

УДК 577.113.5 + 582.57

<https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.21.1-2.1596>

## ВИКОРИСТАННЯ ДІЛЯНКИ IGS 5S рДНК ДЛЯ ДНК-БАРКОДИНГУ ТА МОЛЕКУЛЯРНОЇ ТАКСОНОМІЇ ДВОХ УКРАЇНСЬКИХ ВИДІВ РОДУ *TULIPA* L.

Ю. О. ТИНКЕВИЧ<sup>1</sup>, Н. М. РОШКА<sup>1</sup>, Е. Е. ТІМКАНИЧ<sup>1</sup>, І. І. МОЙСІЄНКО<sup>1,2</sup>, Р. А. ВОЛКОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича  
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2  
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

<sup>2</sup> Херсонський державний університет  
Україна, 73000, м. Херсон, вул. Університетська, 27

**Мета.** Дослідити організацію та еволюцію ділянки ядерного геному IGS 5S рДНК чотирьох близькоспоріднених таксонів *Tulipa*, а також оцінити можливість її використання у молекулярній таксономії цієї групи рослин. **Методи.** ПЛР-ампліфікація, клонування та секвенування повторюваної послідовності 5S рДНК, біоінформатичний та філогенетичний аналіз. **Результати.** Секвенувано повтори 5S рДНК видів *T. graniticola* і *T. ophiophylla*, які багато авторів розглядають як синоніми до *T. sylvestris* L. Також зібрано основні риботипи з повногеномних бібліотек коротких рідів Illumina для двох споріднених до *T. sylvestris* видів, *T. patens* і *T. saxatilis*. Проведено порівняльний аналіз структури послідовностей 5S рДНК та філогенетичний аналіз на основі ділянки IGS. **Висновки.** Продемонстровано високий рівень мінливості IGS 5S рДНК у представників підроду *Eriostemones* роду *Tulipa*. Використання IGS 5S рДНК для філогенетичного аналізу дозволило чітко відокремити близькоспоріднені види *T. saxatilis*, *T. patens* та комплексний вид *T. sylvestris*, а також розмежувати між собою таксони із суперечливим статусом *T. graniticola* і *T. ophiophylla*. Отже, використання цієї ділянки ядерного геному є перспективним підходом до молекулярної таксономії роду *Tulipa*.

**Ключові слова:** генетичний поліморфізм, біорізноманіття, молекулярна філогенія та таксономія, молекулярні маркери, *Tulipa sylvestris*.

**Вступ.** Рід *Tulipa* L. (Liliaceae) є проблемною у таксономічному відношенні групою рослин. Конвергентна подібність морфологічних ознак, інтрогресивна міжвидова гібридизація, поліплоїдія та нестатеве клональне розмноження є факторами, які ускладнюють ідентифікацію видів тюльпанів та визначення границь між ними (Botschantzeva, 1982; Van Eijk et al., 1991; Marasek-Ciolakowska et al., 2012). Через це досі немає єдиної думки стосовно таксономічного статусу багатьох представників роду *Tulipa*. Зокрема, *T. biflora* Pall., *T. orphanidea* Boiss. ex Heldr., *T. sylvestris* L. та деякі інші таксони часто розглядаються як комплексні види (Wilson, 2023). В Україні поширені п'ять представників роду *Tulipa*: *T. graniticola* (Klokov & Zoz) Klokov, *T. hypanica* Klokov & Zoz, *T. ophiophylla* Klokov & Zoz, та *T. quercetorum* Klokov & Zoz, *T. scythica* Klokov & Zoz із невизначеним таксономічним статусом, які відносять до комплексного виду *T. sylvestris* (Перегрим, 2012). Чотири перші таксони занесені до Червоної книги України у якості вразливих видів, тоді як *T. scythica* Klokov & Zoz — як зникаючий (Onyshchenko et al., 2022). Уточнення таксономічного статусу українських представників роду *Tulipa* є важливим кроком для оптимізації заходів щодо їх збереження у природі.

Використання молекулярно-генетичних підходів у таксономічних і філогенетичних дослідженнях протягом останніх десяти років дозволило значно покращити знання про рівень спорідненості (Christenhusz et al., 2013; Turktas et al., 2013; Nikitina et al., 2023) та популяційну структуру (Pourkhaloee et al., 2018; Kritskaya et al., 2020) багатьох представників роду *Tulipa*. Проте, тюльпани з території України залишаються практично недослідженими з використанням молекулярних підходів, за виключенням *T. suaveolens* (Kritskaya et al., 2020) та *T. quercetorum* (Tynkevich et al., 2022a).

Крім того, переважна більшість використаних у дослідженні роду *Tulipa* маркерних ділянок ДНК мають хлоропластну локалізацію, а з ядерних маркерів активно використовується лише ділянка ITS1-5.8S-ITS2 35S рДНК (Christenhusz et al., 2013; Kritskaya et al., 2020).

Отже, пошук та оцінка мінливості ділянок ядерної ДНК, які можна ефективно використовувати для визначення таксономічного статусу близькоспоріднених форм роду *Tulipa*, є актуальною задачею.

Одним із найбільш інформативних молекулярних маркерів ядерної локалізації є міжгенний спейсер (intergenic spacer — IGS) 5S рДНК. Послідовності IGS розділяють кодувальні ділянки (coding sequence — CDS) генів 5S рРНК, утворюючи разом із ними тандемні повторювані одиниці (повтори), які зібрані у геномах рослин у кластери. Один кластер може вміщати від сотень до тисяч повторів. Зазвичай, у геномах покритонасінних рослин кластери 5S рДНК містяться в одному-трьох хромосомних локусах на гаплоїдний набір хромосом (Besendorfer et al, 2005; Vozarova et al., 2021; Stepanenko et al., 2022). Оскільки більша частина IGS позбавлена функціонального значення, мутації, які виникають в ньому, мають нейтральний характер та не елімінуються добром. Проте, вважається, що в межах геному відбувається гомогенізація повторів 5S рДНК. Внаслідок цього, в більшості випадків у геномах рослин присутні 1–2 основні класи повторів, в межах яких послідовності IGS відрізняються між собою незначно (Besendorfer et al, 2005; Tynkevich et al., 2022b; Wang et al., 2023).

Завдяки високій швидкості молекулярної еволюції IGS 5S рДНК є привабливим маркером для дослідження близькоспоріднених таксонів. Додатковою перевагою цього маркера є збереження в геномі гібридних таксонів особливостей організації послідовностей IGS, які характерні для батьківських видів (Garcia et al., 2020). Завдяки цим властивостям IGS 5S рДНК був успішно використаний у філогенетичних і таксономічних дослідженнях багатьох груп рослин (Tynkevich and Volkov, 2019; Ishchenko et al., 2021; Grabele et al., 2021; Tynkevich et al., 2022b). Для роду *Tulipa* дослідження 5S рДНК були більш зосереджені на хромосомній локалізації та особливостях молекулярної еволюції (Mizuochi et al., 2007; Liu et al., 2022).

В цій роботі ми аналізуємо молекулярну організацію, поліморфізм та можливість використання IGS 5S рДНК у ДНК-баркодингу на при-

кладі представників двох українських таксонів комплексного виду *T. sylvestris* — *T. granitica* і *T. ophiophylla* та двох споріднених до *T. sylvestris* видів — *T. patens* Agardh. ex Schult. f. і *T. saxatilis* Sieber ex Spreng.

#### Матеріали та методи

Рослинний матеріал *T. granitica* і *T. ophiophylla* був зібраний з природних місцезнаходжень навесні 2022 року (табл. 1). Загальну геномну ДНК з гербарних зразків виділяли з використанням цетавлону у якості детергенту (Porebski et al., 1997; Panchuk and Volkov, 2007).

Повторювані одиниці 5S рДНК ампліфікували методом ПЛР з використанням комплементарних до CDS 5S рДНК праймерів Pr5S-L і Pr5S-R. Ці праймери дозволяють ампліфікувати повний IGS разом із фланкуючими ділянками CDS (Tynkevich et al., 2020). ПЛР-ампліфікацію проводили як було описано раніше (Tynkevich and Volkov, 2019). Продукти ПЛР клонували в плазмідному векторі pJET 1.2/blunt за рекомендаціями виробників набору CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher Scientific, США). Скринінг рекомбінантних клонів проводили методом ПЛР на колоніях з використанням прямого та зворотного праймерів pJET 1.2. Зразки рекомбінантної плазмідної ДНК виділяли методом лужного лізису та використовували як матриці для ПЛР ампліфікації вставок 5S рДНК. Очищення ПЛР-продуктів проводили екстракцією хлороформом, після чого їх сиквенували за Сенгером із застосуванням праймерів pJET 1.2. Fd чи Rev на фірмі LGC Genomics, Німеччина. Перевірку якості та анування нуклеотидних послідовностей проводили з використанням програмного забезпечення Chromas та пакету програм DNASTAR Lasergene 14.

Асемблінг повторів 5S рДНК було виконано *de novo* з використанням попередньо відфільтрованих бібліотек парних рідів Illumina з необроблених геномних даних для видів *T. patens* і *T. saxatilis*, доступних в базі даних Sequence Read Archive (SRA) (табл. 1). 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](https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?view=search_seq_name).

*De novo* асемблінг проводили за допомогою програми SeqMan NGen 14. Для бібліотеки відфільтрованих рідів проводили автоматичний трімінг за якістю, застосовуючи наступні пара-

метри збирання (асемблінгу): довжина ділянки, що перекривається (mer size) — 31, мінімальний відсоток збігу (minimum match percentage) — 100 % та порогове значення покриття (coverage threshold) — 20 рідів.

Вирівнювання всіх послідовностей IGS 5S рДНК проводили на сервері MAFFT з використанням методу E-INS-i (Kato et al., 2019). Отримані вирівнювання перевірялися та коригувалися вручну в програмі UGENE (Okonechnikov et al., 2012). Співвідношення швидкостей транзицій та трансверсій, значення транзитивно / трансверсійного зсуву (transition / transversion bias), кількість варіабельних та парсимоній-інформативних сайтів розраховували в програмі Mega X (Kumar et al., 2018). Довжину всіх послідовностей IGS, вміст в них GC-пар та розрахунок рівня подібності між ними визначали в програмі Geneious Prime 2023.2.1.

Для філогенетичного аналізу модель найкращої відповідності нуклеотидних заміни для вирівнювання IGS оцінювали інструментом Find Best-Fit Substitution Model програми Mega X (Kumar et al., 2018) за найменшим значенням Басового інформаційного критерію (BIC). Філогенетичне дерево було оброблено методом Maximum Likelihood за допомогою PhyML плагіну для Geneious Prime 2023.2.1. Підтримка гілок розраховувалася за допомогою aLRT-Chi2 тесту (Anisimova and Gascuel, 2006). Отримане дерево було експортоване у форматі Newick та ано-

товано за допомогою онлайн-інструменту «Інтерактивне дерево життя» (iTOL v6).

### Результати та обговорення

В результаті клонування та сиквенування нами було отримано три нуклеотидні послідовності повторів 5S рДНК для *T. graniticola* та дві — для *T. ophiophylla*. Аналіз сиквенсів показав, що всі п'ять клонів містять повні ділянки IGS 5S рДНК, фланковані з обох боків фрагментами CDS включно із послідовностями використаних для ПЛП праймерів. Також для отримання послідовностей IGS *T. patens* і *T. saxatilis* було використано збирання *de novo* з повногеномних бібліотек, сиквенування методом Illumina. В результаті було виявлено шість варіантів повторів 5S рДНК (риботипів), найбільш розповсюджених у геномі *T. patens* та три — у геномі *T. saxatilis*.

В результаті первинного аналізу послідовностей IGS було встановлено, що їх довжина у досліджених представників роду *Tulipa* знаходиться в межах від 403 до 408 нп, а вміст GC-пар — від 41,1 до 42,8 % (табл. 1). Такі значення цих показників знаходяться у типовому інтервалі для більшості груп Покритонасінних (Saini and Jawali, 2009; Rusak et al., 2016; Tynkevich et al., 2020; Ishchenko et al., 2021; Tynkevich et al., 2022b).

**Таблиця 1.** Характеристика рослинного матеріалу та послідовностей IGS 5S рДНК видів роду *Tulipa*.

Вид	Синонім	Назва зразка	Географічне походження зразка	Номер клону / риботипу	Параметри IGS		Посилання
					Довжина, нп	GC-вміст, %	
<i>T. sylvestris</i> L.	<i>T. graniticola</i> (Klokov & Zoz) Klokov	TuGra1	Ukraine/ Zaporizhzhia Oblast	1	404	41,1	Ця стаття
				5	408	42,2	
				6	407	42,3	
<i>T. patens</i> Agardh. ex Schult.f.	<i>T. ophiophylla</i> (Klokov & Zoz)	TuOph1	Ukraine/ Zaporizhzhia Oblast	2	404	41,3	Ця стаття
				3	404	42,6	
				C1R1	404	42,3	
<i>T. saxatilis</i> Sieber ex Spreng.	—	—	China/ Shenyang	C2R1	404	42,6	Ця стаття; PRJNA834607
				C3R1	406	42,4	
				C4R1	404	41,3	
				C5R1	403	42,7	
				C5R2	406	42,1	
<i>T. saxatilis</i> Sieber ex Spreng.	—	—	—	C1R1	407	42,8	Ця стаття; Baker et al., 2022
				C2R1	406	42,6	
				C3R1	403	41,9	

Вирівнювання всіх отриманих послідовностей 5S рДНК, включно з фланкуючими IGS фрагментами CDS, мало довжину 526 нп (Рис. 1). Довжина вирівнювання IGS становила 413 нп. У фрагментах CDS виявлено 14 однонуклеотидних замін: шість транзицій і вісім трансверсій. Лише дві з них є парсимоній-інформативними. Трансверсія G→C в позиції 22 вирівнювання відрізняє клони TuGra1-2, TuGra1-5, TuOph1-2, TuOph1-3 від усіх інших послідовностей. Також, трансверсія C→A є

спільною для всіх п'яти клонів з геномів українських представників комплексу *T. sylvestris*. В IGS, навпаки, спостерігається переважання транзицій над трансверсіями. Загалом, в IGS наявні 62 варіабельні сайти, з яких 35 — парсимоній-інформативні. Більшість мутацій в 5S рДНК представників роду *Tulipa* представлена однонуклеотидними замінами. Проте, в позиціях 213-219 нп у всіх трьох послідовностях *T. saxatilis* присутня ділянка, в якій розташовані сім нуклеотидних замін поспіль.

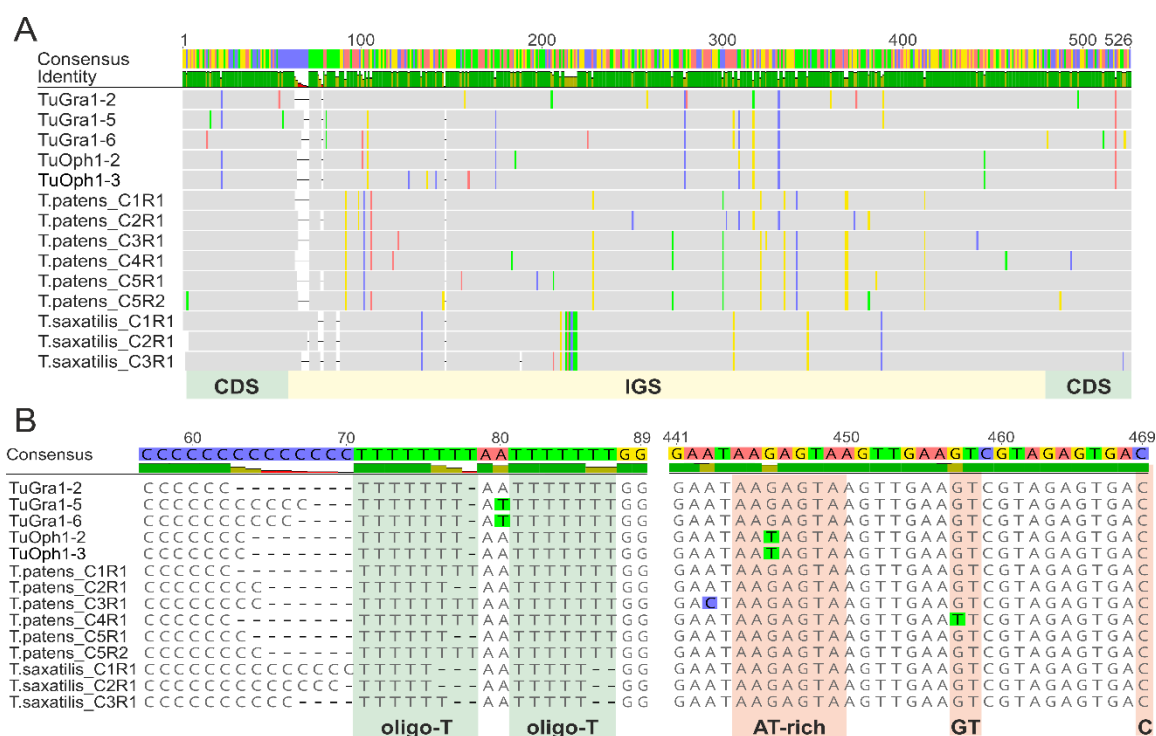


Рис. 1. Структурна організація 5S рДНК видів роду *Tulipa*. А — схематичне зображення вирівнювання послідовностей 5S рДНК; В — порівняння послідовностей 5'- та 3'-ділянок IGS 5S рДНК.

Розрахунки значення транзитивно / трансверсійного зсуву для представників роду *Tulipa* показують, що цей показник був нижчим для CDS ( $R = 0,47$ ) порівняно із IGS ( $R = 1,61$ ). Нещодавно нами було показано, що для CDS 5S рДНК більшості представників триби Limoniaceae (родина Plumatobaginaceae) значення транзитивно / трансверсійного зсуву становить 1,08, тоді як у псевдогенізованих CDS представників роду *Goniolimon*  $R = 2,97$  (Тункевич et al., 2023). Таким чином, порівняно висока кількість трансверсій в CDS тюльпанів є незвичайною особливістю цієї групи. Натомість, значення транзитив-

но / трансверсійного зсуву для IGS представників роду *Tulipa* потрапляє в широкі межі цього показника, які притаманні різним групам триби Limoniaceae.

Крім нуклеотидних замін в IGS присутні також інсерції / делеції — індели. Загалом у вирівнюванні ідентифіковано п'ять інделів, два з яких однонуклеотидні і знаходяться в позиціях 146 та 188 нп. Утворення трьох інших інделів пов'язане із різною довжиною мононуклеотидних послідовностей оліго-С, які знаходяться на границі між CDS та IGS та двох оліго-Т послідовностей на початку IGS. На загал, кількість і довжина інделів

у IGS тюльпанів є меншими за такі для представників багатьох інших груп Покритонасінних (Besendorfer et al, 2005; Saini and Jawali, 2009; Tynkevich et al., 2022b; Tynkevich et al., 2023).

На початку IGS у проаналізованих нами клонів 5S рДНК тюльпанів присутні дві згадані вище оліго-Т послідовності, відстань між якими становить лише два нуклеотиди. З літератури відомо, що оліго-Т послідовності довжиною не менше 5 нп, які розташовані у IGS 5S рДНК безпосередньо після CDS виконують роль термінатора транскрипції 5S рРНК (Ciganda and Williams, 2011; Tynkevich et al., 2020; Ishchenko et al., 2021; Tynkevich et al., 2022a). Раніше, для деяких груп рослин ми вже спостерігали дуплікацію оліго-Т послідовності на початку спейсера і припускали, що друга копія може відігравати роль «запасного»

термінатора транскрипції (Tynkevich and Volkov, 2019; Tynkevich et al., 2021). Отримані в цій роботі дані збільшують імовірність такого припущення. Цікавим є те, що у різних послідовностях 5S рДНК, навіть із одних і тих же геномів, термінаторна послідовність розташована на різній відстані від кінця кодувальної ділянки внаслідок різної кількості нуклеотидів в оліго-С ланцюжку на межі CDS та IGS. Така структурна особливість не спостерігалась раніше для інших груп рослин, і це наводить на думку про можливі відмінності у механізмах процесингу первинних транскриптів 5S рРНК.

Відомо також, що на 3'-кінці IGS у рослин розташовуються зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III.

**Таблиця 2.** Рівень подібності (%) та показник дивергенції послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Tulipa*.

Назва клону / риботипу	T.patens_C1R1	T.patens_C2R1	T.patens_C3R1	T.patens_C4R1	T.patens_C5R1	T.patens_C5R2	T.saxatilis_C1R1	T.saxatilis_C2R1	T.saxatilis_C3R1	TuGra1-2	TuGra1-5	TuGra1-6	TuOph1-2	TuOph1-3	Рівень подібності, %	
T.patens_C1R1		95.4	98.3	98.8	97.8	98.5	91.0	91.3	91.8	94.2	93.5	93.5	94.4	93.9		
T.patens_C2R1	3.8		94.7	94.2	94.7	95.2	92.3	92.5	93.0	94.7	95.6	95.6	95.9	95.6		
T.patens_C3R1	1.2	5.1		98.1	97.1	98.8	90.8	91.0	91.5	93.0	93.2	93.2	93.7	93.2		
T.patens_C4R1	1.2	5.2	1.5		97.1	98.3	90.3	90.6	91.0	93.5	92.7	92.7	93.7	93.2		
T.patens_C5R1	1.5	5.4	2.3	2.3		97.3	91.3	91.5	92.3	93.5	93.2	93.2	94.2	93.7		
T.patens_C5R2	1.0	4.6	1.2	1.2	2.0		91.0	91.3	91.8	93.2	93.5	93.5	93.9	93.5		
T.saxatilis_C1R1	6.3	6.0	7.1	7.1	6.8	6.8		99.8	98.3	91.5	93.7	93.2	92.3	91.8		
T.saxatilis_C2R1	6.3	6.0	7.1	7.1	6.8	6.8	0.0		98.5	91.8	93.9	93.5	92.5	92.0		
T.saxatilis_C3R1	6.6	6.2	7.4	7.4	6.8	7.1	0.2	0.2		92.3	93.9	93.9	93.0	92.5		
TuGra1-2	5.7	4.6	6.5	6.5	6.3	6.3	5.7	5.7	6.0		95.6	95.2	96.1	95.6		
TuGra1-5	5.5	3.6	6.2	6.3	6.0	6.0	4.9	4.9	5.1	3.0		99.0	97.3	97.1		
TuGra1-6	5.7	3.8	6.5	6.5	6.2	6.2	5.1	5.1	5.4	3.8	0.7		97.8	97.1		
TuOph1-2	5.4	3.8	6.2	6.2	6.0	6.0	5.4	5.4	5.7	3.6	1.8	1.5		98.3		
TuOph1-3	6.0	4.1	6.8	6.8	6.5	6.5	6.0	6.0	6.3	4.1	2.0	2.3	1.8			
<b>Показник дивергенції</b>																

У *Arabidopsis thaliana* вони представлені мотивами: TATATA, GC та C у позиціях -28, -13, -1, відповідно (Cloix et al., 2003; Douet and Tourmente, 2007). Проте, у багатьох груп рослин ці мотиви суттєво відрізняються від «канонічних» (Tynkevich and Volkov, 2019; De Souza et al., 2020; Tynkevich et al., 2023). У представників роду *Tulipa* в позиції -1 збережений цитозин, а в позиції -13 GC-динуклеотид замінений на GT. В позиції -28 у тюльпанів відсутня типова послідовність ТАТА-боксу. Зберігається лише високий вміст АТ-пар у відповідній області.

На основі вирівнювання послідовностей IGS 5S рДНК ми обрахували рівень подібності між ними (табл. 2). Цей показник коливається в межах від 90,3 % між риботипами *T. patens* (C4R1) та *T. saxatilis* (C1R1) до 98,9 % між окремими риботипами з геномів цих же двох видів.

Для того, щоб дати відповідь на питання, чи буде ефективним використання ділянки IGS 5S рДНК у молекулярній таксономії близькоспоріднених представників роду *Tulipa*, ми провели філогенетичний аналіз з використанням всіх отриманих в цій роботі послідовностей. На побудованому дереві (Рис. 2) візуалізуються три основні клади з високою статистичною підтримкою. В межах кожної з цих трьох клад об'єднані послідовності, які належать одному з трьох загальноновизнаних видів: *T. saxatilis*, *T. patens* та комплексному виду *T. sylvestris*. Риботипи *T. saxatilis* тісно згруповані, тоді як риботипи з геному *T. patens* утворюють довші індивідуальні гілки. Один з риботипів *T. patens*, C2R1, розташовується ізольовано та демонструє значно нижчу спорідненість до інших послідовностей з цього ж геному. По дві послідовності *T. granitica* і *T. ophiophylla* групуються в окремі таксон-специфічні клади, проте з невеликою дистанцією між ними. В той же час, послідовність TuGra1-2 виявилась сестринською до всіх інших послідовностей з геномів представників комплексного виду *T. sylvestris*. Наявність сильно дивергованих варіантів IGS для *T. patens* та *T. granitica* свідчить про недостатню швидкість концертної еволюції в геномах представників роду *Tulipa*, що було раніше показано і для геномів кількох інших груп рослин (Saini and Jawali, 2009; Tynkevich et al., 2022b; Andreev et al., 2023; Tynkevich et al., 2023).

Досліджені нами представники роду *Tulipa* вважаються близькоспорідненими таксонами. Всі вони належать до підроду *Eriostemones*, а *T. patens* деякі автори розглядають як синонім до *T. sylvestris* (Chen and Helen, 2000; POWO,

2023). Тим не менш, використання ділянки IGS 5S рДНК як молекулярного маркера дозволило чітко розмежувати ці види, що узгоджується із останніми дослідженнями з використанням повногеномних даних (Wilson, 2023). Також, наші результати дозволили розділити *T. granitica* і *T. ophiophylla*, які часто розглядаються як синоніми у складі збірного виду *T. sylvestris* (Christenhusz et al., 2013; WFO, 2023). Таким чином, отримані нами результати свідчать, що використання IGS 5S рДНК є перспективним підходом для таксономічного розмежування та молекулярної ідентифікації близькоспоріднених видів роду *Tulipa*.

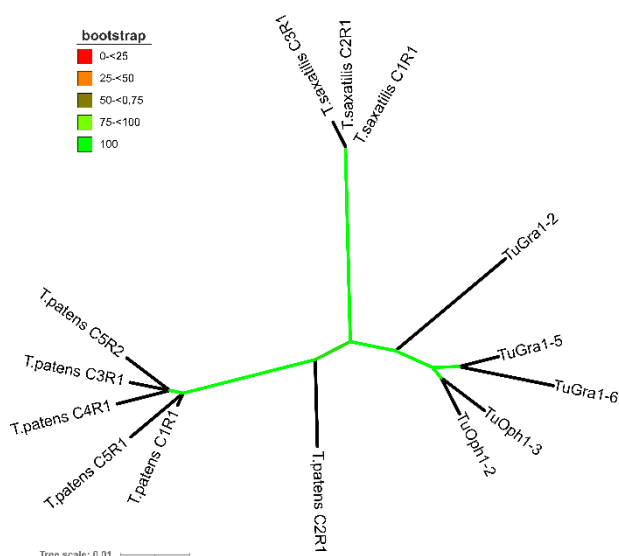


Рис. 2. Невкорінена Maximum-Likelihood філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Tulipa*.

## Висновки

Дані, отримані на основі порівняльного аналізу послідовностей IGS 5S рДНК свідчать про високий рівень мінливості цієї ділянки геному у представників підроду *Eriostemones* роду *Tulipa* та наявність в ній великої кількості філогенетично-інформативних ознак. Використання IGS 5S рДНК для філогенетичного аналізу дозволило чітко розмежувати близькоспоріднені види *T. saxatilis*, *T. patens* та комплексний вид *T. sylvestris*, а також розділити між собою таксономію із суперечливим статусом *T. granitica* і *T. ophiophylla*, які часто вважають синонімами в складі збірного виду *T. sylvestris*. Отже, використання цієї ділянки ядерного геному є перспек-

тивним підходом до молекулярної таксономії роду *Tulipa*.

### Перелік літератури

1. Andreev I. O., Mel'nyk V. M., Parnikoza I. Y., Kunakh V. A. Molecular organization and intragenomic variability of intergenic spacer of 5S rRNA genes in *Colobanthus quitensis*. *Cytol. Genet.* 2023. Vol. 57(5). P. 399–405. doi: 10.3103/S0095452723050018.
2. Anisimova M., Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 2006. Vol. 55. P. 539–552. doi: 10.1080/10635150600755453.
3. Baker W. J., Bailey P., Barber V., Barker A., et al. A comprehensive phylogenomic platform for exploring the angiosperm tree of life. *Systematic biology.* 2022. Vol. 71(2). P. 301–319. doi: 10.1093/sysbio/syab035.
4. Besendorfer V., Krajačić-Sokol I., Jelenić S., Pužina J., Mlinarec J., Sviben T., Papeš D. Two classes of 5S rDNA unit arrays of the silver fir, *Abies alba* Mill. structure, localization and evolution. *Theor. Appl. Genet.* 2005. Vol. 110. P. 730–741. doi: 10.1007/s00122-004-1899-y
5. Botschantzeva Z. Tulips: taxonomy, morphology, cytology, phytogeography and physiology. *Crc Press.* 1982.
6. Chen X., Helen V. M. *Tulipa Linnaeus, Flora of China*, Samuel B. J., Wu Z. Y., and Raven P. H., Eds. Science Press, Beijing, China, 2000.
7. Christenhusz M. J., Govaerts R., David J. C., Hall T. et al. Tiptoe through the tulips—cultural history, molecular phylogenetics and classification of *Tulipa* (Liliaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 2013. Vol. 172(3). P. 280–328. doi: 10.1111/boj.12061.
8. Ciganda M., Williams N. Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdiscip. Rev.: RNA.* 2011. Vol. 2(4). P. 523–533. doi: 10.1002/wrna.74.
9. Cloix C., Yukawa Y., Tutois S., Sugiura M., Tourmente S. *In vitro* analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *Plant J.* 2003. Vol. 35(2). P. 251–261. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01793.x.
10. De Souza T. B., Gaeta M. L., Martins C., Vanzela A. L. L. IGS sequences in *Cestrum* present AT- and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol. Biol. Rep.* 2020. Vol. 47. P. 55–66. doi: 10.1007/s11033-019-05104-y.
11. Douet J., Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Hered.* 2007. Vol. 99. P. 5–13. doi: 10.1038/sj.hdy.6800964.
12. Garcia S., Wendel J. F., Borowska-Zuchowska N., Ainouche M., Kuderova A., Kovarik A. The utility of graph clustering of 5S ribosomal DNA homoeologs in plant allopolyploids, homoploid hybrids, and cryptic introgressants. *Front. Plant Sci.* 2020. Vol. 11(41). doi: 10.3389/fpls.2020.00041.
13. Grabile M., Aguilera P. M., Ducasse D. A., Debat H. J. Molecular characterization of the 5S rDNA non-transcribed spacer and reconstruction of phylogenetic relationships in *Capsicum*. *Rodriguésia.* 2021. Vol. 72. doi: 10.1590/2175-7860202172071.
14. Hajdari A., Pulaj B., Schmiderer C., Mala X., et al. A phylogenetic analysis of the wild *Tulipa* species (Liliaceae) of Kosovo based on plastid and nuclear DNA sequence. *Adv. Genet.* 2021. Vol. 2(3). e202100016. doi: 10.1002/ggn2.202100016.
15. Ishchenko O. O., Bednarska I. O., Panchuk I. I. Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytol. Genet.* 2021. Vol. 55. P. 10–18. doi: 10.3103/S0095452721010096.
16. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings Bioinf.* 2017. Vol. 20(4). P. 1160–1166. doi: 10.1093/bib/bbx108.
17. Kritskaya T. A., Kashin A. S., Perezhogin Y. V., Murtagaliev R. A., Anatov D. M., Friesen N. Genetic diversity of *Tulipa suaveolens* (Liliaceae) and its evolutionary relationship with early cultivars of *T. gesneriana*. *Plant Syst. Evol.* 2020. Vol. 306. P. 1–15. doi: 10.1007/s00606-020-01667-7.
18. Kumar S., Stecher G., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018. Vol. 35(635). P. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
19. Liu G., Lan Y., Qu L., Zhao Y., Xin H., Xi M. Analyzing the genetic relationships in *Tulipa* based on karyotypes and 5S rDNA sequences. *Sci. Hortic.* 2022. Vol. 302. P. 111178. doi: 10.1016/j.scienta.2022.111178.
20. Marasek-Ciolakowska A., Ramanna M. S., Arens P., Van Tuyl J. M. Breeding and cytogenetics in the genus *Tulipa*. *Floricult. Ornament. Biotechnol.* 2012. Vol. 6. P. 90–97.
21. Mizuochi H., Marasek A., Okazaki K. Molecular cloning of *Tulipa fosteriana* rDNA and subsequent FISH analysis yields cytogenetic organization of 5S rDNA and 45S rDNA in *T. gesneriana* and *T. fosteriana*. *Euphytica.* 2007. Vol. 155. P. 235–248. doi: 10.1007/s10681-006-9325-y.
22. Nikitina E. V., Karimov F. I., Savina N. V., Kubrak S. V., Kilchevsky A. V. Inventory of some *Tulipa* species from Uzbekistan using DNA barcoding. In *BIO Web of Conferences.* 2021. Vol. 38. P. 00086. EDP Sciences. doi: 10.1051/bioconf/20213800086.
23. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., Ugene Team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinf.* 2012. Vol. 28(8). P. 1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
24. Onyshchenko V. A., Mosyakin S. L., Korotchenko I. A., Danylyk I. M. et al. IUCN Red List categories of vascular plant species of Ukrainian flora / ed. by V. A. Onyshchenko. *Kyiv: FOP Huljaeva V. M.* 2022. 198 p.

- [In Ukrainian] / Онищенко В. А., Мосякін С. Л., Коротченко І. А., Данилик І. М. та ін. Категорії МСОП судинних рослин флори України / за ред. В. А. Онищенка. Київ: ФОП Гуляєва В. М. 2022. 198 с.
25. Panchuk I. I., Volkov R. A. A practical course in molecular genetics. Chernivtsi: Ruta. 2007. 120 p. [In Ukrainian] / Панчук І. І. Волков Р. А. Практикум з молекулярної генетики. Чернівці: Рута. 2007. 120 с.
26. Peregrym M. M. Representation of bulb and bulbotuberiferous species of the natural flora of Ukraine in protected plant lists of different levels. *Ukr. Botan. Journ.* 2012. Vol. 69(6). P. 832–846 [In Ukrainian] / Перегрим М. М. Репрезентативність цибулинних і бульбоцибулинних видів рослин природної флори України в охоронних списках різних рівнів. *Укр. ботан. журн.* 2012. Т. 69(6). С. 832–846.
27. Porebski S., Bailey L. G., Baum B. R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1997. Vol. 15(1). P. 8–15. doi: 10.1007/BF02772108.
28. Pourkhaloee A., Khosh-Khui M., Arens P., Salehi H. et al. Molecular analysis of genetic diversity, population structure, and phylogeny of wild and cultivated tulips (*Tulipa* L.) by genic microsatellites. *Hort. Environ. Biotech.* 2018. Vol. 59(6) P. 875–888. doi: 10.1007/s13580-018-0055-6.
29. POWO. Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org> (accessed December 05 2023).
30. Rusak O. O., Petrashchuk V. I., Panchuk I. I., Volkov R. A. Molecular organization of 5S rDNA in two Ukrainian populations of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*). *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2016. Vol. 14(2). P. 216–220. [In Ukrainian] / Русак О. О., Петрашчук В. І., Панчук І. І., Волков Р. А. Молекулярна організація 5S рДНК двох українських популяцій явора (*Acer pseudoplatanus*). *Вісник українського товариства генетиків та селекціонерів.* 2016. Т. 14(2). С. 216–220. doi: 10.7124/visnyk.utgis.14.2.691.
31. Saini A., Jawali N. Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* 2009. Vol. 280. P. 187–206. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4.
32. Stepanenko A., Chen G., Hoang P. T., Fuchs J., Schubert I., Borisjuk N., 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.* 2022. Vol. 13. P. 819750. doi: 10.3389/fpls.2022.819750.
33. Turktas M., Metin Ö. K., Baştuğ B., Ertuğrul F. et al. Molecular phylogenetic analysis of *Tulipa* (Liliaceae) based on noncoding plastid and nuclear DNA sequences with an emphasis on Turkey. *Bot. J. Linn. Soc.* 2013. Vol. 172(3). P. 270–279. doi: 10.1111/j.0024-4074.2004.00194.x.
34. Tynkevich Y. O., Bushyla K. D., Volkov R. A. Organization of the 5S rDNA intergenic spacer of *Quercus rubra* L. and its relationship to the Ukrainian *Quercus* species. *Factors Experimental Evol. Organisms.* 2020. Vol. 26. P. 125–131 [In Ukrainian] / Тинкевич Ю. О., Бушила К. Д., Волков Р. А. Організація міжгенного спейсера 5S рДНК *Quercus rubra* L. та його спорідненість з українськими видами роду *Quercus*. *Фактори експериментальної евол. організмів.* 2020. Т. 26. С. 125–131. doi: 10.7124/FEEO.v26.1254.
35. Tynkevich Y. O., Kozub L. V., Volkov R. A. Organization and polymorphysm of 5S rDNA intergenic spacer of blackthorn (*Prunus spinosa* L.). *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2021. Vol. 19(1–2). P. 40–46 [In Ukrainian] / Тинкевич Ю. О., Козуб Л. В., Волков Р. А. Організація та поліморфізм міжгенного спейсера 5S рДНК терену колючого (*Prunus spinosa* L.). *Вісник українського товариства генетиків та селекціонерів.* 2021. Т. 19(1–2). С. 40–46. doi: 10.7124/visnyk.utgis.19.1-2.1439.
36. Tynkevich Y. O., Moysiienko I. I., Volkov R. A. The use of the intergenic spacer region *psbA-trnH* of the chloroplast genome for the analysis of the taxonomic position and genetic polymorphism of the Ukrainian populations of *Tulipa quercetorum* Klokov et Zoz. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2022a. Vol. 20(1–2). P. 8–15 [In Ukrainian] / Тинкевич Ю. О., Мойсієнко І. І., Волков Р. А. Використання міжгенної спейсерної ділянки *psbA-trnH* хлоропластного геному для аналізу таксономічного положення та генетичного поліморфізму українських популяцій тюльпану дібровного (*Tulipa quercetorum* Klokov et Zoz). *Вісник українського товариства генетиків та селекціонерів.* 2022a. Т. 20 (1–2). С. 8–15. doi: 10.7124/visnyk.utgis.20.1-2.1508.
37. Tynkevich Y. O., Shelyfist A. Y., Kozub L. V., Hemleben V., Panchuk I. I., Volkov R. A. 5S ribosomal DNA of genus *Solanum*: molecular organization, evolution, and taxonomy. *Front. Plant Sci.* 2022b. Vol. 13. P. 852406. doi: 10.3389/fpls.2022.852406.
38. Tynkevich Y. O., Valin M. O., Moysiienko I. I., Panchuk I. I., Volkov R. A. 5S ribosomal DNA in the family Plumbaginaceae. *Cytol. Genet.* 2023. Vol. 57(6). P. 524–537. doi: 10.3103/S0095452723060099.
39. Tynkevich Y. O., Volkov R. A. 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol. Genet.* 2019. Vol. 53. P. 459–466. doi: 10.3103/S0095452719060100.
40. Van Eijk, J. P., Van Raamsdonk, L. W. D., Eikelboom, W., Bino, R. J. Interspecific crosses between *Tulipa gesneriana* cultivars and wild *Tulipa* species: a survey. *Sexual Plant Reproduction.* 1991 Vol. 4, P. 1–5.
41. Vozárová R., Herklotz V., Kovařík A., Tynkevich Y. O., Volkov R. A., Ritz C. M., Lunerová J. Ancient origin of two 5S rDNA families dominating in the ge-



- nus *Rosa* and their behavior in the Canina-type meiosis. *Front. Plant Sci.* 2021. Vol. 12. P. 643548.
42. Wang W., Zhang X., Garcia S., Leitch A. R., Kovařík A. Intragenomic rDNA variation — the product of concerted evolution, mutation, or something in between? *Hered.* 2023. P. 1–10. doi: 10.1038/s41437-023-00634-5.
43. WFO World Flora Online, 2023, Available from: <http://www.worldfloraonline.org/> (accessed 17 November 2023).
44. Wilson B. *Tulipa*: the taxonomy and evolutionary history of the genus and its impact on conservation priorities in Central Asia. *Doctoral dissertation, University of Cambridge.* 2023. 258 p. doi: 10.17863/CAM.94432.

Стаття надійшла до редакції 3.11.2023,  
прийнята до друку 20.11.2023

## THE USE OF THE 5S rDNA IGS REGION FOR DNA BARCODING AND MOLECULAR TAXONOMY OF TWO UKRAINIAN SPECIES OF THE GENUS *TULIPA* L.

Y. O. Tynkevich<sup>1</sup>, N. M. Roshka<sup>1</sup>, E. E. Timkanych<sup>1</sup>,  
I. I. Moysiyenko<sup>1,2</sup>, R. A. Volkov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University  
Ukraine, 58012, Chernivtsi, Kotsyubynsky str., 2  
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

<sup>2</sup> Kherson State University  
Ukraine, 73000, Kherson, University str., 27

Taxonomic identification of closely related representatives of the genus *Tulipa* L. is complicated by the convergent similarity of morphological characters, interspecific hybridization, polyploidy and asexual reproduction. Among the tulips in the flora of Ukraine, the most problematic is the status of taxa of the complex species *T. sylvestris* L. **Aim.** To examine the organization and evolution of the nuclear 5S rDNA IGS region for four closely related *Tulipa* taxa and to evaluate the possibility of its use in the molecular taxonomy of this plant group. **Methods.** PCR amplification, cloning and sequencing of 5S rDNA repeat units, bioinformatic and phylogenetic analysis. **Results.** In this work, 5S rDNA repeats were sequenced for the species *T. granitcola* and *T. ophiophylla*, which are considered to be synonyms of *T. sylvestris* L. by many authors. We also assembled the main ribotypes from full-genome libraries of short Illumina reads for *T. patens*, and *T. saxatilis*, the species related to *T. sylvestris*. A comparative analysis of the structure of 5S rDNA sequences and a phylogenetic analysis based on the IGS region were carried out. **Conclusions.** A high level of 5S rDNA IGS variability has been demonstrated for representatives of the subgenus *Eriostemones* of the genus *Tulipa*. The use of 5S rDNA IGS for phylogenetic analysis enabled the clear delimitation of the closely related species *T. saxatilis*, *T. patens*, and the complex species *T. sylvestris*, as well as the delineation of the taxa with the controversial status, *T. granitcola* and *T. ophiophylla*. Therefore, the use of this region of the nuclear genome is a promising approach to the molecular taxonomy of the genus *Tulipa*.

**Keywords:** genetic polymorphism, biodiversity, molecular phylogeny and taxonomy, molecular markers, *Tulipa sylvestris*.