

ФІЗИЧНЕ КАРТУВАННЯ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ 5S ТА 45S рДНК МЕТОДОМ FISH У ВИДІВ РОДУ *IRIS* L.

М.О. ТВАРДОВСЬКА, О.Г. АЛХІМОВА, В.А. КУНАХ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного 150, Київ, 03143, Україна

E-mail: maryana.tvardovska@gmail.com

Автор для кореспонденції – М.О. Твардовська, e-mail: maryana.tvardovska@gmail.com

*Вперше методом FISH проведено картування послідовностей 5S та 45S рДНК у двох видів роду *Iris* L. Виявлено 10 мажорних сигналів 45S рДНК на хромосомах та інтерфазних ядрах *Iris pumila* L. та 6 сигналів у *Iris pseudopumila* Tineo. Знайдено 12 локусів 5S рДНК у *I. pumila*, тоді як у *I. pseudopumila* – лише два. Встановлено високий рівень міксоплоїдії у рослин *I. pumila*, що, ймовірно, пов'язано з гібридним походженням виду. Зважаючи на отримані результати, цілком вірогідно, що *I. pseudopumila* може бути однією з батьківських форм алотетраплоїдного *I. pumila*. Одержані дані можуть бути основою для наступних еволюційних досліджень цього виду. Обговорюються еволюційні зміни диплоїдних предкових форм після утворення алополіплоїдів і значення рибосомних послідовностей ДНК у виявленні цих змін.*

Ключові слова: *Iris pumila* L., *Iris pseudopumila* Tineo, міксоплоїдія, флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH), гени 5S та 45S рДНК.

Вступ. Цитогенетичний аналіз є складовою дослідження виду, який передбачає вивчення кількості, структури та морфології окремих хромосом, а також каріотипу в цілому; дає інформацію про організацію та еволюцію геному (Kunakh, 2005; Schwarzacher et al, 2023). Стандартні цитогенетичні методи використовувалися і досі широко використовуються.

Однак, із розвитком молекулярної цитогенетики, розроблені ефективніші методи, зокрема флуоресцентна гібридизація *in situ* (FISH), що дозволяє ідентифікувати певні послідовності ДНК на хромосомах та здійснювати фізичне картування генів (Valárik et al, 2004; Jiang and Gill, 2006; Van Laere et al, 2008; Figueroa et al, 2012; Guetat et al, 2015). У більшості рослин, які часто використовують як модельні, проведення молекулярно-цитогене-

тичного аналізу ускладнене відсутністю інформативних послідовностей хромосомних маркерів (Garcia et al, 2017; Senderowicz et al, 2022). Тому, найчастіше в якості зондів використовують ділянки геному, які кодують рРНК разом із спейсерними послідовностями, що їх розділяють (так звана рДНК) (Liu et al, 2003; Andreieva et al, 2017; Simeone et al, 2018). У геномі гени рДНК організовані в кластери, складені з тандемних повторів; мають високу копійність, висококонсервативні послідовності та специфічне розташування на хромосомах (Heslop-Harrison and Schwarzacher, 2011; Lakshmanan et al, 2015; Wang et al, 2023). Відомо, що як локалізація, так і кількість локусів рДНК, можуть відрізнятися як між близькоспорідними видами, так і на внутрішньовидовому рівні, завдяки чому їх використовують для розв'язання багатьох питань систематики, філогенії та в еволюційних дослідженнях (Álvarez and Wendel, 2003; Feliner and Rosselly, 2007; Amosova et al, 2017; Hemleben et al, 2021; Vozárová et al, 2021; Rosselló et al, 2022).

В еукаріотів кожен повтор 5S рДНК складається з еволюційно консервативної кодуючої ділянки та варіабельного міжгенного спейсера (Barciszewska et al, 2001; Volkov et al, 2017; Garcia et al, 2020). Гени 45S рДНК розташовані у вигляді тандемних повторів у ділянках ядерцевого організатора, але не всі копії транскрибуються під час мітозу. У деяких видів і навіть родин, 45S рДНК локалізована на одній чи двох парах хромосом диплоїдного геному (Alkhimova et al, 2004; Schwarzacher et al, 2023).

У більшості рослин 5S та 45S рДНК знаходяться в окремих локусах, розташованих на одній або різних хромосомах, тоді як їх локалізація зустрічається рідко (Mizuochi et al,

2007; Lakshmanan et al, 2015; Vozárová et al, 2021). Відомо, що у алополіплоїдних видів 5S, на відміну від 45S рДНК, часто не зазнає гомогенізації, зберігаючи особливості будови, характерні для батьківських форм, що є важливим для ідентифікації гібридів та з'ясування їх походження (Garcia et al, 2017; Volkov et al, 2017; Chrtek et al, 2020).

Одним із родів рослин з численними нез'ясованими питання систематики та еволюції є рід *Iris* L. У літературі мало повідомлень про каріологічні дослідження півників. Наразі достеменно невідомо походження *I. pumila*. Одні вчені вважають цей вид автотетраплоїдною формою *I. attica* Boiss. & Heldr. (Simonet, 1934), інші — природним алотетраплоїдом, каріотип якого утворився внаслідок комбінації хромосомних наборів *I. attica* та *I. pseudopumila* (Mittra, 1956; Twardovska et al, 2014). Зважаючи на це, важливими є подальші каріологічні дослідження цих видів із застосуванням сучасних методів молекулярно-цитогенетичного аналізу. Метою роботи було проведення фізичного картування генів 5S та 45S рДНК у деяких видів роду *Iris*.

Матеріали та методи. Рослинний матеріал та приготування препаратів хромосом. Матеріалом для дослідження слугували корінці рослин *I. pumila*, *I. pseudopumila* та *I. attica*, отримані в асептичних умовах. Умови стерилізації, пророщування насіння та отримання рослин *in vitro* детально описані в роботі (Twardovska et al, 2015). З метою накопичення та синхронізації мітозів корінці проростків довжиною 0,8–1 см витримували при температурі +4 °C впродовж 24–28 год. Зразки фіксували в суміші етанол : льодяна оцтова кислота у співвідношенні 3 : 1 впродовж доби.

ДНК-зонди та їх мічення. В якості зондів використовували повтори 45S рДНК (pTa71), мічені дигоксигенін-11-dUTP (Roche Molecular Biochemicals) та 5S рДНК (pTa794), мічені біотин-16-dUTP (Roche Molecular Biochemicals). Також використовували пробу 5S рДНК, яка містила лише ділянку міжгенного спейсера, отриману з ДНК *I. pumila* у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики НАН України. Зонди мітили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням прямого та зворотного праймерів M13. ПЛР проводили на

тотальний геномний ДНК за наступних умов: 5 хв при 94 °C; 35 циклів — по 30 с при 94 °C, 30 с при 56 °C, 2 хв при 72 °C; елонгація 10 хв при 72 °C.

FISH та мікроскопія. Приготування препаратів хромосом та гібридизацію *in situ* проводили за методикою (Schwarzacher and Heslop-Harrison, 2000). На кожен препарат наносили по 200 мкл РНКази та інкубували при 37 °C впродовж 1 години, потім відмивали в $2 \times \text{SSC}$. Далі зразки інкубували в 4 % параформальдегіді протягом 10 хв і відмивали в $2 \times \text{SSC}$. Препарати обезводнювали в серії спиртів (70°, 90°, 96°) та висушували на повітрі.

На кожне предметне скло з метафазними хромосомами наносили по 30 мкл гібридизаційної суміші, яка містила 50 % формамід, 10 % сульфат декстран, $20 \times \text{SSC}$, 10 % SDS, ДНК сперми лосося та мічену пробу (Vershinin et al, 2001). Денатурацію проводили в OmniSlide машині при температурі 80 °C впродовж 10 хв з градієнтним пониженням температури до 40 °C. Далі препарати інкубували в герметично закритій вологій камері при температурі 37 °C протягом ночі. Після цього знімали покривне скельце, занурювали в $2 \times \text{SSC}$ на 10 хв і в $0,1 \times \text{SSC}$ з 20%-вим розчином формаміду на 5 хв при температурі 42 °C. Далі препарати відмивали в $0,1 \times \text{SSC}$ і $2 \times \text{SSC}$. Зразки, мічені біотином, детектували за допомогою стрептавідину, сполученого із Cy3 («Sigma», США), а зразки, мічені дигоксигеніном — антидигоксигенін-флуоресцеїном («Roche») (Alkhimova et al, 2004). Препарати забарвлювали DAPI (4,6-діамідин-2-феніліндол) та аналізували на флуоресцентному мікроскопі Olympus з відповідними фільтрами за допомогою програми ISIS (Metasystems, Altlussheim, Німеччина).

Результати. У результаті проведеного нами раніше цитогенетичного аналізу видів роду *Iris*, встановлено хромосомні числа $2n = 32$ для рослин *I. pumila* з різних популяцій території України, а також $2n = 16$ для рослин *I. attica* та *I. pseudopumila* з території Греції та Італії, відповідно (Twardovska et al, 2018, 2019). Показано, що *I. pseudopumila* та *I. attica* є диплоїдами, тоді як *I. pumila* є тетраплоїдом з диплоїдним набором $2n = 4x = 32$. Так як до кінця не встановлено походження *I. pumila*, нами висунуто припущення про амфідиплоїдну при-

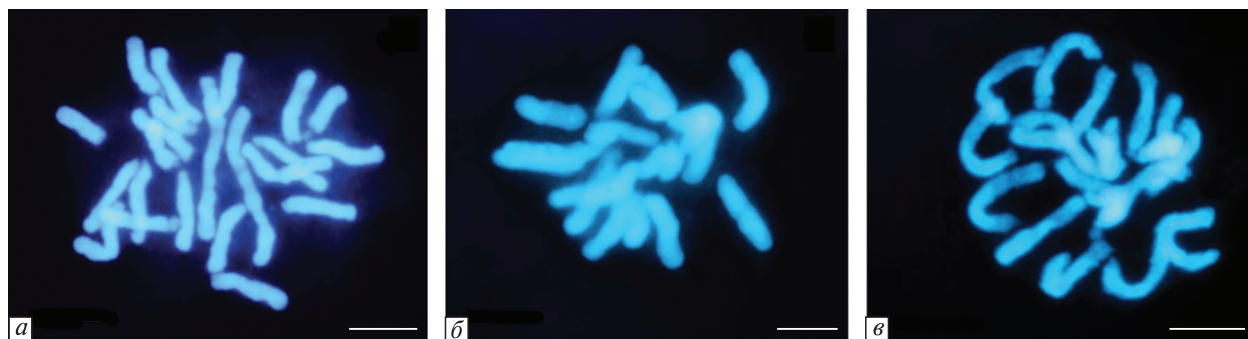


Рис. 1. Метафазні пластинки у коріннях досліджених рослин: *a* – *I. pumila* (24 хромосоми, анеуплоїд); *б* – *I. pseudopumila* (16 хромосом, диплоїд); *в* – *I. attica* (16 хромосом, диплоїд). Хромосоми забарвлені DAPI. Масштаб – 10 мкм

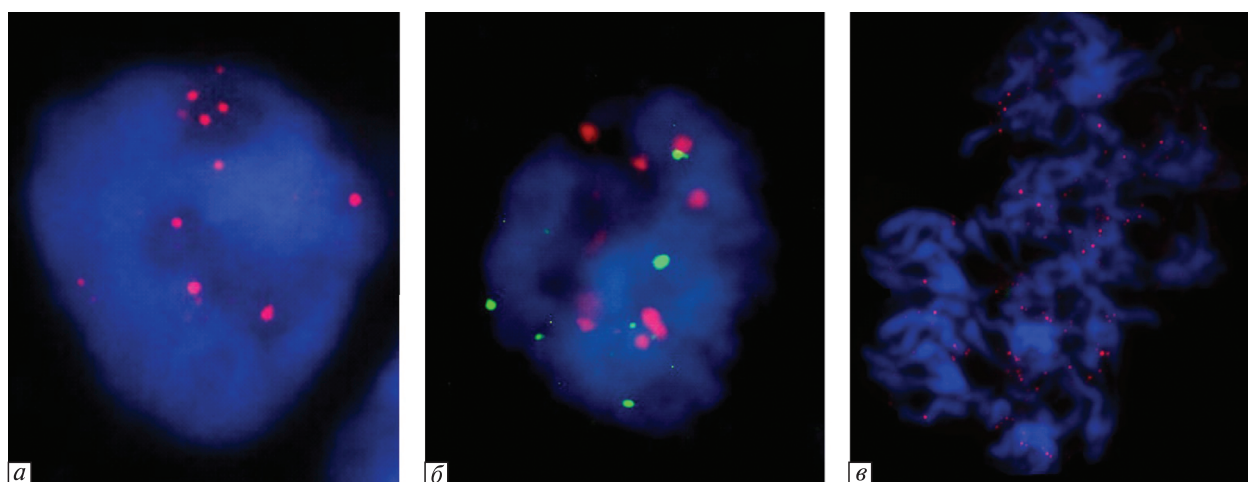


Рис. 2. Флуоресцентна гібридизація *in situ* повторюваних послідовностей 45S рДНК (червоний – *a*, *в*; зелений – *б*) та 5S рДНК (червоний – *б*) на інтерфазних ядрах (*a*, *б*) та хромосомах пентаплоїдної метафазної пластинки (*в*) *I. pumila*

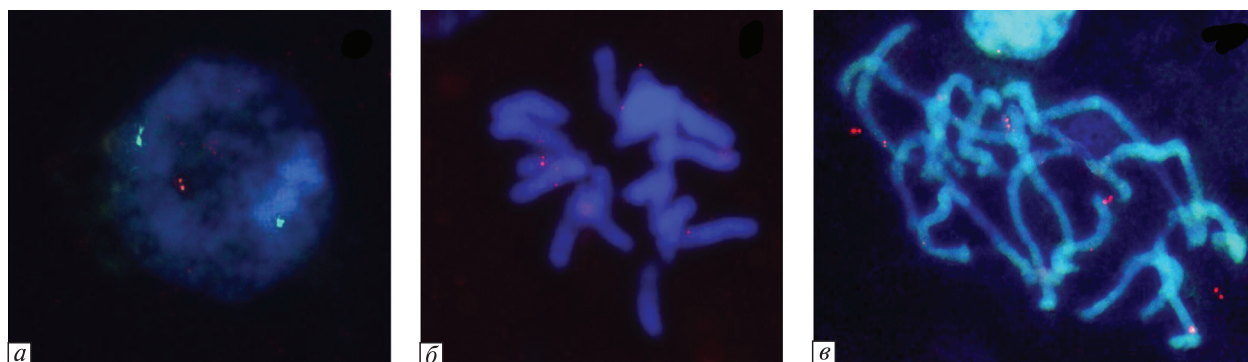


Рис. 3. Локалізація міжгенного спейсера 5S рДНК (зелений) та 45S рДНК (червоний) на інтерфазному ядрі (*a*) та хромосомах (*б*, *в*) *I. pseudopumila*

роду цього виду, каріотип якого міг утворитися внаслідок комбінації хромосомних наборів гіпотетичних предкових форм *I. pseudopumila* та *I. attica* (Twardovska et al, 2018, 2019).

Проведений повторний цитогенетичний аналіз корінців рослин *in vitro* *I. pseudopumila* підтвердив диплоїдну природу цього виду. В апікальній меристемі корінців *I. pumila* виявлено високий рівень міксоплоїдії, що може бути пов'язано з гібридним походженням виду (рис. 1). Багато клітин містили від 16 до 50 хромосом. Виявлено також поодинокі високополіплоїдні клітини (рис. 2, в).

Нами вперше на *I. pumila* та *I. pseudopumila* проведено FISH аналіз із використанням в якості зондів 5S та 45S рДНК з метою з'ясування походження цих видів і їх можливої спорідненості. Виявлено, що *I. pumila* має 10 мажорних сигналів 45S рДНК на хромосомах, тоді як *I. pseudopumila* – 6. Ці послідовності можна візуалізувати як на хромосомах, так і на інтерфазних ядрах (рис. 2–3). Спостерігали 12 сигналів 5S рДНК на ядрах *I. pumila*, тоді як у *I. pseudopumila* їх було лише два. Також виявлено мінорні сигнали повторів 5S та 45S рДНК.

Так як у *I. pseudopumila* нами виявлено лише два локуси 5S рДНК, а у *I. pumila* їх 12, цілком вірогідно, що *I. pseudopumila* може бути однією з батьківських форм алотетраплоїдного гібрида *I. pumila*. Однак, щоб дати остаточну відповідь на походження цього виду, необхідно провести молекулярно-цитогенетичний аналіз ще однієї ймовірної батьківської форми – *I. attica*.

Обговорення. Дослідження близькосторідних зв'язків у роду *Iris*. Подібні результати були отримані іншими вченими при дослідженні трьох корейських видів роду *Iris* (*I. koreana* Nakai, *I. minutoaurea* Makino і *I. odaesanensis* YN Lee) (Park et al, 2022). Незважаючи на відмінності цих півників за кількістю хромосом, два диплоїдні види *I. minutoaurea* ($2n = 22$) і *I. odaesanensis* ($2n = 28$) мають однакову кількість та розташування локусів рДНК (по 2 локуси 5S та 18S рДНК), тоді як *I. koreana* ($2n = 50$) є адитивним щодо кількості локусів рДНК (по 4 локуси 5S та 18S рДНК) від двох ймовірних батьківських диплоїдних форм з однаковою локалізацією генів рДНК, що, можливо, підтверджує його алополіплоїдне походження. Адитивність локусів рДНК і числа хромосом може свідчити про відсутність геномних перебудов у поліплоїда та/або його

недавнє походження (Choi et al, 2020; Yang et al, 2020; Park et al, 2022). У *I. koreana* розмір геному дорівнює сумі розмірів геномів батьківських диплоїдних видів *I. minutoaurea* та *I. odaesanensis* (Choi et al, 2020). Загалом, на еволюцію геному в алополіплоїдах може впливати диплоїдизація чи хромосомні перебудови (Mandáková and Lysak, 2018) або ампліфікація повторюваної ДНК, яка відповідає за зміну розміру геному, як це спостерігається у рослин (Dodsworth et al, 2015). Така ДНК переважно складається з диспергованих повторів (наприклад, ДНК-транспозонів і ретротранспозонів) та специфічних для роду/виду тандемних сателітних ДНК (Park et al, 2022).

У процесі видоутворення й еволюції представників *Iridaceae* важливу роль відіграють поліплоїдія, анеуплоїдія та структурні перебудови хромосом (Sharma and Talukdar, 1960). Більшість видів роду *Iris* алополіплоїдного походження. Деякі дослідники вважають, що тетраплоїдний *I. pumila* є амфідиплоїдом, який утворився в процесі гібридизації *I. pseudopumila* ($2n = 16$) та *I. attica* ($2n = 16$); *I. verticolor* L. ($2n = 108$) є амфідиплоїдом *I. virginica* L. ($2n = 70$) та *I. setosa* Pall. ($2n = 38$) (Anderson, 1936; Lim et al, 2007). За допомогою молекулярно-цитогенетичного аналізу у геномі *I. versicolor* виявлено 3 локуси 18–26S рДНК, успадковані від *I. virginica*, і 2 локуси 5S рДНК, по одному від кожної з батьківських форм – *I. virginica* та *I. setosa*. Це вказує на втрату всіх 3 локусів 18–26S рДНК і 1 локусу 5S рДНК із субгеному, успадкованому від *I. setosa*. Тобто, виявлені зміни торкнулися здебільшого частини геному, що належала раніше *I. setosa*. У *I. verticolor* елімінація рДНК субгеному *I. setosa* не супроводжується збільшенням рДНК субгеному *I. virginica*. Можливо, під час дивергенції *I. versicolor* локуси рДНК, які походять від *I. setosa*, були транскрипційно інактивовані, гетерохроматинізовані та поступово еліміновані. Втрату локусів 18–26S і, можливо, локусів 5S рДНК можна розглядати як ранню ознаку диплоїдизації геному у поліплоїдів (Lim et al, 2007; Rosato et al, 2015).

Перебудови рДНК та реструктуризація геному в алополіплоїдах. В алополіплоїдних видах повтори рДНК у кожній батьківській формі можуть проходити незалежні еволюційні змі-

ни, як це відбувається в деяких алополіплоїдах *Arabidopsis*, *Brassica* та *Nicotiana* (O’Kane et al, 1996; Volkov et al, 1999; Hasterok et al, 2006). Однак, частіше в алополіплоїдах спостерігаються різні типи генетичних змін, включаючи зменшення кількості копій, втрату локусів, внутрішньогеномну та міжгеномну рекомбінацію. У алополіплоїдних видів рослин продемонстровано двобатьківське або одnobатьківське успадкування 45S рДНК, що є прикладом швидкої узгодженої еволюції повторюваних послідовностей (Volkov et al, 2007).

Близько 30–70 % існуючих видів квіткових рослин є природними поліплоїдами. Поліплоїдія часто пов’язана з епігенетичним пригніченням експресії локусів рДНК (Lacadena et al, 1984; Pikaard, 2001). Цілком ймовірно, що ті одиниці та локуси, які є неактивними, найбільш схильні до видалення, оскільки їхня втрата не матиме селективних наслідків. Однак, є поліплоїди, у яких збільшується кількість таких локусів, порівняно з батьківськими формами. Можливо, додаткові повтори виникають через реструктуризацію геному, тоді як тенденція до втрати локусів є довгостроковим процесом повернення до диплоїдного стану (McCann et al, 2020; Wang et al, 2023).

Після формування поліплоїдів мала б зростати кількість локусів рДНК у міру збільшення плоїдності рослин (Lattier et al, 2019). Однак, відбувається втрата локусів рДНК через узгоджену еволюцію на ранніх етапах або впродовж більш тривалого еволюційного періоду (Kovarík et al, 2008). Така втрата означає, що походження поліплоїдів часто може бути приховане через унібатьківське збереження локусів рДНК (Álvarez and Wendel, 2003). Ці зміни можуть включати перебудови геному та хромосомні транслокації, гомеологічну рекомбінацію, активацію транспозонів, а також втрати певних генів та епігенетичні модифікації (Kunakh, 2005; Chen et al, 2007; Wendel, 2015).

Важливим є питання стабільності рДНК, яка виявлена у вищих еукаріотів. Поєднання з тим фактом, що масиви рДНК є рекомбінаційними гарячими точками, зосередило увагу на реакціях пошкодження ДНК у ділянці ядерцевого організатора. Виникнення дволанцюгових розривів ДНК у тяжях рДНК призводить до різкої реорганізації структури ядерця,

що вказує на важливість спостереження інтерфазних ядер (McStay, 2016; Andreieva et al, 2017).

У гібридів число хромосом може змінюватися у наступних поколіннях, але спостерігається чітка тенденція до збереження балансу генів: втрата однієї хромосоми або пари, які походять від однієї батьківської форми, як правило, компенсується додаванням відповідної кількості гомологічних хромосом від іншого батьківського геному (Xiong et al, 2011).

Більшість досліджень сьогодні зосереджені на вивченні алополіплоїдів, порівняння яких з їхніми ймовірними попередниками, ускладнюються різними еволюційними змінами диплоїдних предкових форм та/або еволюційними відмінностями між субгеномами після утворення алополіплоїдів (Vozárová et al, 2021; Shahbazi et al, 2024). Цитонуклеарні взаємодії в алополіплоїдах і міжвидових гомоплоїдних гібридах зіштовхуються з явищем типового одnobатьківського успадкування цитоплазматичних геномів. Гени, кодовані оргanelами, в основному походять від одного батьківського виду (зазвичай материнського), тоді як гени, що кодуються в ядрі, успадковуються від обох предкових форм (Shahbazi et al, 2024).

Отримані нами результати свідчать про можливість перебігу подібних процесів за видоутворення видів роду *Iris*, зокрема *I. pumila*, від ймовірних батьківських видів *I. pseudopumila* та *I. attica*.

Висновки. Вперше проведено FISH на рослинах *I. pumila* та *I. pseudopumila* з використанням в якості зондів 5S та 45S рДНК. Виявлені мажорні сигнали цих локусів на хромосомах та інтерфазних ядрах досліджених видів. Показано високий рівень міксоплоїдії у рослин *I. pumila*, що, очевидно, пов’язано з гібридним походженням виду. Ймовірно, *I. pseudopumila* може бути однією з батьківських форм алотетраплоїдного гібрида *I. pumila*. Однак, щоб дати остаточну відповідь на походження *I. pumila*, необхідно провести молекулярно-цитогенетичне картування ще одного вірогідного батьківського виду — *I. attica*. Основну увагу слід приділити дослідженню алополіплоїдного походження *I. pumila*, проведеного методом FISH, оскільки наявність чи відсутність додаткових повторів свідчить про реструктуризацію геному, тоді як тенденція до втрати локусів є ран-

ньою ознакою його диплоїдазації, що може бути основою для наступних еволюційних досліджень виду.

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. Роботу виконано в рамках бюджетної теми «Генетичні і фізіолого-біохімічні механізми адаптації рослин до екстремальних умов довкілля» № 0120U105249.

PHYSICAL MAPPING OF 5S AND 45S rDNA SEQUENCES BY FISH IN SPECIES OF THE GENUS *IRIS* L.

M.O. Twardovska, O.G. Alkhimova, V.A. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics,
NAS of Ukraine
Akad. Zabolotnoho Str., 150, Kyiv, 03143, Ukraine
E-mail: maryana.tvardovska@gmail.com

For the first time, the FISH was used to map 5S and 45S rDNA sequences in two species of the genus *Iris* L. 10 major 45S rDNA sites were detected on chromosomes and interphase nuclei of *Iris pumila* L. and 6 sites in *Iris pseudopumila* Tineo. 12 loci 5S rDNA were found in *I. pumila*, while only two in *I. pseudopumila*. A high level of mixoploidy was revealed in *I. pumila* plants, which is probably associated with the hybrid origin of the species. Given the results obtained, it is quite likely that *I. pseudopumila* may be one of the parental forms of the allotetraploid *I. pumila*. The data obtained are the basis for further evolutionary studies of this species. The evolutionary changes of diploid ancestral forms following the formation of allopolyploids, and the importance of ribosomal DNA sequences in detecting these changes are discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Alkhimova OG, Mazurok NA, Potapova TA et al (2004) Diverse patterns of the tandem repeats organization in rye chromosomes. *Chromosoma* 113:42–52. <https://doi.org/10.1007/s00412-004-0294-4>

Álvarez I, Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol Phylogenet Evol* 29:417–434. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2)

Amosova AV, Bolsheva NL, Zoshchuk SA et al (2017) Comparative molecular cytogenetic characterization of seven *Deschampsia* (Poaceae) species. *PLoS One* 12:e0175760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175760>

Anderson E (1936) The species problem in *Iris*. *Ann Missouri Bot Gard* 23:457–509

Andreieva SV, Korets KV, Alkhimova OG (2017) Chromosomal abnormalities in bone marrow cells in relapse of chronic lymphocytic leukemia. *Nucl* 60: 361–369. <https://doi.org/10.1007/s13237-017-0225-4>

Barciszewska MZ, Szymański M, Erdmann VA, Barciszewski J (2001) Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochim Pol* 48:191–198. https://doi.org/10.18388/abp.2001_5126

Chen ZJ, Ha M, Soltis D (2007) Polyploidy: genome obesity and its consequences. *New Phytol* 174:717–720. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02084.x>

Choi B, Weiss-Schneeweiss H, Temsch EM et al (2020) Genome Size and Chromosome Number Evolution in Korean *Iris* L. Species (Iridaceae Juss.). *Plants* 9:1284. <https://doi.org/10.3390/plants9101284>

Chrtěk J, Mráz P, Belyayev A et al (2020) Evolutionary history and genetic diversity of apomictic allopolyploids in *Hieracium* s.str.: morphological versus genomic features. *Am J Bot* 107:66–90. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1413>

Dodsworth S, Leitch AR, Leitch IJ (2015) Genome size diversity in angiosperms and its influence on gene space. *Curr Opin Genet Dev* 35:73–78. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.10.006>

Feliner GN, Rosselló JA (2007) Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Mol Phylogenet Evol* 44:911–919. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.01.013>

Figueroa DM, Amarillo IE, Bass HW (2012) Cytogenetic Mapping in Plants. In: *Plant Cytogenetics*. Springer New York, New York, NY, pp 79–119

García S, Kovařík A, Leitch AR, Garnatje T (2017) Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. *Plant J* 89:1020–1030. <https://doi.org/10.1111/tpj.13442>

García S, Wendel JF, Borowska-Zuchowska N et al (2020) The Utility of Graph Clustering of 5S Ribosomal DNA Homoeologs in Plant Allopolyploids, Homoploid Hybrids, and Cryptic Introgressants. *Front Plant Sci* 11: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00041>

Guetat A, Rosato M, Roselló JA, Boussaid M (2015) Karyotype analysis in *Allium roseum* L. (Alliaceae) using fluorescent in situ hybridization of rDNA sites and conventional stainings. *Turk J Botany* 39:796–807. <https://doi.org/10.3906/bot-1408-50>

Hasterok R, Wolny E, Hostawa M et al (2006) Comparative Analysis of rDNA Distribution in Chromosomes of Various Species of Brassicaceae. *Ann Bot* 97:205–216. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj031>

Hemleben V, Grierson D, Borisjuk N et al (2021)

- Personal Perspectives on Plant Ribosomal RNA Genes Research: From Precursor-rRNA to Molecular Evolution. *Front Plant Sci* 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.797348>
- Heslop-Harrison JS (Pat), Schwarzacher T (2011) Organisation of the plant genome in chromosomes. *Plant J* 66:18–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2011.04544.x>
- Jiang J, Gill BS (2006) Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research. *Genome* 49:1057–1068
- Kovarík A, Dadejová M, Lim YK et al (2008) Evolution of rDNA in *Nicotiana* Allopolyploids: A Potential Link between rDNA Homogenization and Epigenetics. *Ann Bot* 101:815–823. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn019>
- Kunakh VA (2005) Biotechnology of medicinal plants. Genetic, physiological and biochemical basis. Logos
- Lacadena JR, Cermeno MC, Orellana J, Santos JL (1984) Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticale by silver-staining procedure. *Theor Appl Genet* 67:207–213. <https://doi.org/10.1007/BF00317037>
- Lakshmanan PS, Van Laere K, Eeckhaut T et al (2015) Karyotype analysis and visualization of 45S rRNA genes using fluorescence in situ hybridization in aroids (Araceae). *Comp Cytogenet* 9:145–160. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v9i2.4366>
- Lattier JD, Chen H, Contreras RN (2019) Variation in Genome Size, Ploidy, Stomata, and rDNA Signals in *Althea*. *J Am Soc Hortic Sci* 144:130–140. <https://doi.org/10.21273/JASHS04618-18>
- Lim KY, Matyasek R, Kovarik A, Leitch A (2007) Parental Origin and Genome Evolution in the Allopolyploid *Iris versicolor*. *Ann Bot* 100:219–224. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm116>
- Liu Z, Zhang D, Wang X et al (2003) Intragenomic and interspecific 5S rDNA sequence variation in five Asian pines. *Am J Bot* 90:17–24. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.1.17>
- Mandáková T, Lysak MA (2018) Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. *Curr Opin Plant Biol* 42:55–65. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.03.001>
- McCann J, Macas J, Novák P et al (2020) Differential Genome Size and Repetitive DNA Evolution in Diploid Species of *Melampodium* sect. *Melampodium* (Asteraceae). *Front Plant Sci* 11:. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00362>
- McStay B (2016) Nucleolar organizer regions: genomic ‘dark matter’ requiring illumination. *Genes Dev* 30:1598–1610. <https://doi.org/10.1101/gad.283838.116>
- Mitra J (1956) Karyotype Analysis of Bearded Iris. *Bot Gaz* 117:265–293. <https://doi.org/10.1086/335916>
- Mizuochi H, Marasek A, Okazaki K (2007) 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* 155:235. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9325-y>
- O’Kane SL, Schaal BA, Al-Shehbaz IA (1996) The origins of *Arabidopsis suecica* (Brassicaceae) as indicated by nuclear rDNA sequences. *Syst Bot* 21: 559–566. <https://doi.org/10.2307/2419615>
- Park I, Choi B, Weiss-Schneeweiss H et al (2022) Comparative Analyses of Complete Chloroplast Genomes and Karyotypes of Allotetraploid *Iris koreana* and Its Putative Diploid Parental Species (*Iris* Series *Chinenses*, Iridaceae). *Int J Mol Sci* 23:10929. <https://doi.org/10.3390/ijms231810929>
- Pikaard CS (2001) Genomic change and gene silencing in polyploids. *Trends Genet* 17:675–677. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02545-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02545-8)
- Rosato M, Moreno-Saiz JC, Galián JA, Rosselló JA (2015) Evolutionary site-number changes of ribosomal DNA loci during speciation: complex scenarios of ancestral and more recent polyploid events. *AoB Plants* 7:plv135. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv135>
- Rosselló JA, Maravilla AJ, Rosato M (2022) The Nuclear 35S rDNA World in Plant Systematics and Evolution: A Primer of Cautions and Common Misconceptions in Cytogenetic Studies. *Front Plant Sci* 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.788911>
- Schwarzacher T, Liu Q, (Pat) Heslop-Harrison JS (2023) Plant Cytogenetics: From Chromosomes to Cytogenomics. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3226-0_1
- Senderowicz M, Nowak T, Weiss-Schneeweiss H et al (2022) Molecular and Cytogenetic Analysis of rDNA Evolution in *Crepis sensu lato*. *Int J Mol Sci* 23:3643. <https://doi.org/10.3390/ijms23073643>
- Shahbazi M, Majka J, Kubíková D et al (2024) Cytoneuclear interplay in auto- and allopolyploids: a multifaceted perspective from the *Festuca-Lolium* complex. *Plant J* 118:1102–1118. <https://doi.org/10.1111/tpj.16659>
- Sharma AK, Talukdar C (1960) Chromosome studies in members of the Iridaceae and their mechanism of speciation. *Genetica* 31:340–384. <https://doi.org/10.1007/BF01984436>
- Simeone MC, Cardoni S, Piredda R et al (2018) Comparative systematics and phylogeography of *Quercus* Section *Cerris* in western Eurasia: inferences from plastid and nuclear DNA variation. *PeerJ* 6:e5793. <https://doi.org/10.7717/peerj.5793>
- Simonet M (1934) Nouvelles recherches cytologiques et génétiques chez les Iris. *Ann Sci Nat Bot* 16:229–383
- Twardovska MO, Andreev IO, Kunakh VA (2015)

- Intraspecific chromosomal polymorphism of *Iris pumila* L. from the territory of Ukraine. *Cytol Genet* 49:322–327. <https://doi.org/10.3103/S0095452715050096>
- Twardovska MO, Andreev IO, Kunakh VA (2018) Introduction into in vitro culture and cytogenetic analysis of *Iris attica* Boiss. & Heldr. and *Iris pseudopumila* Tineo plants. *Visn Ukr Tov Genet and Sel* 16:203–211. <https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.16.2.1058>
- Twardovska MO, Andreev IO, Kunakh VA (2019) Identification of putative origin of *Iris pumila* L. karyotype. *Fakt Eksp Evol Org* 25:20–25. <https://doi.org/10.7124/FEEO.v25.1133>
- Twardovska MO, Andreev IO, Kunakh VA (2014) Karyotypes of species of the genus *Iris* from the flora of Ukraine. *Ukr Bot J* 71:581–589. <https://doi.org/10.15407/ukrbotj71.05.581>
- Valárik M, Bartoš J, Kovářová P et al (2004) High-resolution FISH on super-stretched flow-sorted plant chromosomes. *Plant J* 37:940–950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2003.02010.x>
- Van Laere K, Van Huylenbroeck J, Van Bockstaele E (2008) Karyotype analysis and physical mapping of 45S rRNA genes in *Hydrangea* species by fluorescence in situ hybridization. *Plant Breed* 127:301–307. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01456.x>
- Vershinin AV, Alkhimova AG, Heslop-Harrison JS et al (2001) Different Patterns in Molecular Evolution of the Triticeae. *Hereditas* 135:153–160. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.2001.t01-1-00153.x>
- Volkov RA, Borisjuk NV, Panchuk II et al (1999) Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. *Mol Biol Evol* 16:311–320. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026112>
- Volkov RA, Komarova NY, Hemleben V (2007) Ribosomal DNA in plant hybrids: Inheritance, rearrangement, expression. *Syst Biodivers* 5:261–276. <https://doi.org/10.1017/S1477200007002447>
- Volkov RA, Panchuk II, Borisjuk NV et al (2017) Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biol* 17:21. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0978-6>
- Vozárová R, Herklotz V, Kovářik A 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. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.643548>
- Wang W, Zhang X, Garcia S et al (2023) Intragenomic rDNA variation - the product of concerted evolution, mutation, or something in between? *Heredity* (Edinb) 131:179–188. <https://doi.org/10.1038/s41437-023-00634-5>
- Wendel JF (2015) The wondrous cycles of polyploidy in plants. *Am J Bot* 102:1753–1756. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500320>
- Xiong Z, Gaeta RT, Pires JC (2011) Homoeologous shuffling and chromosome compensation maintain genome balance in resynthesized allopolyploid *Brassica napus*. *Proc Natl Acad Sci* 108:7908–7913. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014138108>
- Yang S, Nam B-M, Jang J et al (2020) A checklist of Gasan Mt.: an online platform for virtual specimens. *Korean J Plant Taxon* 50:453–474. <https://doi.org/10.11110/kjpt.2020.50.4.453>

Надійшла в редакцію 07.11.2024
Після доопрацювання 22.11.2024
Прийнята до друку 18.03.2025