

## ВИКОРИСТАННЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОЇ ТАКСОНОМІЇ ПІДТРИБИ *LOLIINAE* (РОАСЕАЕ)

О.О. ІЩЕНКО<sup>1</sup>, І.О. БЕДНАРСЬКА<sup>2</sup>, І.І. ПАНЧУК<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича, вул. Коцюбинського, 2, Чернівці, 58012, Україна

<sup>2</sup> Інститут екології Карпат, Національна академія наук України, вул. Козельницька, 4, Львів, 79026, Україна

E-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

Рід *Festuca L.* (підтриба *Loliinae*), який налічує близько 500 видів, є одним з найбільших родів триби *Poeae* і поширений по всьому світу. Таксономія роду *Festuca L.* та підтриби *Loliinae* дотепер залишається предметом дискусії. З огляду на те, що порівняння послідовностей міжгенного спейсера у складі 5S рДНК (*intergenic spacer, IGS*) успішно застосовується для оцінки генетичних дистанцій між близькосторідними таксонами рослин, ми оцінили можливість його використання у вивченні філогенії підтриби *Loliinae*. Для цього ми клонували та секвенували цю ділянку геному *F. ovina* (підрид *Festuca*) та *F. carpatica* (підрид *Leucopoa*) і порівняли їх з 5S рДНК *Lolium perenne* та інших представників триби *Poeae*. Встановлено, що в геномах *F. ovina* та *F. carpatica* присутні по одному структурному класу повторів 5S рДНК. Рівень подібності IGS двох досліджених видів *Festuca* становить 80,2–81,7 %, а цих видів та *L. perenne* – 62,5–70,1 %. Види родів *Festuca* та *Lolium* утворюють на філодендрограмі монофілетичну групу з високою статистичною підтримкою, що свідчить про їх походження від спільного предка. Висока швидкість еволюції IGS дозволяє використовувати цю ділянку ядерного геному у дослідженнях з молекулярної таксономії підтриби *Loliinae*.

**Ключові слова:** міжгенний спейсер 5S рДНК, молекулярна еволюція, таксономія та філогеографія, *Lolium*, *Festuca*, *Poeae*.

**Вступ.** Рід Костриця, *Festuca L.* (підтриба *Loliinae* Dumort.) налічує близько 500 видів і є одним з двох найбільших (разом з *Poa L.*) родів триби *Poeae* родини Тонконогові (Роасеае). Представники роду *Festuca* поширені по всьому світу, але найбільше різноманіття вони показують в помірній зоні Північної півкулі. Це багаторічні трави, представлені як диплоїдними (2x), так і поліплоїдними формами (до 12x) (Clayton et al., 1986; Catalán et al., 2007; Devesa et al., 2013).

Деякі види роду *Festuca* (*F. pratensis* Huds., *F. arundinacea* Schreb.) та близько спорідненого роду *Lolium* (*L. multiflorum* Lam. та *L. perenne* L.) є основними кормовими травами, які широко

культивуються в усьому світі (Thomas et al., 2003; Koreský et al., 2008). На сьогодні, завдяки великому практичному значенню, ці види *Festuca* та *Lolium* є одними з найкраще досліджених серед усіх незернових злаків. Проте, генетичний потенціал багатьох інших видів *Festuca* все ще залишається недостатньо використаним, хоча деякі з них вважаються перспективними для селекції (Thomas et al., 1991; Yamada, 2011). Подальший прогрес у цьому питанні потребує кращих знань як про генетичне різноманіття роду, так і філогенетичну спорідненість його видів.

Впродовж останніх трьох століть таксономія роду *Festuca* зазнавала чисельних ревізій. З одного боку було описано чимало нових видів, а з іншого – істотно змінювалось розуміння обсягів самого роду, починаючи від виділення з нього кількох самостійних родів (зокрема *Drymochloa*, *Leucopoa*, *Schedonorus*), закінчуючи комбінацією деяких із видів з родом *Lolium* (Darbyshire, 1993; Foggi et al., 2005; Devesa et al., 2013). Як приклад, ґрунтуючись на порівнянні морфологічних ознак, Clayton та Renvoize (Clayton et al., 1986) виділяють дев'ять підродів. При цьому рід *Lolium* розглядається як похідна від *Festuca* група.

Проблеми таксономії *Festuca* відображають складності систематики родини Роасеае в цілому. Зокрема, для підродини Рооїдеае було доведено, що для філогенетичного аналізу, порівняння лише морфологічних ознак є недостатнім, оскільки в еволюції цієї групи подібні ознаки виникали неодноразово і незалежно та могли швидко змінюватись впродовж відносно короткого часу (Soreng et al., 2007; Tkach et al., 2019). Тому в останні десятиліття для вирішення питань систематики Роасеае все ширше застосовуються молекулярні методи (Hodkinson, 2018), зокрема – секвенування послідовностей хпДНК (Givnish et al., 2010; Soreng et al., 2015; Saarela et al., 2019; Scoppola

© О.О. ІЩЕНКО, І.О. БЕДНАРСЬКА, І.І. ПАНЧУК, 2021

et al., 2019; Duvall et al., 2020; Wang et al., 2020) та ядерної 45S рДНК (Davis et al., 2007; Andreev et al., 2010; Volkov et al., 2010; Peterson et al., 2017; Rodrigues et al., 2017; Barberá et al., 2019).

Використовуючи порівняння ділянок *trnL-F* хпДНК та ITS (internal transcribed spacer) 45S рДНК було отримано нові уявлення про філогенію підтриби *Loliinae* (Gaut et al., 2000; Torrecilla et al., 2002; Catalán et al., 2004; Inda et al., 2014; Cheng et al., 2016). Зокрема було виявлено близьку спорідненість роду *Lolium* та «широколистих» видів *Festuca*, які належать до підроду *Schedonorus*. Ці дані підтримують точку зору (Darbyshire, 1993), що чотири види підроду *Schedonorus* (*F. pratensis*, *F. arundinacea*, *F. maz-zettiana* E.V. Alexeev, *F. gigantea* (L.) Vill.) слід перенести до роду *Lolium*.

Незважаючи на значні успіхи, яких було досягнуто у систематиці підтриби *Loliinae* та родини *Poaceae* в цілому, використання хпДНК та ITS 45S рДНК має певні обмеження. По-перше, хпДНК виявляється недостатньо мінливою, щоб досліджувати філогенетичні відносини на рівні вид-підвид-популяція. По-друге, у багатьох випадках філогенетичні дерева, отримані для цих двох ділянок геному, не співпадають, що свідчить про широке розповсюдження віддаленої гібридизації та сітчастої еволюції (Gaut et al., 2000; Catalán et al., 2004; Inda et al., 2014; Cheng et al., 2016; Tkach et al., 2019). Відповідно, виникає потреба у додатковому використанні у таксономічних дослідженнях інших ділянок ядерного геному (Soreng et al., 2007; Krawczyk et al., 2017).

Ділянка геному, що кодує 5S рРНК (5S рДНК) є зручним інструментом для вивчення молекулярної еволюції та таксономії рослин (Saini et al., 2009; Garcia et al., 2012; Nani et al., 2015; Simeone et al., 2018; Vaio et al., 2019; Garcia et al., 2020), зокрема – і родини *Poaceae* (Baum et al., 1986; Röser et al., 2001; Peng et al., 2008; Ishchenko et al., 2018a, 2020). 5S рДНК відносять до класу середньо повторюваних послідовностей. Кожна повторювана одиниця 5S рДНК містить консервативну кодувальну ділянку та варіабельний міжгенний спейсер (intergenic spacer, IGS) (Cloix et al., 2000; Saini et al., 2009). Швидка еволюція IGS дозволяє використовувати цю ділянку у філогенетичних та філогеографічних дослідженнях таксонів низького рангу (Saini et al., 2009; Ishchenko et al.,

2018a; Simeone et al., 2018; Kolano et al., 2019; Tynkevich et al., 2019).

Враховуючи, що у представників роду *Festuca*, молекулярна організація 5S рДНК все ще залишається неописаною, нами було поставлено завдання клонувати і сиквенувати цю ділянку геному для двох віддалених видів, *F. ovina* L. (підрид *Festuca*) та *F. carpatica* F. Dietr. (підрид *Leucosora*), порівняти її з нещодавно сиквенованою 5S рДНК *L. perenne* (Ishchenko, 2018c) та інших представників триби *Poeae* й оцінити можливість використання цієї ділянки у таксономії підтриби *Loliinae*.

**Матеріали і методи.** Матеріалом для дослідження були гербаризовані зразки *F. ovina* та *F. carpatica* зібрані, відповідно, на території Польщі (г. Ровська, Підляське воєводство) та Українських Карпат (урочище Жандарми біля г. Близниця, Свидовецький хребет, Рахівський район, Закарпатська область). Загальну ДНК екстрагували з використанням цетавлону в якості детергенту (Porebski et al., 1997).

Повторювану одиницю 5S рДНК ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням універсальної пари праймерів Pr5S-L-Not (5'-CAATGCGGCCGCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3') + Pr5S-R-Not (5'-CATTGCGGCCGCTTAACCTTCGGAGTTCTGATGGGA-3'), які комплементарні до консервативної ділянки, що кодує 5S рРНК у покритонасінних рослин (Tynkevich et al., 2014, 2015) і забезпечують ампліфікацію повного IGS та суміжних ділянок кодувальної послідовності. ПЛР проводили з використанням реакційної суміші Master Mix FirePol («Solis Biodyne», Естонія) та ампліфікатора BioRad T100 («BioRad», США) за такою програмою: (1) початкова активація ДНК-полімерази – 95 °C, 13 хв; (2) денатурація ДНК – 95 °C, 15 с; (3) гібридизація праймерів – 60 °C, 30 с; (4) синтез ДНК – 72 °C, 30 с; (5) закінчення ампліфікації – 72 °C, 8 хв; припинення реакції – 4 °C; загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу у 1,5%-ному гелі (Sambrook et al., 1989).

Отримані ПЛР-продукти за допомогою набору для клонування Cloning Jet («Thermo Fisher Scientific», США) лігували у плазмідний вектор pJet 1.2. В подальшому методом електропорації проводили трансформацію компетентних клі-

тин *Escherichia coli* (штам XL-blue) продуктами лігування, застосовуючи для цього прилад E. coli Pulser («BioRad», США). Трансформовані бактеріальні клітини культивували на агаризованому середовищі LB із додаванням ампіциліну. Відібрані колонії вирощували на рідкому середовищі LB та використовували для виділення плазмідної ДНК (Sambrook et al., 1989).

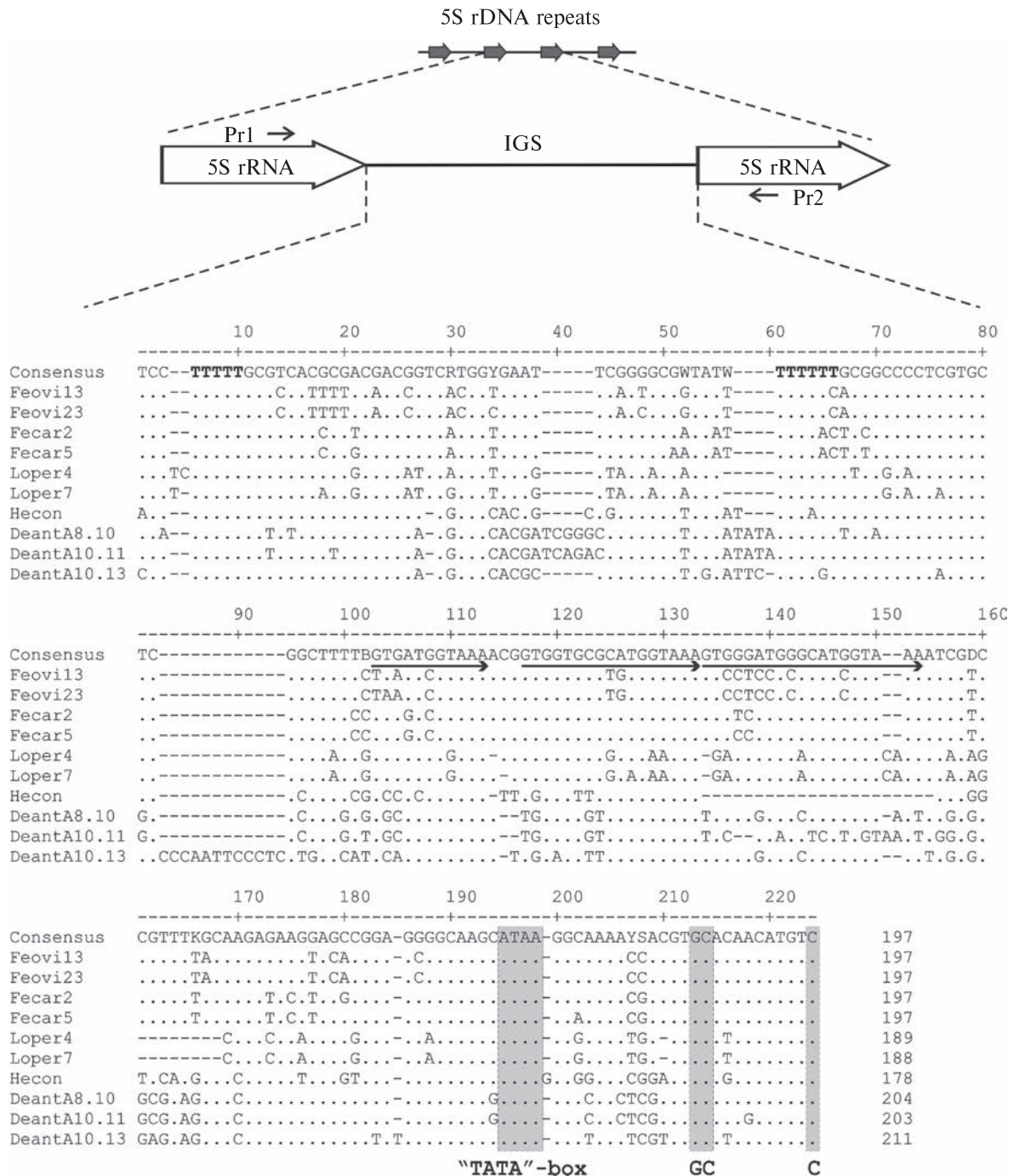
Наявність вставки у плазмідах перевіряли за допомогою ПЛР із праймерами forward (For) та reverse (Rev) для вектора pJet 1.2, сайти гібридизації яких знаходяться в плазмідній ДНК з двох боків від полілінкеру. Рекombінантні плазміди, які містили вставки 5S рДНК, сиквенували на фірмі GATC (Німеччина). Первинну обробку нуклеотидних послідовностей проводили за допомогою комп'ютерних програм Chromas та DNASTAR. Отримані послідовності задепоновано у базі даних Genbank – табл. 1. Вирівнювання послідовностей здійснювали ме-

тодом Muscle (Edgar, 2004). Філогенетична ML (maximum likelihood)-дендрограма була побудована за допомогою плагіну RAxML (Stamatakis, 2014) у середовищі програми Geneious Prime 2019.0.4.

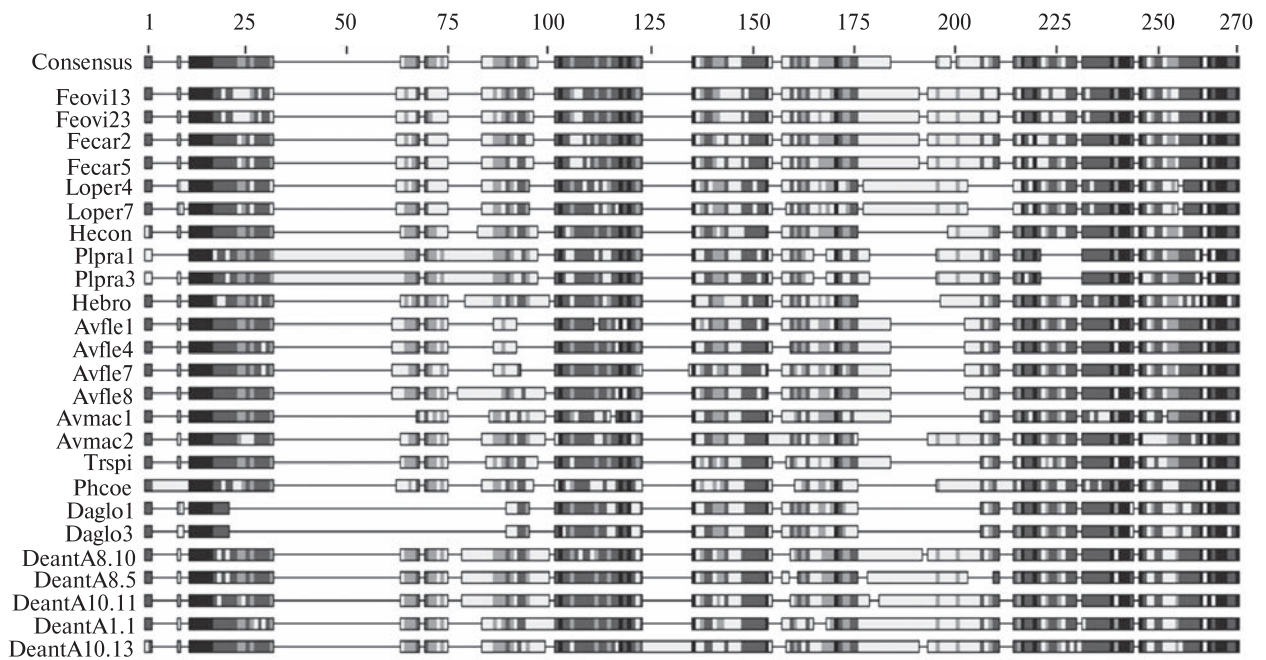
**Результати та обговорення.** Електорофоретичний аналіз ПЛР-продуктів показав, що довжина ампліфікатів 5S рДНК у *F. ovina* та *F. carpatica* становить 320 нп. Це свідчить про наявність в геномі лише одного класу 5S рДНК по довжині. Раніше у *L. perenne* було також встановлено наявність лише одного класу повторів 5S рДНК (Ishchenko, 2018c). Проте, були також описані випадки, коли в геномі представників родини Злакові присутні кілька класів 5S рДНК (Ishchenko et al., 2018a; Volkov et al., 2014), хоча традиційно вважається, що внаслідок концертної еволюції послідовності рибосомальних генів є високо подібними в межах одного геному/виду (Volkov et al., 2014; Shelyfist et al., 2019).

Таблиця 1. Характеристика клонів IGS 5S рДНК

Вид	Клон		IGS		Посилання
	Назва	GenBank Acc. No	Довжина, нп	Вміст GC-пар, %	
<i>Festuca ovina</i>	Feovi13	MT514530	197	48,73	Ця стаття
<i>Festuca ovina</i>	Feovi23	MT514531	197	49,75	Ця стаття
<i>Festuca carpatica</i>	Fecar2	MT514528	197	52,79	Ця стаття
<i>Festuca carpatica</i>	Fecar5	MT514529	197	52,28	Ця стаття
<i>Lolium perenne</i>	Loper4	MT335698	189	47,62	Ishchenko et al., 2018c
	Loper7	MT335699	188	46,81	Ishchenko et al., 2018c
<i>Helictotrichon convolutum</i>	Hecon	AJ390078.1	178	56,74	Röser et al., 2001
<i>Phleum pratense</i>	Plpra1	MT335700	208	52,88	Ishchenko et al., 2018b
	Plpra3	MT335701	209	53,11	Ishchenko et al., 2018c
<i>Helictochloa bromoides</i>	Hebro	AJ390158.1	187	54,01	Röser, 2001
<i>Avenella flexuosa</i>	Avfle1	MT335693	173	55,49	Ishchenko et al., 2020
	Avfle4	MT335694	173	54,91	Ishchenko et al., 2020
	Avfle7	MT335695	190	53,68	Ishchenko et al., 2020
	Avfle8	MT335696	176	56,82	Ishchenko et al., 2020
<i>Avena macrostachya</i>	Avmac1	AJ390215.1	172	54,65	Röser et al., 2001
	Avmac2	EF064638.1	186	53,23	Peng et al., 2008
<i>Trisetum spicatum</i>	Trspi	AJ390233.1	175	56,00	Röser et al., 2001
<i>Phalaris coerulea</i>	Phcoe	Y09573.1	188	48,94	X. Li, unpublished
<i>Dactylis glomerata</i>	Daglo1	KF743553	140	53,57	Volkov et al., 2014
	Daglo3	KF743555.1	140	53,57	Volkov et al., 201
<i>Deschampsia antarctica</i>	DeantA8.10	MH071973	203	54,90	Ishchenko et al., 2018a
	DeantA8.5	MH071972	197	54,59	Ishchenko et al., 2018a
	DeantA10.11	MH071974	203	54,19	Ishchenko et al., 2018a
	DeantA1.1	MH071970	199	55,28	Ishchenko et al., 2018a
	DeantA10.13	MN519101	211	53,55	Ishchenko et al., 2020



**Рис. 1.** Структурна організація міжгенного спейсера 5S рДНК *Festuca ovina* (Feovi), *F. carpatica* (Fecar), *Lolium perenne* (Loper), *Helictotrichon convolutum* (Hecon) та *Deschampsia antarctica* (Deant). Pr1 та Pr2 – праймери 5S-L та 5S-R, відповідно. Вказано розташування потенційних зовнішніх елементів промотора; жирним шрифтом виділено оліго-Т послідовність термінатора; стрілками позначено розташування субповторів у IGS. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1. У випадку *D. antarctica* для порівняння обрано послідовності різних структурних класів 5S рДНК (1А, 1В, 2 та 3 (Ishchenko et al., 2018a, 2020))



**Рис. 2.** Схематичне зображення вирівнювання нуклеотидних послідовностей IGS 5S рДНК видів триби Poaceae. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1. Градацією відтінків сірого показано рівень гомології між окремими ділянками: □ – менше 60 %, ◻ – від 60 до 80 %, ◼ – від 80 до 100 %, ◼ – 100 %

В ході подальших експериментів для обох досліджуваних видів було відібрано по кілька клонів та перевірено їх на наявність вставки за допомогою ПЛР. По два клони кожного виду було просиквеновано.

Комп'ютерний аналіз сиквенованих послідовностей показав, що в усіх зразках клонований фрагмент ДНК складається з послідовності IGS, яка оточена з обох боків фрагментами кодувальної ділянки та праймерами, використаними для клонування. Було встановлено, що довжина IGS для усіх клонів становить 197 нп (табл. 1). У *L. perenne* ця ділянка дещо коротша, 188–189 нп (Ishchenko et al., 2018c). Раніше було продемонстровано, що довжина IGS у видів, які належать до триби Poaceae коливається в межах від 88 до 329 нп (Peng et al., 2008; Volkov et al., 2014; Ishchenko et al., 2018a, 2018b, 2020;). Отже, в ході еволюції в цій ділянці геному неодноразово відбувалися вставки та/або делеції.

Порівняння отриманих послідовностей між собою та з іншими представниками триби Poaceae (рис. 1, 2) показало, що рівень подібності

між клонами Feovi13 та Feovi23 складає 98,5 %, а між Fecar2 та Fecar5 – 97 %. Між двома видами *Festuca*, які належать до двох різних підродів, подібність IGS становить від 80,2 до 81,7 % (табл. 2), тоді як між цими видами та представниками інших родів триби рівень подібності суттєво нижчий та коливається в широких межах – від 43,2 до 70,1 %. При цьому найбільш подібними до *Festuca* виявились *L. perenne*, *Deschampsia antarctica* та *Helictotrichon convolutum* (табл. 2). Цікаво, що *H. convolutum* демонструє відносно високий рівень подібності з усіма порівнюваними видами триби. Це дає підстави припустити, що у цього виду 5S рДНК еволюціонувала з низькою швидкістю, завдяки чому у геномі збереглися предкові послідовності IGS, які не зазнали суттєвих змін.

Порівняння послідовностей IGS видів, які належать до різних родів триби Poaceae (рис. 1), дозволило виявити відносно консервативні елементи, які вірогідно задіяні у транскрипції 5S рДНК. Зокрема, на початку IGS у *Festuca*, як і у більшості інших родів, знаходиться оліго-Т мотив ТТТТТ, який імовірно бере участь у

термінації транскрипції. Також у центральній частині IGS у позиції 63 від кінця кодувальної ділянки у всіх порівнюваних видів знайдена додаткова Т-багата ділянка, яка може грати роль «резервного» термінатора.

Відомо, що у *Arabidopsis thaliana* до елементів зовнішнього промотора РНК-полімерази III належать АТ-багатий мотив ТАТАТА, динуклеотид GC та нуклеотид С, які розташовані, відповідно, на відстані –28, –13 та –1 перед початком кодувальної ділянки (Cloix et al., 2000; Simon et al., 2018). Подібні послідовності знайдені в інших рослин, проте, у представників різних родини вони можуть дещо відрізнятися (Volkov et al., 2003; Volkov et al., 2014; Tynkevich et al., 2014, 2015, 2019; Ishchenko et al., 2018a; Shelyfist et al., 2018, 2019). У всіх порівнюваних видів триби Pooae у позиції –29 виявлено консервативний мотив АТАА (рис. 1). Динуклеотид GC та нуклеотид С знайдено в позиціях –12 та –1, відповідно.

Аналіз послідовностей IGS показав, що в центральній частині спейсерної ділянки у видів підтриби Loliinae та у *D. antarctica* присутні три диверговані копії коротких субповторів (рис. 1). Проте, у *H. convolutum* наявні лише перші дві копії. Вочевидь, третя копія субповтора

виникла внаслідок тандемної дуплікації другої копії у спільного предка *Lolium*, *Festuca* та *Deschampsia* ще до дивергенції цих родів. Впродовж подальшої еволюції у кожній копії субповторів накопичувались індивідуальні заміни нуклеотидів.

Використовуючи отримані послідовності IGS, ми побудували ML-дендрограму, яка відображає філогенетичні відносини досліджуваних видів (рис. 3). На цій дендрограмі видно, що клони 5S рДНК *F. ovina*, *F. carpatica* та *L. perenne* належать до клади з високою бутстреп підтримкою. При цьому два досліджені види Костриць утворюють окрему групу, тоді як *L. perenne* є сестринським видом по відношенню до неї. Така картина цілком узгоджується з думкою про високу спорідненість родів *Festuca* та *Lolium*. Отже, порівняння послідовностей IGS може бути використано у молекулярній таксономії як роду *Festuca*, так і підтриби Loliinae в цілому.

Тим не менш, слід зазначити, що на отриманій нами дендрограмі базальні гілки мають низьку бутстреп-підтримку. Тобто, порівняння наявних послідовностей IGS не дозволяє розкрити еволюційні зв'язки між різними родами триби Pooae. Імовірними причинами

Таблиця 2. Рівень подібності (%) IGS 5S рДНК *Festuca carpatica*, *F. ovina* та деяких представників триби Pooae

Назва клону	Feovi13	Feovi23	Fecar2	Fecar5	Loper4	Loper7	Hecon	DeantA8.10	DeantA8.5	DeantA10.11	DeantA1.1	DeantA10.13
Feovi13	100	98.5	81.7	81.2	64.2	63.5	58.5	60.4	58.7	60.6	59.8	59.6
Feovi23		100	80.7	80.2	63.2	62.5	59.0	60.9	59.1	61.1	60.3	60.1
Fecar2			100	97.0	69.7	69.0	64.0	65.7	63.9	63.5	62.3	64.8
Fecar5				100	70.1	69.5	63.0	65.2	63.0	63.0	61.8	64.3
Loper4					100	95.8	59.9	59.5	59.6	56.7	56.6	58.1
Loper7						100	59.4	60.1	59.9	57.2	56.1	59.5
Hecon							100	65.2	65.5	65.5	65.7	65.0
DeantA8.10								100	87.4	89.8	76.0	74.3
DeantA8.5									100	89.4	74.0	66.8
DeantA10.11										100	76.0	70.8
DeantA1.1											100	69.9
DeantA10.13												100

Примітка. Характеристики використаних клонів наведено у табл. 1.

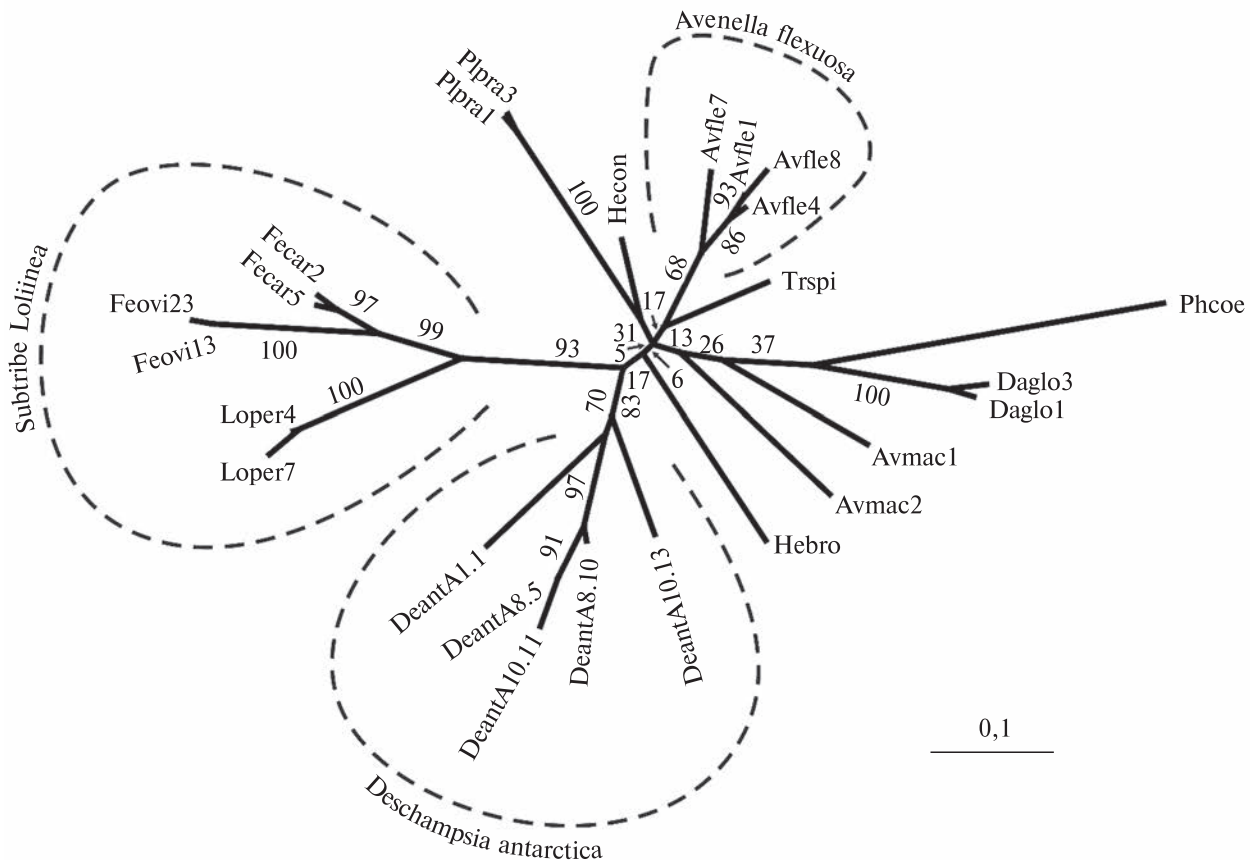


Рис. 3. Філогенетична ML-дендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК *Festuca ovina*, *F. carpatica*, *Lolium perenne* та представників різних родів триби Pooeae. Цифри на дендрограмі показують величину бутстреп-підтримки відповідних гілок

цього слід вважати високий темп еволюції IGS та/або обмежену кількість послідовностей, застосованих для порівняння. Подібний феномен було відмічено раніше при використанні у молекулярній таксономії триби Pooeae послідовностей ITS (Saarela et al., 2010; Tkach et al., 2019).

**Висновки.** В геномі *F. ovina* та *F. carpatica* присутні по одному структурному класу повторів 5S рДНК. Види родів *Festuca* та *Lolium* утворюють на філодендрограмі спільну групу з високою статистичною підтримкою, що свідчить про їх походження від спільного предка. Висока швидкість еволюції IGS 5S рДНК дозволяє використовувати цю ділянку ядерного геному у таксономічних та філогеографічних дослідженнях підтриби Loliinae.

Автори висловлюють щире подяку проф. Р. Волкову (Чернівецький національний університет) за участь у обговоренні отриманих результатів.

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

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Фінансування.** Дослідження проводились за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (грант № 0118U000137).

#### APPLICATION OF 5S RIBOSOMAL DNA FOR MOLECULAR TAXONOMY OF SUBTRIBE LOLIINAE (POACEAE)

O.O. Ishchenko, I.O. Bednarska, I.I. Panchuk

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University  
Kotsiubynski str., 2, 58012 Chernivtsi, Ukraine  
Institute of Ecology of the Carpathians, National  
Academy of Sciences of Ukraine  
Kozelnytska str., 4, 79026 Lviv, Ukraine  
E-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

The genus *Festuca* L. (subtribe Loliinae), which embraces about 500 species, is one of the largest genera of the Poeae tribe and is distributed worldwide. The taxonomy of the genus *Festuca* and the subtribe Loliinae remains a subject of debate until now. Taking into account that the comparison of the 5S rDNA intergenic spacer (IGS) sequences is successfully used to estimate genetic distances between closely related plant taxa, we evaluated the possibility of its application in the study of the phylogeny of the Loliinae subtribe. Accordingly, we cloned and sequenced this region of *F. ovina* (subgenus *Festuca*) and *F. carpatica* (subgenus *Leucopoa*) genomes and compared them with the 5S rDNA of *Lolium perenne* and other members of the tribe Poeae. It was found that the genomes of *F. ovina* and *F. carpatica* contain only one structural class of 5S rDNA repeats. The level of the IGS similarity between the two studied *Festuca* species ranges from 80,2 to 81,7 %, and between these species and *L. perenne* – from 62,5 to 70,1 %. Species of the genera *Festuca* and *Lolium* form a highly-supported monophyletic group on the phylogenetic tree, which indicates their origin from a common ancestor. The high rate of the IGS evolution allows using of this nuclear genome region in studies on the molecular taxonomy of the subtribe Loliinae.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Andreev IO, Spiridonova EV, Kyrachenko SS et al. (2010) Population-genetic analysis of *Deschampsia antarctica* from two regions of Maritime Antarctica. Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. **65**(4):208–10. doi: 10.3103/S0096392510040243.
- Barberá P, Soreng RJ, Peterson PM et al. (2019) Molecular phylogenetic analysis resolves *Trisetum* (Poaceae: Pooideae: Koeleriinae) polyphyletic: Evidence for a new genus, *Sibirotrisetum* and resurrection of *Acrospelion*. J. Syst. Evol. **58**(4): 517–26. doi: 10.1111/jse.12523.
- Baum BR, Johnson DA. (1986) *Lophopyrum* Б. Löve (1980), *Thinopyrum* Á. Löve (1980), *Trichopyrum* Á. Löve (1986): one, two or three genera? A study based on the nuclear 5S DNA. Genet. Resour. Crop. Evol. **65**:161–86. doi: 10.1007/s10722-017-0519-z.
- Catalán P, Torrecilla P et al. (2004) Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe Loliinae and allies (Poeae, Pooideae) inferred from ITS and trnL–F sequences. Mol. Phylogen. Evol. **31**:517–42. doi: 10.1016/j.ympev.2003.08.025.
- Catalán P, Torrecilla P, Lypez-Rodríguez JA et al. (2007) A systematic approach to subtribe Loliinae (Poaceae: Pooideae) based on phylogenetic evidence, Aliso **23**(1):380–405. doi: 10.5642/aliso.20072301.31.
- Cheng Y, Zhou K, Humphreys MW et al. (2016) Phylogenetic relationships in the *Festuca-Lolium* complex (Loliinae; Poaceae): new insights from chloroplast sequences. Front. Ecol. Evol. **4**:89. doi: 10.3389/fevo.2016.00089.
- Clayton WD, Renvoize SA. (1986) Genera Graminum. Grasses of the world. Kew Bull. Add. Ser. **13**:1–389.
- Cloix C, Tutois S, Mathieu O et al. (2000) Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms, Genome Res. **10**(5):679–90. doi: 10.1101/gr.10.5.679.
- Darbyshire SJ. (1993) Realignment of *Festuca* subgenus *Schedonorus* with the genus *Lolium* (Poaceae). Novon. **3**:239–343.
- Davis JI, Soreng RJ. (2007) A preliminary phylogenetic analysis of the grass subfamily Pooideae (Poaceae), with attention to structural features of the plastid and nuclear genomes, including an intron loss in GBSSI. Aliso. **23**:335–48.
- Devesa JA, Catalán P, Muller J et al. (2013) Checklist de *Festuca* L. (Poaceae) en la Península Ibérica. Lagascalia. **33**(1):183–274.
- Duvall MR, Burke SV, Clark DC. (2020) Plastome phylogenomics of Poaceae: alternate topologies depend on alignment gaps. Bot. J. Linn. Soc. **192**(1):9–20. doi: 10.1093/botlinnean/boz060.
- Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucl. Acids Res. **32**(5):1792–7. doi: 10.1093/nar/gkh340.
- Foggi B, Scholz H, Valdés B. (2005) The Euro Med treatment of *Festuca* (Gramineae) – new names and new combinations in *Festuca* and allied genera. Willdenowia **35**(2):241–4. doi.org: 10.3372/wi.35.35202.
- García S, Garnatje T, Kovarik A. (2012) Plant rDNA database: ribosomal DNA loci information goes online. Chromosoma. **121**(4):389–94. doi: 10.1007/s00412-012-0368-7.
- 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**:41. doi: 10.3389/fpls.2020.00041.
- Gaut BS, Tredway LP, Kubik C et al. (2000) Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of the *Festuca-Lolium* complex (Poaceae) based on ITS sequence data. Plant Syst. Evol. **224**:33–53. doi: 10.1007/BF00985265.
- Givnish TJ, Ames M, McNeal JR et al. (2010) Assembling the tree of the monocotyledons: Plastome sequence phylogeny and evolution of Poales. Ann. Missouri Bot. Gard. **97**(4):584–616. doi: 10.3417/2010023.
- Hodkinson TR. (2018) Evolution and taxonomy of the grasses (Poaceae): A model family for the study of species-rich groups. Ann. Rev. Plant Biol. **1**(1):255–94. doi: 10.1002/9781119312994.apr0622.



- Inda LA, Sanmartín I et al. (2014) Mediterranean origin and Miocene–Holocene Old World diversification of meadow fescues and ryegrasses (*Festuca* subgenus *Schedonorus* and *Lolium*). *J. Biogeogr.* **41**(3):600–14. doi: 10.1111/jbi.12211.
- Ishchenko OO, Panchuk II, Andreev IO et al. (2018a) Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol. Genet.* **52**(6):416–21. doi: 10.3103/S0095452719010146.
- Ishchenko OO, Derevenko TO, Panchuk II. (2018b) 5S rDNA of Timothy-grass *Phleum pratense* L. *Sci. Her. Chernivtsi Univ. Biol. (Biol. Systems)*. **10**(2):107–12. doi: 10.31861/biosystems2018.02.107.
- Ishchenko OO, Panchuk II. (2018c) Molecular organization of 5S rDNA of perennial ryegrass *Lolium perenne* L. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* **16**(2):166–73. doi: 10.7124/visnyk.utgis.16.2.1054.
- Ishchenko OO, Mel'nyk VM, Parnikoza IY et al. (2020) Molecular organization of 5S ribosomal DNA and taxonomic status of *Avenella flexuosa* (L.) Drejer (Poaceae). *Cytol. Genet.* **54**(6):505–13. doi: 10.3103/S0095452720060055.
- Kolano BM, Cann J, Oskędra M et al. (2019) Parental origin and genome evolution of several eurasian hexaploid species of *Chenopodium* (Chenopodiaceae). *Phytotaxa*. **392**(3):163–85. doi: 10.11646/phytotaxa.392.3.1.
- Kopecký D, Lukaszewski AJ, Doležel J. (2008) Cytogenetics of *festulolium* (*Festuca* × *Lolium* hybrids). *Cytogen. Genom. Res.* **120**(3–4):370–83. doi: 10.1186/s12864-019-5766-2.
- Krawczyk K, Nobis M, Nowak A et al. (2017) Phylogenetic implications of nuclear rRNA IGS variation in *Stipa* L. (Poaceae). *Sci. Rep.* **7**(1):1–11. doi: 10.1038/s41598-017-11804-x.
- Nani TF, Cenzi G, Pereira DL et al. (2015) Ribosomal DNA in diploid and polyploid *Setaria* (Poaceae) species: number and distribution. *Compar. Cytogen.* **9**(4):645–60. doi: 10.3897/CompCytogen.v9i4.5456.
- Peng YY, Wei YM et al. (2008) Molecular diversity of the 5S rRNA gene and genomic relationships in the genus *Avena* (Poaceae: Aveneae). *Genome*. **51**(2):137–54. doi: 10.1139/G07-111.
- Peterson P.M, Romaschenko K et al. (2017) A molecular phylogeny of the subtribe Sporobolinae and a classification of the subfamily Chloridoideae (Poaceae). *Mem. NY Bot. Gard.* **118**:127–51. doi: 10.21135/893275341.003.
- Porebski S, Bailey LG, Baum BR. (1997) Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* **15**(1):8–15. doi: 10.1007/BF02772108.
- Rodrigues J, Viegas W, Silva M. (2017). 45S rDNA external transcribed spacer organization reveals new phylogenetic relationships in *Avena* genus. *PloS one*. **12**(4):e0176170. doi: 10.1371/journal.pone.0176170.
- Röser M, Winterfeld G et al. (2001) Molecular diversity and physical mapping of 5S rDNA in wild and cultivated oat grasses (Poaceae: Aveneae). *Mol. Phylogen. Evol.* **21**(2):198–217. doi: 10.1006/mpev.2001.1003.
- Saarela JM, Liu Q, Peterson PM et al. (2010) Phylogenetics of the grass 'Aveneae-type plastid DNA clade' (Poaceae: Pooideae, Poaeae) based on plastid and nuclear ribosomal DNA sequence data. Diversity, phylogeny, and evolution in the monocotyledons. Aarhus University Press, Aarhus.
- Saini A, Jawali N. (2009) Molecular evolution of 5S rDNA region in *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its phylogenetic implications. *Plant Syst. Evol.* **280**(3–4):187–206. doi: 10.1007/s00606-009-0178-4.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. (1989) Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Scoppola A, Cardoni S, Pellegrino M et al. (2019) Genetic diversity and taxonomic issues in *Gastridium* P. Beauv (Poaceae) inferred from plastid and nuclear DNA sequence analysis. *BioRxiv*. 817965. doi: 10.1101/817965.
- Shelyfist AY, Tynkevich YO, Volkov RA. (2018) Molecular organization of 5S rDNA of *Brunfelsia uniflora* (Pohl.) D. Don. *Bull. Vavilov. Soc. Genet. Breed. Ukr.* **16**(1):61–8. doi: 10.7124/visnyk.utgis.16.1.903.
- Shelyfist AY, Yakobyshe DV, Volkov RA. (2019) Molecular structure of 5S rDNA of *Mandragora autumnalis* Bertol. *Bull. Vavilov. Soc. Genet. Breed. Ukr.* **17**(2):187–95. doi: 10.7124/visnyk.utgis.17.2.1220.
- 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. *Peer. J.* **6**:e5793. doi: 10.7717/peerj.5793.
- Simon L, Rabanal FA, Dubos T et al. (2018) Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res.* **46**(6):3019–33. doi: 10.1093/nar/gky163.
- Soreng RJ, Davis JI, Voionmaa MA. (2007) A phylogenetic analysis of Poaceae tribe Poaeae sensu lato based on morphological characters and sequence data from three plastid-encoded genes: evidence for reticulation, and a new classification for the tribe. *Kew Bull.* **62**(3):425–54.
- Soreng RJ, Peterson PM, Romschenko K et al. (2015) A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *J. Syst. Evol.* **53**(2):117–37. doi: 10.1111/jse.12150.
- Stamatakis A. (2014) RAxML Version 8: a tool for phy-

- logenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinform.* **30**(9):1312–3. doi: 0.1093/bioinformatics/btu033.
- Thomas H, Humphreys MO. (1991) Progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. *J. Agric. Sci.* **117**(1):1–8.
- Thomas HM, Morgan WG, Humphreys MW. (2003) Designing grasses with a future-combining the attributes of *Lolium* and *Festuca*. *Euphytica.* **133**(1):19–26. doi: 10.1023/A:1025694819031.
- Tkach N, Schneider J, Döring E et al. (2019) Phylogeny, morphology and the role of hybridization as driving force of evolution in grass tribes Aveneae and Poeae (Poaceae). *BioRxiv.* 707588. doi: 10.1101/707588.
- Torrecilla P, Catalán P. (2002) Phylogeny of broad-leaved and fine-leaved *Festuca* lineages (Poaceae) based on nuclear ITS sequences. *Syst. Bot.* **27**(2): 241–51. doi: 10.1043/0363-6445-27.2.241.
- Tynkevich YO, Volkov RA. (2014) Structural organization of 5S ribosomal DNA in *Rosa rugosa*. *Cytol. Genet.* **48**(1):1–6. doi: 10.3103/S0095452714010095.
- Tynkevich YO, Nevelska AO et al. (2015) Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* **13**(1):81–7.
- Tynkevich YO, Volkov RA. (2019) 5S Ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol. Genet.* **53**(6):459–66. doi: 10.3103/S0095452719060100.
- Vaio M, Mazzella C et al. (2019) Effects of the diploidisation process upon the 5S and 35S rDNA sequences in the allopolyploid species of the *Dilatata* group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Austral. J. Bot.* **67**(7):521–30. doi: 10.1071/BT18236.
- Volkov RA, Panchuk II et al. (2003) Plant rDNA: Organization, evolution, and using. *Cytol. Genet.* **37**(1):68–72.
- Volkov RA, Kozeretska IA, Kyryachenko SS et al. (2010) Molecular evolution and variability of ITS1 and ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the Maritime Antarctic. *Polar Sci.* **4**(3):469–78. doi: 10.1016/j.polar.2010.04.011.
- Volkov AR, Panchuk II. (2014) 5S rDNA of *Dactylis glomerata* (Poaceae): molecular organization and taxonomic application. *Bull. Vavilov. Soc. Genet. Breed. Ukr.* **12**(1):3–11.
- Wang W, Chen S, Guo W et al. (2020). Tropical plants evolve faster than their temperate relatives: a case from the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on chloroplast genome data. *Biotech. Biotech. Equip.* **34**(1):482–93. doi: 0.1080/13102818.2020.1773312.
- Yamada, T. (2011) *Festuca*. In: Kole C. (ed) *Wild crop relatives: genomic and breeding resources*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 153–64.

Надійшла в редакцію 27.07.20  
Після доопрацювання 20.08.20  
Прийнята до друку 18.01.21