

## 5S РИБОСОМНА ДНК ВІДДАЛЕНО СПОРІДНЕНИХ ВИДІВ РОДУ *QUERCUS*: МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ТАКСОНОМІЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ

Ю.О. ТИНКЕВИЧ, Р.А. ВОЛКОВ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича

вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012, Україна

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

*Рід Quercus (дуб) є широко розповсюдженим та економічно важливим родом деревних рослин. Внутрішньородова таксономія цього роду залишається дискусійною внаслідок значного поширення міжвидової гібридизації та конвергентній подібності морфологічних ознак. Подальший прогрес у цьому питанні вимагає застосування молекулярних методів. Враховуючи, що порівняння 5S рДНК з успіхом використовується у молекулярній таксономії рослин, ми клонували та сиквенували цю ділянку геному для представників трьох філогенетично віддалених видів роду Quercus: Q. acutissima (секція Cerris) і Q. glauca (сек. Cyclobalanopsis) зі Східної Азії та Q. texana (сек. Lobatae) з Північної Америки. Також нами були ідентифіковані послідовності 5S рДНК у повногеномних сиквенсах, доступних у базі даних Genbank для північноамериканського виду Q. lobata (сек. Quercus) та спорідненого роду Castanea. Встановлено, що в геномі представників роду Quercus повторювані одиниці 5S рДНК є гомогенними. Потенційні зовнішні елементи промотору 5S рДНК відрізняються від таких у інших родин дводольних рослин. Результати порівняльного аналізу послідовностей міжгенної спейсерної ділянки 5S рДНК доповнюють існуючу таксономію роду та вказують на ізольоване положення секції Cyclobalanopsis, яка може розглядатись як окремий підрід.*

**Ключові слова:** молекулярна еволюція і систематика, 5S рДНК, Quercus.

**Вступ.** Рід Дуб (*Quercus*), який охоплює більше 400 видів, є найбільшим у родині Fagaceae та одним з економічно найважливіших родів деревних рослин. Деякі види роду мають важливе значення в якості лісоутворюючих порід, як у помірних широтах, так і у субтропічному кліматі і навіть у тропічних лісах [1–3]. Географічний ареал роду, хоч і обмежений переважно Північною Півкулею, є одним із найширших для деревних рослин [2, 4, 5]. У Старому Світі поширені чотири з п'яти основних таксономічних груп дубів. У Східній та Південно-Східній

Азії зустрічається найбільша група *Cyclobalanopsis*, а також *Quercus*, *Cerris* та *Illex*. Ці три групи також широко представлені у Західній Євразії та частині Північної Африки [6]. Група *Quercus* має найширше розповсюдження серед всіх дубів та представлена також багатьма видами у Північній Америці, де має тривіальну назву «Білі дуби». Там більша частина її ареалу співпадає з ареалом розповсюдження ендемічної для Американського континенту великої групи «Червоних дубів» – *Lobatae* [6].

Внутрішньородова філогенія дубів тривалий час залишається відкритим питанням. Основними причинами цього є конвергентна подібність морфологічних ознак та перекриття географічних ареалів філогенетично віддалених груп, а також надзвичайно поширена в межах роду міжвидова гібридизація [7]. За останні 10 років значні успіхи в розумінні філогенії роду *Quercus* були досягнуті завдяки використанню різних молекулярних маркерів – як ядерних, так і хлоропластних [3–5, 8–11]. Проте, в більшості робіт проаналізовано філогенію однієї або кількох споріднених груп роду. Тим не менш, ці дані дозволили запропонувати нову систему роду *Quercus* [6], згідно з якою рід поділяють на два підроди, *Quercus* та *Cerris*. До підроду *Quercus* автори відносять п'ять секцій, найбільшими з яких є *Quercus* та *Lobatae*. Підрід *Cerris* об'єднує секції *Cyclobalanopsis*, *Cerris* та *Illex*. В загальних рисах такий поділ підтримується і останньою масштабною роботою із застосуванням RAD геномного сиквенування для представників всіх груп роду [12]. Тракткування секцій *Cerris* та *Illex*, а також *Quercus* та *Lobatae* як сестринських груп практично не викликає сумнівів та підтверджується більшістю доступних молекулярних даних [4, 8, 12]. В той же час, положення групи *Cyclobalanopsis* не виглядає настільки однозначним. Деякі автори трактують її як окремий підрід в межах

роду *Quercus* [2, 13] або навіть як окремих споріднених рід [14]. В роботі Hubert та ін. положення цієї групи суттєво змінювалось в залежності від набору використаних даних та вибору зовнішньої групи [8].

Hirr та співавтори зауважують, що філогенетичні дерева, отримані на основі аналізу однієї ділянки геному можуть суттєво відрізнятися від таких, отриманих на основі іншої ділянки [12]. Зокрема, застосування хлоропластної ДНК виявилось неефективним для вирішення питань філогенії у роді *Quercus*, оскільки отримані результати не відповідають таким, які були отримані для ділянок ядерного геному [4, 8, 9]. Основною причиною такої невідповідності є міжвидова гібридизація та ретикулярна еволюція, які характерні для роду *Quercus* [11, 15, 16].

Відповідно, актуальним видається використання для філогенетичного аналізу додаткових ділянок ядерного геному. Зокрема, корисним інструментом для досягнення цієї мети є послідовність міжгенного спейсера (intergenic spacer, IGS) генів 5S рРНК (або 5S рДНК) [17]. Раніше ефективність використання цієї ділянки у філогенетичних дослідженнях була показана для родів *Solanum* L. [18], *Vigna* Savit [19], триби Helieae [20] та інших груп Покрытонасінних рослин. 5S рДНК була також успішно використана у дослідженнях роду *Quercus*, проте, лише для західноєвропейських представників секцій *Quercus*, *Cerris* та *Illex* [4, 11], тоді як організація цієї ділянки геному у інших секціях роду залишається невідомою.

В цій роботі ми аналізуємо молекулярну організацію та можливість філогенетичного застосування послідовностей IGS 5S рДНК чотирьох видів роду *Quercus*: *Q. acutissima* Carruth. (sect. *Cerris*), *Q. glauca* Thunb. (sect. *Cyclobalanopsis*), *Q. lobata* Née (sect. *Quercus*) та *Q. texana* Buckley (sect. *Lobatae*), що належать до груп, для яких ця ділянка геному раніше не досліджувалась.

**Матеріали і методи.** Матеріалом для дослідження були гербаризовані зразки трьох видів роду *Quercus*: *Q. acutissima*, *Q. glauca* та *Q. texana*, отримані з Ботанічного саду університету м. Грац, Австрія. Сумарну ДНК екстрагували за модифікованою методикою виділення ДНК з цетавлоном [21].

ПЛР ампліфікацію повторюваної ділянки 5S рДНК проводили, використовуючи універсальну для покритонасінних рослин пару праймерів 5S-L (5'-GCG AGA GTA GTA CTA GGA TGC GTG AC-3') та 5S-R (5'-GCT TAA CTT CGG AGT TCT GAT GGG A-3'), які комплементарні до кодувальної ділянки [18]. Застосовані праймери забезпечують ампліфікацію повного IGS та фланкуючих ділянок кодувальної послідовності.

Реакційна суміш для ПЛР загальним об'ємом 20 мкл містила такі компоненти: 10–30 нг ДНК, 4 мкл 5<sup>x</sup> полімеразної суміші FIREPol (Solis BioDyne, Естонія) та 0,5 мкМ кожного з двох праймерів. ПЛР проводилася з використанням ампліфікатора MiniCycler (MJ Research Inc, США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази та денатурація ДНК – 95 °С, 15 хв; (2) денатурація ДНК – 95 °С, 30 с; (3) гібридизація праймерів – 61 °С, 30 с; (4) синтез ДНК – 72 °С, 30 с; (5) завершення ампліфікації – 72 °С, 8 хв; припинення реакції – 4 °С; загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу у 2%-ному агарозному гелі та використовували для клонування.

Продукти ПЛР лігували у плазмідний вектор pJET 1.2/blunt, застосовуючи набір CloneJET PCR Cloning Kit («Thermo Fisher Scientific», США). Лігазну суміш очищали за допомогою екстракції хлороформом, після чого використовували для трансформації компетентних клітин *E. coli* лінії XL1-Blue методом електропорації, застосовуючи для цього *E. coli* Pulser («BioRad», США). Колонії, які містили рекомбінантні плазмідні, виявляли за резистентністю до ампіциліну.

Наявність вставки у плазмідах перевіряли, застосовуючи ПЛР із праймерами Forward та Reverse pJET1.2, сайти гібридизації яких знаходяться в векторній ДНК з двох боків від полілінкеру. Рекомбінантні плазмідні з позитивних клонів виділяли методом лужного лізису. По два клони для кожного виду були сиквензовані на фірмі Eurofins (Німеччина).

Первинну обробку нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR. Отримані послідовності задепоновано у базі даних Genbank

під номерами MN124988-MN124993. Послідовності IGS 5S рДНК *Q. lobata* та *Castanea mollissima* Blume були виявленні з використанням програми BLAST [22] у повногеномних сиквенсах цих видів, які доступні в базі даних Genbank.

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей здійснювали методами Clustal W [23] та Muscle [24] з додатковим ручним редагуванням. Філогенетичну дендрограму будували за допомогою плагіну RAxML [25] у середовищі програми Geneious Prime 2019.0.4.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Електрофоретичний аналіз показав, що після ПЛР-ампліфікації для кожного з використаних зразків ДНК утворюється лише один продукт, довжина якого для *Q. acutissima*, *Q. glauca* та *Q. texana* становила, відповідно, близько 430, 450 та 340 нп. Це свідчить, що повтори 5S

рДНК кожного з досліджених представників роду *Quercus* однорідні за довжиною в межах геному. Після клонування ПЛР-продуктів у плазмідний вектор було відібрано по 5–6 позитивних клонів для кожного виду. ПЛР-ампліфікація з використанням плазмідної ДНК та пари праймерів 5S-L + 5S-R показала, що всі відібрані клони для одного виду мають однакову довжину вставки, яка відповідає довжині ПЛР-продукту, використаного при клонуванні. По 2 клони для кожного виду було сиквеновано. Аналіз отриманих результатів показав, що всі клони містять послідовності IGS 5S рДНК, які з обох боків фланковані фрагментами кодувальної ділянки, а також послідовностями використаних для ПЛР праймерів.

Для порівняння з сиквенованими нами зразками ми використали послідовності IGS

Таблиця 1. Характеристика IGS 5S рДНК видів роду *Quercus*

| Вид                        |                | Клон/фрагмент ДНК                         |                  | IGS         |                 | Посилання                             |
|----------------------------|----------------|---|------------------|-------------|-----------------|---------------------------------------|
| назва                      | розповсюдження | назва                                     | GenBank асс. по. | довжина, нп | вміст GC-пар, % |                                       |
| <i>Q. acutissima</i>       | СА             | Quacu4                                    | MN124988         | 316         | 53,8            | Ця стаття                             |
|                            |                | Quacu5                                    | MN124989         | 316         | 53,48           |                                       |
| <i>Q. glauca</i>           | СА             | Qugla4                                    | MN124990         | 330         | 51,82           |                                       |
|                            |                | Qugla5                                    | MN124991         | 328         | 52,44           |                                       |
| <i>Q. texana</i>           | СПА            | Qutex4                                    | MN124992         | 217         | 47,93           |                                       |
|                            |                | Qutex6                                    | MN124993         | 217         | 47,0            |                                       |
| <i>Q. baloot</i>           | ГК             | ba01as1                                   | FM243449.1       | 315         | 53,33           | [4]                                   |
| <i>Q. cerris</i>           | ЗЄ             | ce1502I                                   | LT971465.1       | 319         | 52,98           | [11]                                  |
| <i>Q. coccifera</i>        | ЗЄ             | co06s01                                   | FM243538.1       | 316         | 54,75           | [4]                                   |
| <i>Q. floribunda</i>       | ГК             | di01s02                                   | FM243452.1       | 319         | 54,55           | [4]                                   |
| <i>Q. ilex</i>             | ЗЄ             | ix83s04                                   | FM243809.1       | 316         | 54,43           | [4]                                   |
| <i>Q. infectoria</i>       | ЗЄ             | bo02s03                                   | FM243118.1       | 230         | 52,61           | [4]                                   |
| <i>Q. lobata</i>           | ЗПА            | Qulob (SW786 ch. 5, 33816993-33817322 bp) | LRBV02000005.1   | 219         | 50,68           | [26], ця стаття                       |
| <i>Q. lusitanica</i>       | ЗЄ             | lu01s03                                   | FM243204.1       | 230         | 52,17           | [4]                                   |
| <i>Q. macrolepis</i>       | ЗЄ             | ml0304I                                   | LT971697.1       | 318         | 54,72           | [11]                                  |
| <i>Q. robur</i>            | ЗЄ             | ro14s05                                   | FM243373.1       | 230         | 52,17           | [4]                                   |
| <i>Q. suber</i>            | ЗЄ             | su4704I                                   | LT971912.1       | 306         | 52,94           | [11]                                  |
| <i>Castanea mollissima</i> |                | Camol (contig 21694, 70644-71013 bp)      | JRKL01129996.1   | 245         | 45,31           | Cannon et al., unpublished, ця стаття |

Примітка. ГК – гімалайський коридор, ЗЄ – західна Євразія, ЗПА – західна Північна Америка, СА – Східна Азія, СПА – східна Північна Америка.

5S рибосомна ДНК віддалено споріднених видів роду *Quercus*

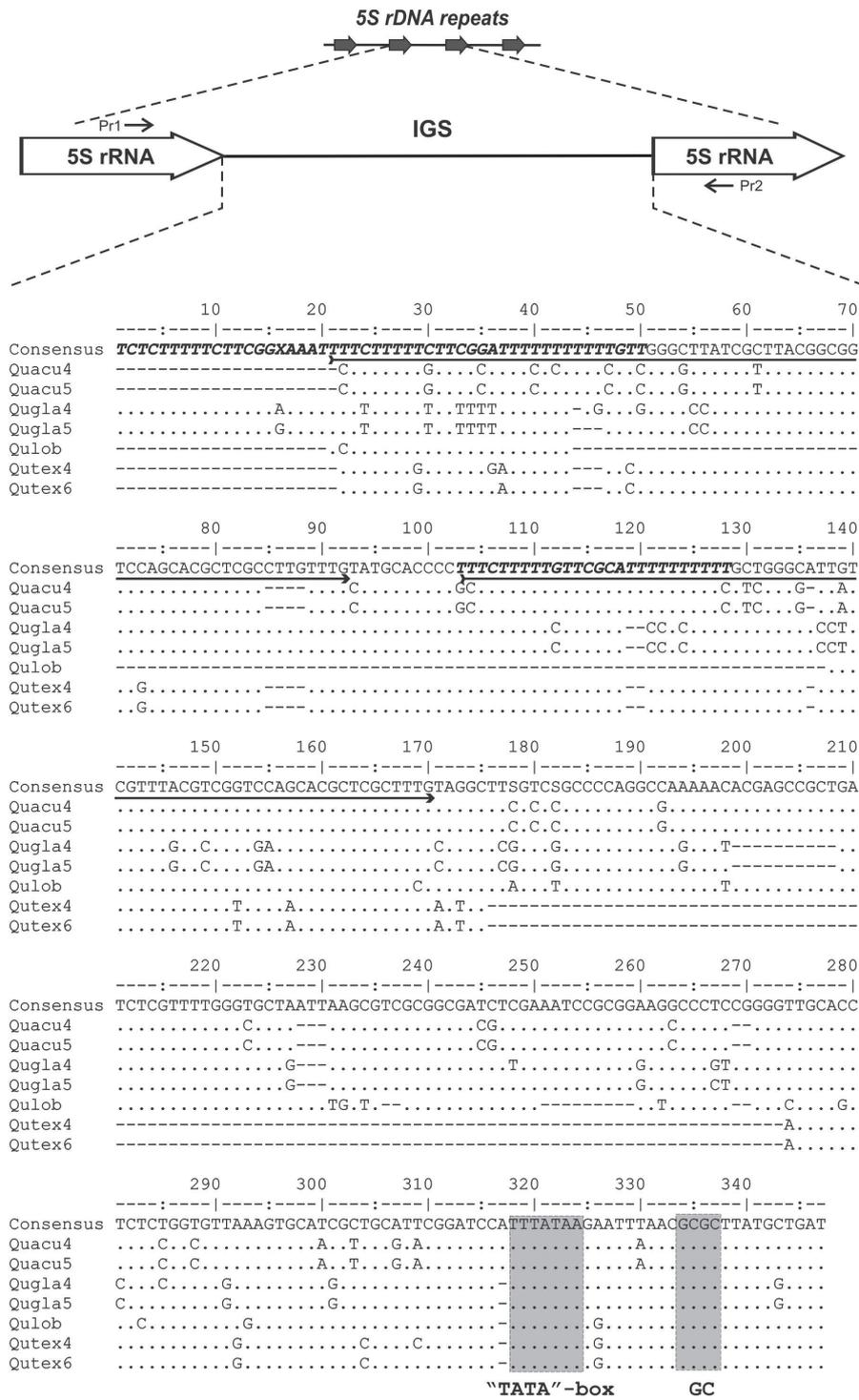
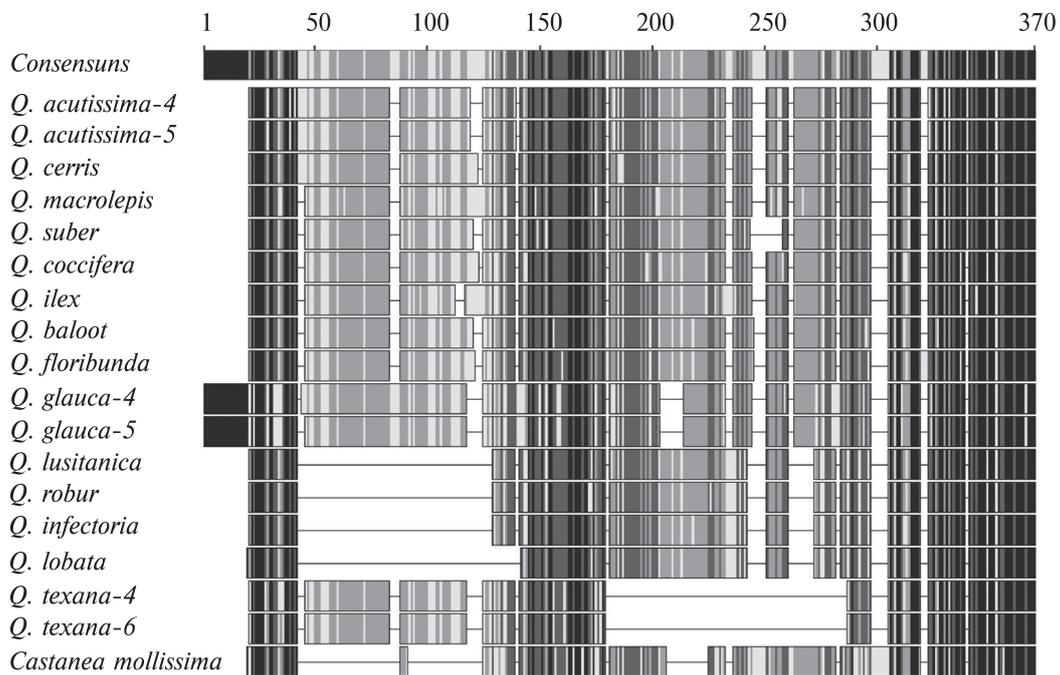


Рис. 1. Структурна організація міжгенного спейсера 5S рДНК видів роду *Quercus*. Pr1 та Pr2 – праймери 5S-L та 5S-R, відповідно. Виділено потенційні зовнішні елементи промотора; жирним курсивом вказано оліго-Т послідовність термінатора; стрілками позначено розташування субповторів у IGS. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1



**Рис. 2.** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК видів роду *Quercus* та *Castanea mollissima*. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1. Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: □ – менше 60%, ■ – 60–80 %, ■ – 80–100 %, ■ – 100%

представників роду *Quercus*, які доступні в базі даних Genbank. Були відібрані 10 послідовностей (табл. 1), що представляють євразійські види секцій *Cerris*, *Ilex* (підвид *Cerris*) та *Quercus* (підвид *Quercus*) [4, 11]. Також ми ідентифікували послідовності IGS 5S рДНК у геномах північноамериканського виду *Q. lobata* (сек. *Quercus*) [26] та представника одного з найбільш споріднених до дубів роду *Castanea* – *C. mollissima*.

Аналіз нуклеотидних послідовностей показав, що найбільші розміри IGS серед досліджених нами видів властиві 5S рДНК *Q. glauca*, а найменші – *Q. texana* (табл. 1). Порівняння наших даних з оприлюдненими результатами [4, 11] свідчить, що довжина IGS у досліджених нами видів є типовою для представників роду *Quercus*. Вміст GC-пар в IGS досліджених видів коливається від 47,0–47,9 % для *Q. texana* до 53,5–53,8 % для *Q. acutissima* та є суттєво вищим, ніж у представників інших родин дводольних рослин [27–30].

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей показало, що порівняно із консенсусною послідовністю IGS 5S рДНК досліджених видів містять нуклеотидні заміни та інсерції/делеції (індели) різної довжини (рис. 1, 2). Розмір більшості делецій не перевищує чотирьох нуклеотидів, за виключенням 10-ти нуклеотидної делеції в IGS *Q. glauca* та 96-ти нуклеотидної – у *Q. texana*. Саме наявність довгої делеції у *Q. texana* є причиною суттєво менших розмірів IGS цього виду порівняно до інших представників роду.

На 3'-кінці IGS були виявлені потенційні зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III, зокрема АТ-збагачену ділянку (так званий ТАТА-box), яка була раніше охарактеризована для *Arabidopsis thaliana* [31, 32]. У цього виду та у *Rosa rugosa* [26] ця ділянка має довжину 8 нп та починається у позиції -30. У дубів вона має вигляд ТТТАТАА та знаходиться у тій самій позиції, тоді як у інших рослин ТАТА-box може дещо відрізнятися за довжиною та розташуванням

[28–30, 33, 34]. Інший важливий для ініціації транскрипції сигнал – динуклеотид GC [31] – у представників роду *Quercus* дуплікований і знаходиться, відповідно, як в типовій позиції –12, так і додатково у позиції –14. Цікаво, що найбільш консервативний у покритонасінних рослин зовнішній елемент промотора – цитозин в позиції –1 [27–29, 31, 32] – у IGS дубів замінений на тимін. На загал, отримані дані свідчать, що зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III у роді *Quercus* та у інших груп дводольних рослин суттєво відрізняються.

Особливістю будови 5S рДНК дубів є присутність двох копій тандемних субповторів довжиною близько 70 нп (рис. 1) у IGS всіх досліджених видів за виключенням *Q. lobata* (а також інших представників секції *Quercus*). Обидві копії субповторів несуть ряд мутацій та починаються оліго-Т послідовністю. Ця послідовність у складі першого субповтору знаходиться на початку IGS безпосередньо після кодувальної ділянки і вірогідно виконує функцію термінатора транскрипції, як це було доведено для *Arabidopsis thaliana* [31, 32]. Існування аналогічної ділянки було показано і для

ряду інших Покритонасінних рослин [27–29, 35–38]. Можна висунути припущення, що оліго-Т послідовність у складі другого субповтору може мати функцію «запасного» термінатора транскрипції.

На основі вирівнювання нуклеотидних послідовностей був обрахований рівень подібності між IGS 5S рДНК дубів (табл. 2). Значення цього показника між клонами одного виду знаходиться в межах від 97,9 % для *Q. glauca* до 99,7 % для *Q. acutissima*. Отже, для видів роду *Quercus* характерна висока внутрішньогеномна подібність повторів 5S рДНК як за довжиною, так і за послідовністю нуклеотидів. Раніше у різних видів рослин було виявлено присутність у геномі як одного, так і кількох варіантів 5S рДНК, які суттєво відрізняються між собою [27, 33, 34]. При цьому було запропоновано думку, що різні варіанти 5S рДНК мають мати різну хромосомну локалізацію, тоді як в межах одного локусу завдяки генній конверсії підтримується висока подібність окремих повторів [34]. Наші нові результати підтримують таку точку зору, адже у каріотипі дубів присутній лише один локус 5S рДНК на другій хромосомі [39].

Таблиця 2. Рівень подібності (%) IGS 5S рДНК видів роду *Quercus*

| Вид-клон               | <i>Q. acutissima-4</i> | <i>Q. acutissima-5</i> | <i>Q. cerris</i> | <i>Q. suber</i> | <i>Q. ilex</i> | <i>Q. baloot</i> | <i>Q. glauca-4</i> | <i>Q. glauca-5</i> | <i>Q. robur</i> | <i>Q. lobata</i> | <i>Q. texana-4</i> | <i>Q. texana-6</i> | <i>C. mollissima</i> |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|--------------------|--------------------|-----------------|------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| <i>Q. acutissima-4</i> | 100                    | 99,7                   | 91,5             | 87,7            | 84,3           | 88,4             | 74,6               | 74,6               | 58,9            | 57,1             | 57,0               | 57,3               | 56,5                 |
| <i>Q. acutissima-5</i> |                        | 100                    | 91,8             | 88,0            | 84,6           | 88,7             | 74,9               | 74,9               | 59,2            | 57,4             | 57,3               | 57,6               | 56,8                 |
| <i>Q. cerris</i>       |                        |                        | 100              | 93,7            | 85,5           | 87,5             | 74,2               | 74,5               | 60,2            | 58,1             | 56,1               | 56,7               | 56,6                 |
| <i>Q. suber</i>        |                        |                        |                  | 100             | 83,2           | 86,1             | 73,1               | 74,1               | 59,5            | 57,3             | 58,2               | 58,8               | 55,0                 |
| <i>Q. ilex</i>         |                        |                        |                  |                 | 100            | 87,0             | 72,6               | 73,1               | 62,3            | 61,1             | 55,0               | 55,6               | 57,4                 |
| <i>Q. baloot</i>       |                        |                        |                  |                 |                | 100              | 78,4               | 78,9               | 61,6            | 60,1             | 60,0               | 60,6               | 59,6                 |
| <i>Q. glauca-4</i>     |                        |                        |                  |                 |                |                  | 100                | 97,9               | 52,8            | 51,4             | 57,9               | 58,3               | 51,5                 |
| <i>Q. glauca-5</i>     |                        |                        |                  |                 |                |                  |                    | 100                | 53,4            | 52,0             | 59,0               | 59,3               | 52,1                 |
| <i>Q. robur</i>        |                        |                        |                  |                 |                |                  |                    |                    | 100             | 92,6             | 40,4               | 41,1               | 62,5                 |
| <i>Q. lobata</i>       |                        |                        |                  |                 |                |                  |                    |                    |                 | 100              | 38,7               | 39,4               | 61,1                 |
| <i>Q. texana-4</i>     |                        |                        |                  |                 |                |                  |                    |                    |                 |                  | 100                | 99,1               | 38,8                 |
| <i>Q. texana-6</i>     |                        |                        |                  |                 |                |                  |                    |                    |                 |                  |                    | 100                | 38,8                 |
| <i>C. mollissima</i>   |                        |                        |                  |                 |                |                  |                    |                    |                 |                  |                    |                    | 100                  |

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

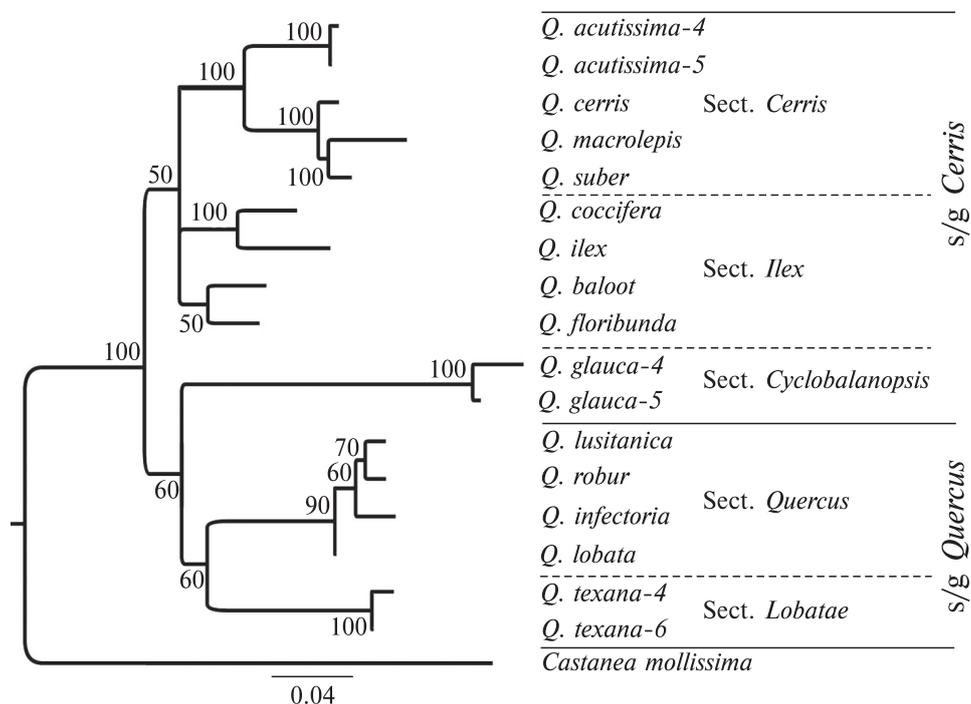


Рис. 3. Філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК представників роду *Quercus* методом максимальної правдоподібності з використанням GTR моделі заміщення. Цифри біля вузлів відповідають бутстреп-підтримці, яка розрахована у відсотках для 1000 реплікацій

Рівень подібності між послідовностями IGS різних видів роду *Quercus* варіює у широких межах, з найнижчим значенням 38,7–39,4 % між *Q. lobata* та *Q. texana* (табл. 2). Таке низьке значення пояснюється наявністю у обох видів полінуклеотидних делецій у різних ділянках IGS.

Використовуючи наявні послідовності IGS, ми побудували дендрограму, яка відображає філогенетичні відносини різних груп у роді *Quercus*. У якості зовнішньої групи було обрано *C. mollissima* (рис. 3). Дві основні клади на цій дендрограмі відповідають двом підродам дубів: *Cerris* та *Quercus*. До підроду *Cerris* віднесено секції *Cerris* та *Ilex*, а до підроду *Quercus* – секції *Quercus* та *Lobata*, що цілком підтримує нещодавно запропоновану класифікацію роду [6]. Проте, на відміну від існуючих уявлень секція *Cyclobalanopsis* (*Q. glauca*) знаходиться у кладі підроду *Quercus*, замість підроду *Cerris*.

Як вже згадувалося вище, положення секції *Cyclobalanopsis* є найбільш суперечливим питанням у внутрішньородовій таксономії роду

*Quercus*. Навіть автори, які відносять її до підроду *Cerris* зазначають, що положення клади *Cyclobalanopsis* на філогенетичних деревах є нестабільним і легко змінюється, зокрема, в залежності від вибору зовнішньої групи [4, 8]. Беручи до уваги всі ці данні і враховуючи, що на отриманій нами дендрограмі положення секції *Cyclobalanopsis* в межах підроду *Quercus* має відносно низьку статистичну підтримку, ми вважаємо, що найбільш обґрунтованою є точка зору тих авторів [2, 13], які розглядають *Cyclobalanopsis* як окремий підрід.

Для підроду *Quercus* ми вперше сиквенували IGS 5S рДНК *Q. texana* – виду, який належить до сек. *Lobatae*. В межах цього підроду секції *Lobatae* та *Quercus* групуються разом, хоча і розділені значною філогенетичною дистанцією (рис. 3, табл. 2). Такий результат цілком відповідає існуючим таксономічним уявленням.

У наших дослідженнях було також проаналізовано філогенетичне положення географічно віддалених видів в межах секцій. Встановле-

но, що *Q. acutissima* (сек. *Cerris*) з Південно-східної Азії та *Q. lobata* з Північної Америки (сек. *Quercus*) виступають сестринськими таксонами по відношенню до західноєвразійських видів (рис. 3). При цьому *Q. lobata* виявився набагато більш спорідненим із своїми родичами з Західної Європи, ніж *Q. acutissima* — зі своїми. Імовірною причиною такої різниці може бути те, що північноамериканські та західноєвразійські види сек. *Quercus* дивергували пізніше, ніж види сек. *Cerris* з Південно-східної Азії та Західної Європи.

**Висновки.** В видів роду *Quercus* наявний один варіант повторів 5S рДНК, які мають високий рівень внутрішньогеномної подібності. Потенційні зовнішні елементи промотора РНК полімерази III відрізняються від таких у інших родин двудольних рослин. Рівень подібності IGS у видів роду *Quercus* змінюється у широких межах, що робить цю ділянку геному зручним інструментом для реконструкції філогенії в межах цього роду. На загал результати порівняльного аналізу IGS підтримують існуючу таксономію роду, за виключенням положення секції *Cyclobalanopsis*, яка має ізольовану позицію і може розглядатись як окремий підрід.

**Дотримання етичних стандартів.** Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і 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 № 0118U000137).

Автори висловлюють щире подяку проф. Edith Stabenheimer (університет м. Грац, Австрія) за наданий для досліджень матеріал.

#### 5S RIBOSOMAL DNA OF DISTANTLY RELATED *QUERCUS* SPECIES: MOLECULAR ORGANIZATION AND TAXONOMIC APPLICATION

Y.O. Tynkevich, R.A. Volkov

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University  
Kotsiubynski str. 2, 58012 Chernivtsi, Ukraine  
E-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

The genus *Quercus* (oak) is a widespread and economically important genus of tree plants. The intrageneric taxonomy

of this group remains controversial due to widely distributed interspecific hybridization and convergent similarity of morphological traits. Further progress in this problem requires application of molecular methods. Taking into account that the comparison of 5S rDNA was successfully used in the molecular taxonomy of plants, we cloned and sequenced this genomic region for representatives of three taxonomically distant *Quercus* species: *Q. acutissima* (sect. *Cerris*) and *Q. glauca* (sect. *Cyclobalanopsis*) from East Asia and *Q. texana* (sect. *Lobatae*) from North America. We also identified 5S rDNA in the genome sequences available in the Genbank database for North American species *Q. lobata* (sect. *Quercus*) and for the related genus *Castanea*. It was found that the 5S rDNA repeated units demonstrate a high level of intragenomic sequence similarity in representatives of genus *Quercus*. The potential external elements of the 5S rDNA promoter differ from those in other families of dicotyledonous plants. The results of the comparative sequence analysis of the 5S rDNA intergenic spacer region support the existing taxonomy of the genus and indicate the isolated position of section *Cyclobalanopsis*, which can be considered as a separate subgenus.

#### 5S РИБОСОМНАЯ ДНК ОТДАЛЕННО РОДСТВЕННЫХ ВИДОВ РОДА *QUERCUS*: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И ТАКСОНОМИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Ю.О. Тынкевич, Р.А. Волков

Род *Quercus* (дуб) является широко распространенным и экономически важным родом древесных растений. Внутривидовая таксономия этого рода остается дискуссионной вследствие значительного распространения межвидовой гибридизации и конвергентной схожести морфологических признаков. Дальнейший прогресс в этом вопросе требует применения молекулярных методов. Учитывая, что сравнение 5S рДНК с успехом используется в молекулярной таксономии растений, мы клонировали и секвенировали этот участок генома для представителей филогенетически отдаленных видов рода *Quercus*: *Q. acutissima* (секция *Cerris*) и *Q. glauca* (сек. *Cyclobalanopsis*) из Восточной Азии, а также *Q. texana* (сек. *Lobatae*) из Северной Америки. Также нами были идентифицированы последовательности 5S рДНК в полногеномных сиквенсах, доступных в базе данных Genbank для североамериканского вида *Q. lobata* (сек. *Quercus*) и родственного рода *Castanea*. Установлено, что в геноме представителей рода *Quercus* повторяющиеся единицы 5S рДНК являются гомогенными. Потенциальные внешние элементы промотора 5S рДНК отличаются от таковых у других семейств двудольных растений. Результаты

сравнительного анализа последовательностей межгенного спейсерного участка 5S рДНК дополняют существующую таксономию рода и указывают на изолированное положение секции *Cyclobalanopsis*, которая может рассматриваться как отдельный подрод.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Govaerts, R., Frodin, D.G., World checklist and bibliography of Fagales, Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 1998.
- Nixon, K.C., Global and neotropical distribution and diversity of oak (genus *Quercus*) and oak forests, *Ecol. Conservat. Neotrop. Montane Oak Forests*, Berlin, Heidelberg: Springer, 2006, pp. 3–13. doi: 10.1007/3-540-28909-7\_1.
- Deng, M., Jiang, X.L., Hipp, A.L., Manos, P.S., and Hahn, M., Phylogeny and biogeography of East Asian evergreen oaks (*Quercus* section *Cyclobalanopsis*; Fagaceae): insights into the Cenozoic history of evergreen broad-leaved forests in subtropical Asia, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2018, vol. 119, pp. 170–81. doi: 10.1016/j.ympev.2017.11.003.
- Denk, T., Grimm, G.W., The oaks of western Eurasia: traditional classifications and evidence from two nuclear markers, *Taxon*, 2010, vol. 59, no. 2, pp. 351–66. doi: 10.1002/tax.592002.
- Simeone, M.C., Grimm, G.W., Papini, A., Vessella, F., Cardoni, S., Tordoni, E., Piredda, R., Franc, A., and Denk, T., Plastome data reveal multiple geographic origins of *Quercus* group *Ilex*, *Peer. J.*, 2016, vol. 4, e1897. doi: 10.7717/peerj.1897.
- Denk, T., Grimm, G.W., Manos, P.S., Deng, M., and Hipp, A.L., An updated infrageneric classification of the oaks: review of previous taxonomic schemes and synthesis of evolutionary patterns, *Oaks Physiol. Ecol. Expl. Function. Diver. Genus Quercus L.*, Cham: Springer, 2017, pp. 13–38. doi: 10.1007/978-3-319-69099-5\_2.
- Van Valen, L., Ecological species, multispecies, and oaks, *Taxon*, 1976, vol. 25, no. 2/3, pp. 233–9. doi: 10.2307/1219444.
- Hubert, F., Grimm, G.W., Jouselin, E., Berry, V., Franc, A., and Kremer, A., Multiple nuclear genes stabilize the phylogenetic backbone of the genus *Quercus*, *Syst. Biodivers.*, 2014, vol. 12, no. 4, pp. 405–23. doi: 10.1080/14772000.2014.941037.
- Pham, K.K., Hipp, A.L., Manos, P.S., and Cronn, R.C., A time and a place for everything: phylogenetic history and geography as joint predictors of oak plastome phylogeny, *Genome*, 2017, vol. 60, no. 9, pp. 720–32. doi: 10.1139/gen-2016-0191.
- McVay, J.D., Hauser, D., Hipp, A.L., and Manos, P.S., Phylogenomics reveals a complex evolutionary history of lobed-leaf white oaks in western North America, *Genome*, 2017, vol. 60, no. 9, pp. 733–42. doi: 10.1139/gen-2016-0206.
- Simeone, M.C., Cardoni, S., Piredda, R., Imperatori, F., Avishai, M., Grimm, G.W., and Denk, T., Comparative systematics and phylogeography of *Quercus* section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation, *Peer. J.*, 2018, vol. 6, e5793. doi: 10.7717/peerj.5793.
- Hipp, A. L., Manos, P.S., Hahn, M., Avishai, M., Bodénis, C., Cavender-Bares, J., Crowl, A., Deng, M., Denk, T., Fitz-Gibbon, S., Gailing, O., González-Elizondo, M.S., González-Rodríguez, A., Grimm, G.W., Jiang, X-L., Kremer, A., Lesur, I., McVay, J. D., Plomion, C., Rodríguez-Correa, H., Schulze, E-D., Simeone, M.C., Sork, V.L., and Valencia-Avalos S., Genomic landscape of the global oak phylogeny, *bioRxiv*, 2019. pp. 587253. doi: 10.1101/587253.
- Barry, E., Averyanova, A., Kvaček, Z., Momohara, A., Pigg, K.B., Popova, S., Postigo-Mijarra, J.M., Tiffney, B.H., Utescher, T., and Zhou, Z.K., The fossil history of *Quercus*, *Oaks Physiol. Ecol. Expl. Function. Diver. Genus Quercus L.*, 2017, Cham: Springer, pp. 39–105. doi: 10.1007/978-3-319-69099-5\_3.
- Chengjiu, H., Yongtian, Z., and Bartholomew, B., Fagaceae. Zheng-Yi, W., Raven, P. (eds). *Flora of China*, 1999, vol. 4, Beijing: Science Press, pp. 300–400.
- Grant, V. Plant speciation, 2nd ed. New York: Columbia Univ. Press, 1981, 563 p.
- Soltis, P.S., Soltis, D.E., The role of hybridization in plant speciation, *Ann. Rev. Plant Biol.*, 2009, vol. 60, pp. 561–88. doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.092039.
- Volkov, R.A., Medina, F.J., Zentgraf, U., and Hemleben, V., Molecular cell biology: organization and molecular evolution of rDNA, nucleolar dominance, and nucleolus structure, *Progr. Bot.*, 2004, vol. 65, pp. 106–46. doi: 10.1007/978-3-642-18819-0\_5.
- Volkov, R.A., Zanke, C., Panchuk, I.I., and Hemleben, V., Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding, *Theor. Appl. Genet.*, 2001, vol. 103, no 8, pp. 1273–82. doi: 10.1007/s001220100670.
- Saini, A., Jawali, N., Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications, *Plant Syst. Evol.*, 2009, vol. 280, no. 3–4, p. 187. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4.
- Caliy, M.F., Lepis, K.B., Pirani, J.R., and Struwe, L., Phylogeny of Helieae (Gentianaceae): Resolving taxonomic chaos in a Neotropical clade, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2017, vol. 106, pp. 192–208. doi: 10.1016/j.ympev.2016.09.013.

21. Porebski, S., Bailey, L.G., and Baum, B.R., Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1997, vol. 15, no. 1, pp. 8–15. doi: 10.1007/BF02772108.
22. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J., Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 1990, vol. 215, no 3, pp. 403–10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
23. Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucl. Acids Res.*, 1994, vol. 22, no 22, pp. 4673–80. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
24. Edgar, R.C., MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucl. Acids Res.*, 2004, vol. 32, no. 5, pp. 1792–7. doi: 10.1093/nar/gkh340.
25. Stamatakis, A., RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies, *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 9, pp. 1312–3. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
26. Sork, V.L., Squire, K., Gugger, P.F., Steele, S.E., Levy, E.D., and Eckert, A.J., Landscape genomic analysis of candidate genes for climate adaptation in a California endemic oak, *Quercus lobata*, *Am. J. Bot.*, 2016, vol. 103, no. 1, pp. 33–46. doi: 10.1007/s11295-016-0975-1.
27. Tynkevich, Y.O., Volkov, R.A., Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*, *Cytol. Genet.*, 2014, vol. 48, no. 1, pp. 3–9. doi: 10.3103/S0095452714010095.
28. Tynkevich, Y.O., Nevelska, A.O., Chorney, I.I., and Volkov, R.A., Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*, *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*, 2015, vol. 13, no. 1, pp. 81–7.
29. Rusak, O.O., Petrashchuk, V.I., Panchuk, I.I., and Volkov, R.A., Molecular organization of 5S rDNA in two Ukrainian populations of Sycamore (*Acer pseudoplatanus*), *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*, 2016, vol. 14, no. 2, pp. 216–20.
30. Shelyfist, A.Y., Tynkevich, Y.O., and Volkov, R.A., Molecular organization of 5S rDNA of *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don., *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*, 2018, vol. 16, no. 1, pp. 61–8.
31. Douet, J., Tourmente, S., Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*, *Heredity*, 2007, vol. 99, pp. 5–13. doi: 10.1038/sj.hdy.6800964.
32. Simon, L., Rabanal, F.A., Dubos, T., Oliver, C., Lauber, D., Poulet, A., Vogt, A., Mandlbauer, A., Le Goff, S., Sommer, A., Duborjal, H., Tatout, C., and Probst, A.V., Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*, *Nucl. Acids Res.*, 2018, vol. 46, no. 6, pp. 3019–33. doi: 10.1093/nar/gky163.
33. Volkov, R.A., Panchuk, I.I., Borisjuk, N.V., Hosiawa-Baranska, M., Maluszynska, J., and Hemleben, V., Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*, *BMC Plant Biol.*, 2017, vol. 17, no. 1, pp. 1–15. doi: 10.1186/s12870-017-0978-6.
34. Ishchenko, O.O., Panchuk, I.I., Andreev, I.O., Kurnakh, V.A., and Volkov, R.A., Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*, *Cytol. Genet.*, 2018, vol. 52, no. 6, pp. 416–21. doi: 10.3103/S0095452719010146.
35. Volkov, A.R., Panchuk, I.I., 5S rDNA of *Dactylus glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application, *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*, 2014, vol. 12, no. 1, pp. 3–11.
36. Ishchenko O.O., Panchuk I.I., Molecular organization of 5S rDNA of perennial ryegrass *Lolium perenne* L., *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*, 2018, vol. 16, no. 2, pp. 166–73.
37. Garcia, S., Panero, J.L., Siroky, J., and Kovarik, A., Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family, *BMC Plant Biol.*, 2010, vol. 10, no. 1, p. 176. doi: 10.1186/1471-2229-10-176.
38. Tamayo-Ordycyz, Y.J., Narváez-Zapata, J.A., Tamayo-Ordycyz, M.C., and Sánchez-Teyer, L.F., Retroelements and DNA methylation could contribute to diversity of 5S rDNA in *Agave* L., *J. Mol. Evol.*, 2018, vol. 86, no. 6, pp. 404–23. doi: 10.1007/s00239-018-9856-6.
39. Ribeiro, T., Loureiro, J., Santos, C., and Morais-Cecilio, L., Evolution of rDNA FISH patterns in the Fagaceae, *Tree Genet. Genomes*, 2011, vol. 7, no. 6, pp. 1113–22. doi: 10.1007/s11295-011-0399.

Надійшла в редакцію 20.04.19  
Після доопрацювання 08.05.19  
Прийнята до друку 18.11.19