium*, а найвищий, 69,2 % – у IGS *C. feei*, що перевищує цей показник для більшості рослин (Besendorfer et al, 2005; Tynkevich and Volkov, 2014; Tynkevich and Volkov 2019; Ishchenko et al, 2020; Stepanenko et al, 2022; Tynkevich et al, 2022a; Tynkevich et al, 2022b).

Порівняння послідовностей IGS видів триби Limonieae показало, що середній показник дивергенції між послідовностями IGS представників різних родів знаходиться в межах 55,7–70,3 % (табл. 3), що свідчить про значну філогенетичну дистанцію між ними. Також високий рівень дивергенції, 56,1 %, був виявлений між *L. arboreum*, який належить до підроду *Pteroclados* та іншими видами роду *Limonium*, які належать до підроду *Limonium*. В межах цього підроду середня дивергенція становила лише 15,9 %. Ще меншою виявилась різниця між IGS роду *Armeria*. Проте, для послідовностей IGS роду *Goniolimon* показник дивергенції

виявився значно вищим – 31,0 %. Цей результат можна пояснити тим, що більша частина IGS представників роду *Goniolimon* є частиною псевдогенізованих повторів, які, як було показано вище, еволюціонують із підвищеною швидкістю і уникають гомогенізації.

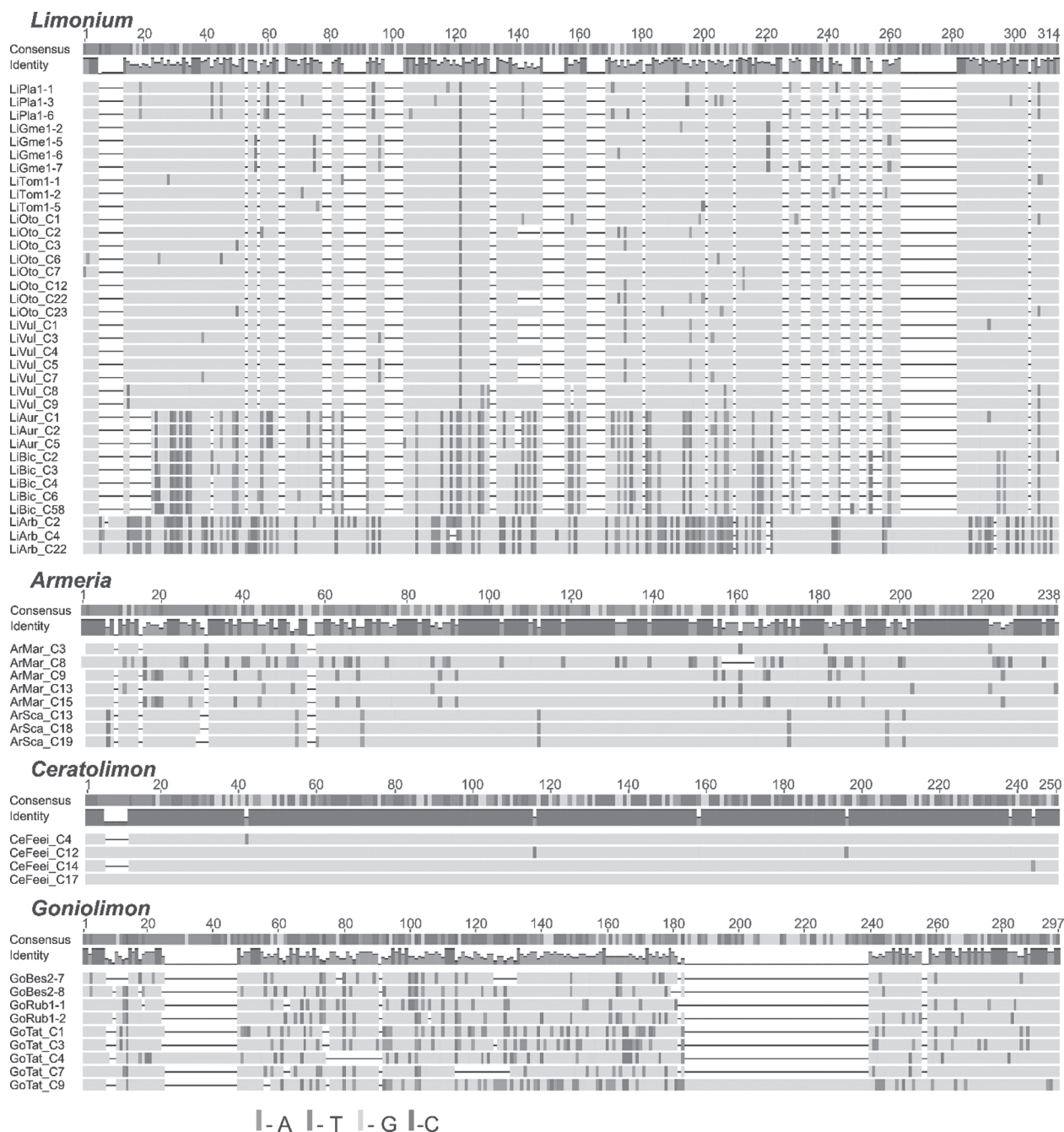
Коректне вирівнювання сильно дивергованих послідовностей є проблематичним. Тому, в подальшому ми зосередились на порівнянні IGS лише в межах окремих родів (рис. 3). Встановлено, що IGS досліджених видів відрізняються численними замінами нуклеотидів та інделами. Зокрема, відносно велика довжина IGS *L. arboreum* пов'язана з наявністю кількох коротких інсерцій по всій довжині спейсера. Найбільші інсерції довжиною 22 та 56 нп виявлено, відповідно, у контигах GoTat\_C4 та GoTat\_C9 *G. tataricum* (рис. 3). Інсерція довжиною 22 нп показує суттєву подібність та ймовірно утворилась внаслідок триплікації сусідньої T-багатої зони термінації транскрипції (див. нижче), тоді як інсерція довжиною 56 нп не показує подібності з іншими частинами IGS.

Визначення характеру нуклеотидних замін, які відбувались протягом еволюції, свідчить, що у IGS, як і в CDS, переважали транзиції. Як і для CDS, транзитивний зсув виявився найвищим у представників роду *Goniolimon* (табл. 2), у яких цей показник майже вдвічі більший, ніж у видів *Limonium* та *Armeria*.

В усіх досліджених родах триби Limonieae на 3'-кінці IGS безпосередньо перед CDS спостерігається відносно консервативна ділянка довжиною близько 30–35 нп. Раніше було встановлено, що у *Arabidopsis thaliana* в цій ділянці розташовуються зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III (Cloix et al, 2003; Douet and Tourmente, 2007), що може бути причиною її

Таблиця 3. Середня еволюційна дивергенція (%) між послідовностями IGS 5S рДНК родів триби Limonieae

Таксон	<i>Limonium</i> , підрід <i>Limonium</i>	<i>Limonium</i> , підрід <i>Pteroclados</i>	<i>Armeria</i>	<i>Ceratolimon</i>	<i>Goniolimon</i>
<i>Limonium</i> , підрід <i>Limonium</i>	15,9				
<i>Limonium</i> , підрід <i>Pteroclados</i>	56,1	6,8			
<i>Armeria</i>	58,8	55,7	13,7		
<i>Ceratolimon</i>	70,3	62,9	64,9	2,0	
<i>Goniolimon</i>	57,1	58,9	60,5	57,4	31,0



**Рис. 3.** Вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК представників чотирьох родів триби Limonieae. Інформація про використані послідовності 5S рДНК наведена в табл. 1

еволюційної консервативності. Відносна консервативність 3'-кінця IGS була також виявлена в інших групах рослин, проте у різних родинах зовнішні елементи промотора можуть суттєво відрізнятися від «канонічної» послідов-

ності, описаної для арабідопсису (Douet and Tourmente, 2007; Tynkevich and Volkov, 2019; Ishchenko et al, 2021). У представників триби Limonieae з трьох канонічних елементів зовнішнього промотора найкраще збереженим

виявився нуклеотид С в позиції -1 (рис. 1). Лише у трьох контигів *G. tataricum* у цьому сайті присутня С→Т транзиція. Інший елемент промотора, динуклеотид GC присутній в позиції -11 у IGS обох видів *Armeria* або у позиції -13 у *L. aureum*, *L. bicolor*, *L. arboreum* та у деяких контигах *C. feei* та *G. tataricum*. В більшості інших послідовностей, як в позиції -11, так -13, присутній динуклеотид GA. Останній передбачуваний елемент промотора, ТАТА-бокс подібний мотив присутній в позиції -30 і у видів *Limonium* має консенсусну послідовність ТАТААВ. Проте, у *L. arboreum* його послідовність виглядає як ТАСАТА, тоді як у видів роду *Armeria* – GАТАТА. Найбільш видозміненим цей мотив є у представників родів *Ceratolimon* та *Goniolimon*, у яких він представлений послідовностями ТАСGСА та GTТАAG, відповідно.

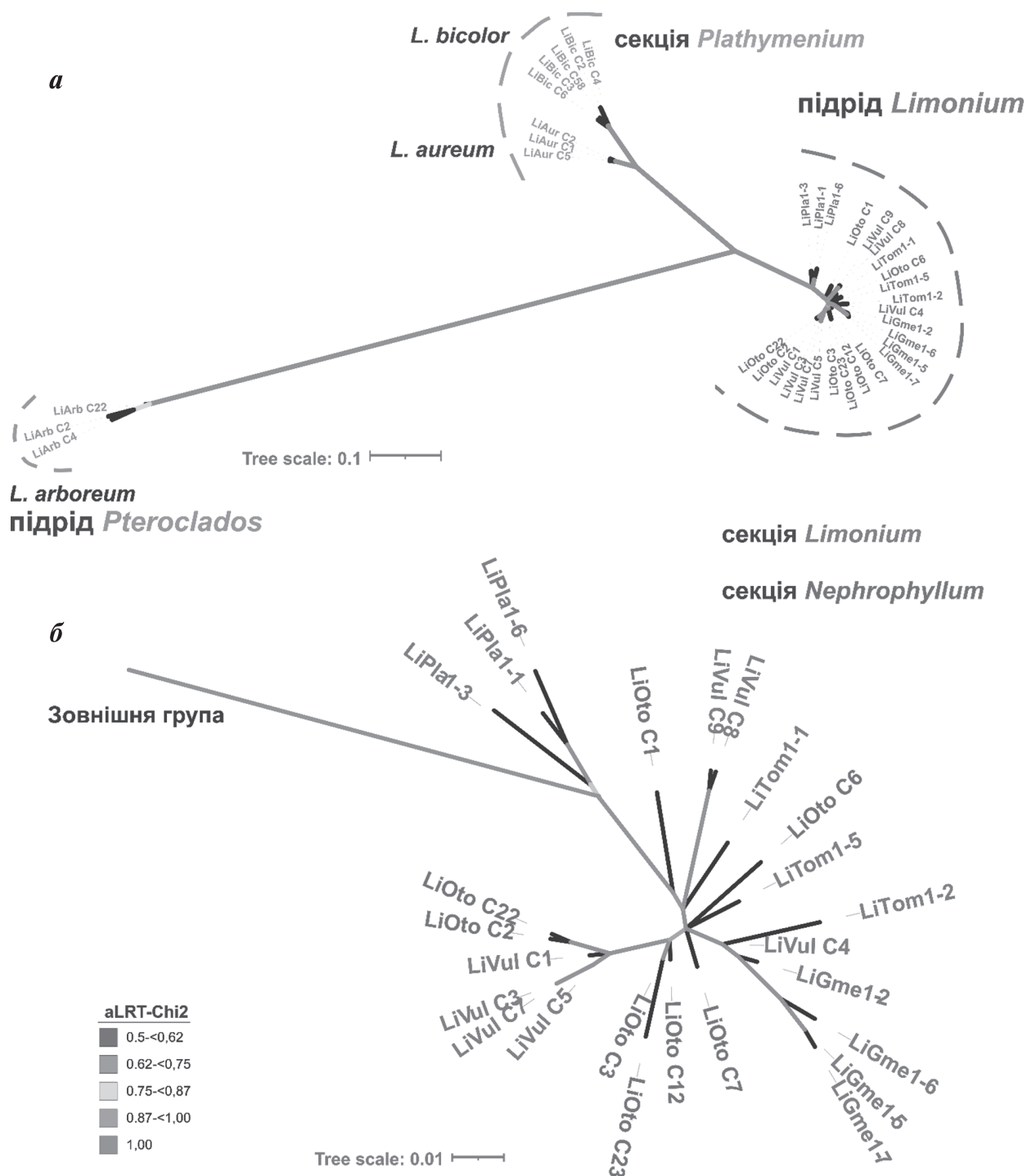
Ще одна коротка консервативна ділянка, яка містить декілька залишків тиміну, розташована на початку IGS безпосередньо після CDS (рис. 3). Вочевидь, ця ділянка являє собою термінатор транскрипції РНК-полімерази III, який у інших рослин представлений оліго-Т нуклеотидними послідовностями довжиною не менше 5 нп (Douet and Tourmente, 2007; Ciganda and Williams, 2011; Tynkevich and Volkov, 2019; Ishchenko et al, 2021; Tynkevich et al, 2022a; Tynkevich et al, 2022b).

Використання послідовностей IGS 5S рДНК у філогенетичному аналізі. Низька подібність послідовностей IGS 5S рДНК представників різних родів триби Limoniaceae унеможливує їх використання для реконструкції філогенетичних відносин в межах цієї групи. Тим не менш, значна мінливість цієї ділянки обумовлює ефективність її застосування для філогенетичного аналізу на внутрішньородовому рівні. Відповідно, використовуючи всі наявні послідовності IGS ми побудували ML невикорінену філодендрограму для восьми видів роду *Limonium* (рис. 4), серед яких сім належать до підроду *Limonium*, а один, *L. arboreum* – до підроду *Pteroclados* (Lledy et al, 2005). На отриманій дендрограмі послідовності IGS *L. arboreum* утворюють найдовшу гілку (рис. 4, а). В межах підроду *Limonium* виявлено дві клади, які мають високу статистичну підтримку. Перша з цих клад включає *L. aureum* та *L. bicolor*, які належать

до секції *Plathymenium*. Друга клада об'єднує представників двох секцій (Koutroumpa et al, 2018), *Limonium* (*L. gmelinii*, *L. platyphyllum*, *L. tomentellum*, *L. vulgare*) та *Nephrophyllum* (*L. otolepis*) (рис. 4, б).

Відокремлене положення *L. arboreum* узгоджується з даними інших філогенетичних досліджень. У роботах з використанням кількох ділянок хлоропластної ДНК та ITS ядерної 35S рДНК представники підроду *Pteroclados* завжди утворюють сестринську, чітко відокремлену від інших видів *Limonium* групу (Lledy et al, 2005; Malekmohammadi et al, 2017; Koutroumpa et al, 2018). Філогенетична дистанція між *L. arboreum* та іншими видами роду *Limonium*, розрахована нами з використанням послідовностей IGS 5S рДНК є подібною до дистанцій між родами *Limonium* і *Armeria* або *Limonium* і *Goniolimon*. Також, ця дистанція є значно більшою, ніж дистанції між видами одного роду у кількох родинях покритонасінних (Mlinarec et al, 2016; Tynkevich and Volkov, 2019; Vozárová et al, 2021). Отже, ми вважаємо, що група *Pteroclados* може розглядатись як окремий рід.

Секція *Limonium* в попередніх молекулярно-філогенетичних аналізах виявлялась поліфілетичною (Lledy et al, 2005; Malekmohammadi et al, 2017; Koutroumpa et al, 2018). При цьому, більша частина видів секції *Limonium* (в тому числі – *L. gmelinii*, *L. platyphyllum*, *L. tomentellum*, *L. vulgare*) групувалась разом із видами секції *Iranolimon*, тоді як, інші види (зокрема – *L. otolepis*) – із секцією *Plathymenium* (Malekmohammadi et al, 2017; Koutroumpa et al, 2018). Цю другу групу видів секції *Limonium* пропонували винести в окрему секцію *Nephrophyllum* (Koutroumpa et al, 2018). Проте, результати аналізу послідовностей IGS 5S рДНК не підтверджують близьку спорідненість *L. otolepis* з видами секції *Plathymenium*, оскільки на нашій дендрограмі всі досліджені види секцій *Limonium* та *Nephrophyllum* утворюють добре відокремлену монофілетичну групу, що відповідає уявленню про приналежність *L. otolepis* до секції *Limonium*. Суперечливість результатів, отриманих з використанням для філогенетичної реконструкції різних ділянок геному зайвий раз підкреслює важливість мультилокусних підходів та недоцільність поєднання в межах одного аналізу послідовностей,



**Рис. 4.** Невкорінена Maximum-Likelihood філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Limonium*. *а* – загальна топологія; *б* – топологія в межах секцій *Limonium* та *Nephrophyllum*. Колір гілок на дендрограмі відповідає значенням aLRT-Chi2 статистичної підтримки відповідних груп (див. легенду). Таксономія роду *Limonium* наведена за Koutroumpa et al (2018) та WFO (2023). Інформація про використаний рослинний матеріал та послідовності 5S рДНК наведена в табл. 1



які еволюціонують по-різному, зокрема, пластидних і ядерних маркерів.

В межах кладі *Limonium* + *Nephrophyllum* на отриманій нами дендрограмі (рис. 4, б) послідовності IGS не завжди групуються відповідно до видової приналежності, що може бути наслідком неповного сортування ліній або міжвидової гібридизації в ході еволюції. Тим не менш, отримані з використанням IGS 5S рДНК результати дозволили розмежувати *L. platyphyllum*, *L. gmelinii* та *L. tomentellum*, хоча в попередніх дослідженнях ці три види разом з *L. meyeri*, *L. bungei*, та *L. sareptanum* розглядалися у складі таксономічного комплексу з невирішеними філогенетичними відносинами (Malekmohammadi et al, 2017; Koutroumpa et al, 2018).

Для кращого розуміння таксономії роду *Limonium* необхідні додаткові дослідження із використанням більшої кількості рослинних зразків та залученням ширшого набору молекулярних маркерів. Зокрема, актуальним видається подальше дослідження рідкісних ендемічних видів триби Limonieae, які зустрічаються на території України та часто мають проблемний таксономічний статус, у порівнянні з близько спорідненими формами іншого географічного походження. Отримані нами результати свідчать, що аналіз IGS 5S рДНК може бути успішно використаний для ДНК-баркодингу таких видів.

**Висновки.** У CDS 5S рДНК представників родів *Limonium*, *Armeria* та *Ceratolimon* наявні поодинокі нуклеотидні заміни, які не впливають на здатність транскриптів 5S рРНК утворювати канонічні вторинні структури.

У геномах видів роду *Goniolimon*, окрім функціонально повноцінних повторів 5S рДНК, наявна велика кількість псевдогенів, які еволюціонують неконцертним способом та містять численні мутації у CDS, які порушують вторинну структуру їх потенційних транскриптів. Серед мутацій у CDS псевдогенів виявлене переважання транзицій С→Т та G→A, що призводить до зменшення відносного вмісту GC-пар.

Значна філогенетична дистанція між представниками підродів *Pteroclados* та *Limonium* роду *Limonium* свідчить, що *Pteroclados* може розглядатись як окремий рід. Висока швид-

кість молекулярної еволюції робить IGS 5S рДНК зручним інструментом для баркодингу та реконструкції філогенетичних відносин в різних родах триби Limonieae.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень за участю людей або 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).

#### 5S RIBOSOMAL DNA IN THE FAMILY PLUMBAGINACEAE

Y.O. Tynkevich, M.O. Valin, I.I. Moysiienko, I.I. Panchuk, R.A. Volkov

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Kotsiubynsky str. 2, 58012 Chernivtsi, Ukraine  
Kherson State University, University str. 27, 73000 Kherson, Ukraine

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

Tandemly arranged repetitive regions (repeats) that encode 5S rRNA (5S rDNA) are a vital component of eukaryotic genomes. Typically, 5S rDNA repeats are highly similar within a genome due to the concerted nature of the evolution of this type of repeats. Each 5S rDNA repeat consists of an evolutionarily conserved coding sequence (CDS) and a variable intergenic spacer (IGS). 5S rDNA is a popular model for studying the molecular evolution of repetitive sequences, and the high rate of IGS mutations determines its wide use in phylogenetic analysis of closely related taxa. Nevertheless, 5S rDNA still remains unexplored for many groups of higher plants, in particular, the family Plumbaginaceae. Some taxa of this family are endemic to southern Ukraine and are included in the Red Book. However, their taxonomic status is controversial, and its clarification requires the use of molecular phylogenetic methods. In this work, we investigated the molecular organization of 5S rDNA for representatives of four genera of the tribe Limonieae, which is the largest one in the Plumbaginaceae family. It was shown that the CDS of 5S rDNA of representatives of the genera *Limonium*, *Armeria*, and *Ceratolimon* possess single mutations that do not interfere with the formation of the secondary structure of 5S rRNA. In contrast, in the genomes of *Goniolimon* species, in addition to functionally normal 5S rDNA repeats, numerous pseudogenes that evolve in a non-concert manner and contain numerous mutations in the CDS that disrupt the secondary structure of 5S rRNA were found. A significant phylogenetic distance

between representatives of the subgenera *Pteroclados* and *Limonium* of the genus *Limonium* indicates that *Pteroclados* can be considered a separate genus. The high rate of molecular evolution makes 5S rDNA IGS a convenient tool for the reconstruction of phylogenetic relationships within the studied genera of the tribe Limonieae and barcoding of Ukrainian endemics of the genus *Limonium*.

#### 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>
- Arndt PF, Petrov DA, Hwa T (2003) Distinct changes of genomic biases in nucleotide substitution at the time of mammalian radiation. *Mol Biol Evol* 20(11):1887–1896. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg204>
- Baker WJ, Bailey P, Barber V, Barker A, Bellot et al (2022) A comprehensive phylogenomic platform for exploring the angiosperm tree of life. *Syst Biol* 71(2):301–319. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syab035>
- Baker WJ, Hedderson TA, Dransfield J (2000) Molecular phylogenetics of *Calamus* (Palmae) and related rattan genera based on 5S nrDNA spacer sequence data. *Mol Phylogenet Evol* 14(2):218–231. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0697>
- Barciszewska MZ, Szymański M, Erdmann VA, Barciszewski J (2001) Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim Pol* 48(1):191–198. [https://doi.org/10.18388/abp.2001\\_5126](https://doi.org/10.18388/abp.2001_5126)
- Besendorfer V, Krajačić-Sokol I, Jelenić S, Puizina J, Mlinarec J, Sviben T, Papeš D (2005) Two classes of 5S rDNA unit arrays of the silver fir, *Abies alba* Mill.: structure, localization and evolution. *Theor Appl Genet* 110:730–741. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1899-y>
- Borchsenius F (2009) FastGap 1.2, Department of Biosciences, Aarhus University, Denmark, Published online at [http://www.aubot.dk/FastGap\\_home.htm](http://www.aubot.dk/FastGap_home.htm).
- Burland TG (1999) DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Bioinformatics methods and protocols* 71–91 p. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:71>
- Chen G, Stepanenko A, Borisjuk N (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>
- Cherevatov OV, Volkov RA (2011) Organization of 5S ribosomal DNA of *Melitaea trivialis*. *Cytol Genet* 45(2): 115–120. <https://doi.org/10.3103/S0095452711020034>
- Christenhusz MJ, Byng JW (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261(3):201–217. <https://doi.org/10.11646/PHYTOTAXA.261.3.1>
- Ciganda M, Williams N (2011) Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdiscip. Rev.: RNA* 2(4):523–533
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01793.x>
- Cronn RC, Zhao X, Paterson AH, Wendell JF (1996) Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. *J Mol Evol* 42:685–705. <https://doi.org/10.1007/BF02338802>
- Didukh Y (2009) Red Data Book of Ukraine. Roslynnnyi svit (Red Data Book of Ukraine. Plant Kingdom), Kyiv: Globalconsulting
- 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>
- Duncan BK, Miller JH (1980) Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* 287(5782):560–561. <https://doi.org/10.1038/287560a0>
- Eirín-Lypez JM, Rebordinos L, Rooney AP, Rozas J (2012) The birth-and-death evolution of multi-gene families revisited. *Repetitive DNA* 7:170–196. <https://doi.org/10.1159/000337119>
- Fulneček J, Lim KY, Leitch AR, Kovařík A, Matyášek R (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>
- Fulneček J, Matyášek R, Kovařík A, Bezděk M (1998) Mapping of 5-methylcytosine residues in *Nicotiana tabacum* 5S rRNA genes by genomic sequencing. *Mol General Genet MGG* 259:133–141. <https://doi.org/10.1007/s004380050798>
- García S, Kovařík A (2013) Dancing together and separate again: gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 35S rRNA gene (rDNA) organisation. *Heredity* 111(1):23–33. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.11>
- García S, Gálvez F, Gras A, Kovařík A, Garnatje T (2014) Plant rDNA database: update and new features. *Database* bau063. <https://doi.org/10.1093/database/bau063>
- García S, Panero JL, 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 Biol* 10(1):1–18. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-176>
- García S, Wendel JF, 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). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00041>
- Gottlob-McHugh SG, Levesque M, MacKenzie K, Olson M, Yarosh O, Johnson DA (1990) Organization of the 5S rRNA genes in the soybean *Glycine max* (L.) Merrill and conservation of the 5S rDNA repeat structure in higher plants. *Genome* 33(4):486–494. <https://doi.org/10.1139/g90-072>
- Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL (2008) The vienna RNA websuite. *Nucl Acids Res* 36(suppl\_2):W70–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
- Hemleben V, Grierson D, Borisjuk N, Volkov RA, Kovarik A (2021) Personal perspectives on plant ribosomal RNA genes research: From precursor rRNA to molecular evolution. *Front Plant Sci* 12(797348). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.797348>
- Ishchenko OO, Bednarska IO, Panchuk II (2021) Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytol Genet* 55:10–18. <https://doi.org/10.3103/S0095452721010096>
- Ishchenko OO, Mel'nyk VM, Parmikoza IY, Budzhak VV, Panchuk II, Kunakh VA, Volkov RA (2020) Molecular organization of 5S ribosomal DNA and taxonomic status of *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (Poaceae). *Cytol Genet* 54:505–513. <https://doi.org/10.3103/S0095452720060055>
- Ishchenko OO, Panchuk II, Andreev IO, Kunakh VA, Volkov RA (2018) Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol Genet* 52(6):416–421. <https://doi.org/10.3103/S0095452718060105>
- Joachimiak A, Nalaskowska M, Barciszewska M, Barciszewski J, Mashkova T (1990) Higher plant 5S rRNAs share common secondary and tertiary structure. A new three domains model. *Int J Biol Macromol* 12(5):321–327. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(90\)90022-3](https://doi.org/10.1016/0141-8130(90)90022-3)
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinformatics* 20:1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Keller I, Bensasson D, Nichols RA (2007) Transition-transversion bias is not universal: a counter example from grasshopper pseudogenes. *PLoS Genet* 3(2):e22. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030022>
- Koutroumpa K, Theodoridis S, Warren BH, Jiménez A, Celep F et al (2018) An expanded molecular phylogeny of Plumbaginaceae, with emphasis on *Limonium* (sea lavenders): Taxonomic implications and biogeographic considerations. *Ecol Evol* 24:12397–12424. <https://doi.org/10.1002/ece3.4553>
- Kumar S, Stecher G, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35(635):1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Liu G, Lan Y, Qu L, Zhao Y, Xin H, Xi M (2022) Analyzing the genetic relationships in *Tulipa* based on karyotypes and 5S rDNA sequences. *Sci Hort* 302:111178. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111178>
- Lledy MD, Crespo MB, Fay MF, Chase MW (2005) Molecular phylogenetics of *Limonium* and related genera (Plumbaginaceae): biogeographical and systematic implications. *Am J Bot* 92(7):1189–1198. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.7.1189>
- Mahelka V, Kopecký D, Baum BR (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. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst106>
- Malekmohammadi M, Akhiani H, Borsch T (2017) Phylogenetic relationships of *Limonium* (Plumbaginaceae) inferred from multiple chloroplast and nuclear loci. *Taxon* 66(5):1128–1146. <https://doi.org/10.12705/665.8>
- Manske CL, Chapman DJ (1987) Nonuniformity of nucleotide substitution rates in molecular evolution: computer simulation and analysis of 5S ribosomal RNA sequences. *J Mol Evol* 26:226–251. <https://doi.org/10.1007/BF02099855>
- Mlinarec J, Franjevic DD, 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. <https://doi.org/10.1111/boj.12452>
- Moysiyenko II (2008) A review of the family Limoniaceae Lincz. in Ukraine. *Chornomors'k Bot Z* 4(2):161–174
- Nei M, Rooney AP (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Ann Rev Genet* 39:121–152
- Nieto Feliner G, Rosato M, Alegre G, San Segundo P, Rosselló JA, Garnatje T, Garcia S (2019) Dissimilar molecular and morphological patterns in an introgressed peripheral population of a sand dune species (*Armeria pungens*, Plumbaginaceae). *Plant Biol* 21(6):1072–1082. <https://doi.org/10.1111/plb.13035>
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, Ugene Team (2012) Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinf* 28(8):1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Pinhal D, Yoshimura TS, Araki CS, Martins C (2011) The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. *BMC Evol Biol* 11(1):1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-151>
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR (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>.
- Rhazi L, Rebelo AR, Rysis AS, Castro S, Loureiro J, El Madihi M et al (2021) *Limonium mucronatum*: plant communities and cytogenetic characterization of an endemic of the Moroccan Atlantic Coast. *Plant Biosyst.* – *Int. J. Dealing Aspects Plant Biosyst* 155(2):241–250. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1739158>
- Rooney AP, Ward TJ (2005) Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: birth and death of a concerted evolution paradigm. *PNAS* 102(14):5084–5089. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409689102>
- 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>
- Sastri DC, Hilu K, Appels R, Lagudah ES, Playford J, Baum BR (1992) An overview of evolution in plant 5S DNA. *Plant Syst Evol* 183:169–181. <https://doi.org/10.1007/BF00940801>
- Simmons MP, Ochoterena H (2000) Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Syst Biol* 49(2):369–381. <https://doi.org/10.1093/sysbio/49.2.369>
- Simon L, Rabanal FA, Dubos T, Oliver C, Lauber D 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>
- Šmarda P, Bureš P (2012) The variation of base composition in plant genomes. In *Plant genome diversity volume I: plant genomes, their residents, and their evolutionary dynamics*. Vienna: Springer Vienna. 209–235 p. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1130-7\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1130-7_14)
- Sousa A, Bechteler J, Temsch EM, Renner SS (2020) Different from tracheophytes, liverworts commonly have mixed 35S and 5S arrays. *Ann Bot* 125(7):1057–1064. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa027>
- Stepanenko A, Chen G, Hoang PT, Fuchs J, Schubert I, Borisjuk N (2022) The ribosomal DNA loci of the ancient monocot *Pistia stratiotes* L. (Araceae) 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>
- Sun FJ, Caetano-Anollés G (2009) The evolutionary history of the structure of 5S ribosomal RNA. *J Mol Evol* 69:430–443. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9264-z>
- Symonová R (2019) Integrative rDNAomics-Importance of the oldest repetitive fraction of the eukaryote genome. *Genes* 10(5):345. <https://doi.org/10.3390/genes10050345>
- Takano-Shimizu T (2001) Local changes in GC/AT substitution biases and in crossover frequencies on *Drosophila* chromosomes. *Mol Biol Evol* 18(4):606–619. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003841>
- 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, 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, Novikov AV, Chorney II, Volkov RA (2022) Organization of the 5S rDNA intergenic spacer and its use in the molecular taxonomy of the genus *Aconitum* L. *Cytol Genet* 56(6):494–503. <https://doi.org/10.3103/S0095452722060111>
- Tynkevich YO, Shelyfist AY, Kozub LV, Hemleben V, Panchuk II, Volkov RA (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>
- Vierna J, Wehner S, Höner zu Siederdisen C, Martinez-Lage A, Marz M (2013) Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity* 111(5):410–421. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.63>
- Vogel F, Kopun M (1977) Higher frequencies of transitions among point mutations. *J Mol Evol* 9:159–180. <https://doi.org/10.1007/BF01732746>
- Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV, Hosiawa-Baranska M, Maluszynska J, Hemleben V (2017) Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol* 17:1–15. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0978-6>
- Vozárová R, Herklotz V, Kovařík A, Tynkevich YO, Volkov RA 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, Zhang X, Garcia S, Leitch AR, Kovařík A (2023) Intragenomic rDNA variation – the product of concerted evolution, mutation, or something in between? *Heredity* 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41437-023-00634-5>
- WFO World Flora Online, 2023, Available from: <http://www.worldfloraonline.org/>
- Yuan F, Wang X, Zhao B, Xu X, Shi M et al (2022) The genome of the recretohalophyte *Limonium bicolor* provides insights into salt gland development and salinity adaptation during terrestrial evolution. *Mol Plant* 15(6):1024–1044. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.04.011>

Надійшла в редакцію 18.07.23  
Після доопрацювання 03.08.23  
Прийнята до друку 18.11.23