

УДК 577.212.3:595.789

Ю.О. ТИНКЕВИЧ, Р.А. ВОЛКОВ

Чернівецький національний університет ім. Ю. Федьковича
E-mail: ra.volkov@gmail.com

СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК *ROSA RUGOSA*

З метою вивчення молекулярної організації ділянки геному, що кодує 5S рРНК у диплоїдного виду *Rosa rugosa*, клоновано та секвеновано декілька повторюваних одиниць 5S рДНК. Аналіз отриманих послідовностей показав наявність в геномі єдиного за довжиною повторюваної одиниці варіанта 5S рДНК, який містить інтактні промоторні елементи в міжгенному спейсері (МГС) й імовірно є транскрипційно активним. Знайдено також невелику кількість 5S рДНК-псевдогенів, у яких повністю втрачено МГС та частину кодуючої ділянки. Високий рівень подібності (від 93,7 до 97,5 %), виявлений при порівнянні послідовностей МГС мажорних варіантів 5S рДНК східноазійської *R. rugosa* та північноамериканської *R. nitida*, свідчить про відносно недавню дивергенцію цих видів.

Ключові слова: 5S рДНК, молекулярна еволюція та філогенія, *Rosa*.

Вступ. Значні успіхи, досягнені останніми роками в таксономії квіткових рослин, призвели до перегляду усталених поглядів, що формувались протягом двох сторіч [1–5]. Така ситуація пов'язана із використанням у філогенетичних і таксономічних дослідженнях вищих рослин молекулярних маркерів на основі поліморфізму нуклеотидних послідовностей ДНК, зокрема ділянок геному, що кодують рибосомні РНК (рДНК) [1, 2, 6–9].

Застосування нуклеотидної послідовності 5S рДНК як молекулярного маркера дозволило вдосконалити систематику та філогенію багатьох груп рослин, що пов'язано із особливостями структурної організації цих генів [2,

7, 10]. 5S рДНК належить до класу тандемних повторюваних послідовностей. До складу повторюваної ділянки 5S рДНК входять еволюційно консервативна кодуюча ділянка та варіабельний міжгенний спейсер (МГС). Транскрипцію 5S рДНК забезпечує РНК-полімераза III. Мутації, що виникають у МГС, носять переважно нейтральний характер, завдяки чому уникають дії добору і здатні до накопичення. Таким чином, МГС еволюціонує з більшою швидкістю, ніж інші ділянки геному, що дозволяє виявити різницю у послідовності МГС у близькоспоріднених видів, а інколи – в окремих популяцій [11, 12]. Повтори 5S рДНК організовані в геномі у кластери, що локалізовані на одній чи декількох хромосомах. Кількість повторів на геном складає у вищих рослин від декількох сотень до тисячі [13]. Особливістю еволюції рибосомних генів, як і інших повторюваних послідовностей, є явище концертної (узгодженої) еволюції [14]. Це явище полягає у здатності до гомогенізації (вирівнювання різниці) всіх послідовностей в межах кластера, а інколи – і між кластерами. Для 5S рДНК гомогенізація, особливо між послідовностями з різних кластерів, не завжди відбувається швидко та ефективно, тому можливе одночасне існування в геномі двох та більше варіантів 5S рДНК, що відрізняються за нуклеотидною послідовністю. Зокрема, це дає можливість розрізняти геноми батьківських форм у алополіплоїдних видів через багато поколінь після їхнього виникнення [15].

© Ю.О. ТИНКЕВИЧ, Р.А. ВОЛКОВ, 2014

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2014. Т. 48. № 1

Організація 5S рДНК вивчена неоднорідно серед різних груп квіткових рослин. Для представників деяких таксонів, зокрема роду *Rosa* L., є лише поодинокі відомості про структуру 5S рДНК [16, 17], проте саме для вивчення філогенії таких груп, як рід *Rosa*, де значний відсоток складають види алополіплоїдного походження, перспективним є використання 5S рДНК як молекулярного маркера МГС. Ключем до розуміння процесів молекулярної еволюції у геномах поліплоїдних видів *Rosa* може бути вивчення генетичної структури їх імовірних диплоїдних попередників, до яких, зокрема, відносять шипшину зморшкувату – *Rosa rugosa* Thunb. Нашими попередніми дослідженнями 5S рДНК представників роду *Rosa* продемонстровано можливість використання 5S рДНК як молекулярного маркера у таксономічних дослідженнях цієї групи [17]. В нашій лабораторії також проведено дослідження організації 5S рДНК іншого диплоїдного представника роду – *R. nitida* Willd. [18]. Порівнявши нуклеотидну структуру МГС різних диплоїдів, можна скласти уявлення про швидкість молекулярної еволюції некодуючих послідовностей в роді *Rosa* L. Тому метою даної роботи були клонування, розшифровка та аналіз нуклеотидної послідовності МГС 5S рДНК *R. rugosa*.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження був зразок *Rosa rugosa*, наданий Ботанічним садом Чернівецького національного університету. Загальну ДНК екстрагували згідно зі стандартним протоколом. Як детергент використовували цетавлон [19, 20].

Повторювану ділянку 5S рДНК ампліфікували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Для цього застосовували пару універсальних праймерів 5S-14a-Not (5'-CAATGCGGCCGCGAGAGTAGTACTAGGATGCGTGAC-3') і 5S-15-Not (5'-CATTCGCGGCCGCTATCGGAGTTCTGATGGGA-3'), що є комплементарними до ділянок кодуючої послідовності 5S рДНК дводольних рослин та містять на 5'-кінці додатковий сайт впізнавання рестриктази *NotI* (GCGGCCGC), який використовували для клонування ПЛР-продуктів. Застосовані праймери забезпечують ампліфікацію повного МГС та фланкуючих ділянок кодуючої послідовності (рис. 1). Реакційна суміш загальним

об'ємом 25 мкл містила наступні компоненти: 0,1 мкг загальної геномної ДНК, 1,0 од. акт. ДНК-полімерази (HotStartTaq DNA polymerase, «Qiagen», США), 0,1 мМ суміші дезоксирибонуклеотидтрифосфатів, 1 × буфер для ПЛР та 0,5 мкМ кожного з двох праймерів – 5S-14a-Not і 5S-15-Not.

ПЛР здійснювали із використанням ампліфікатора MiniCycler (MJ Research Inc., США) за такою програмою: 1) початкова активація ДНК-полімерази – 95 °С, 15 хв; 2) денатурація ДНК – 94 °С, 45 с; 3) гібридизація праймерів – 55 °С, 1 хв; 4) синтез ДНК – 72 °С, 2,5 хв; 5) закінчення ампліфікації – 72 °С, 8 хв; 6) припинення реакції – 4 °С. Загальна кількість циклів ампліфікації – 35. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 2%-ному агарозному гелі.

При клонуванні ПЛР-продукти обробляли рестриктазою *NotI* та лігували по комплементарних липких кінцях у сайт *Eco52I* плазмиди рLitmus 38i з використанням Т4 ДНК-лігази («Fermentas», Литва). Трансформацію компетентних клітин лінії *Escherichia coli* XL-blue проводили методом електропорації з використанням приладу *E. coli* Pulser («BioRad», США). Клоні, що містили рекомбінантні плазмиди, виявляли методом *blue-white colony selection* та перевіряли рестриктазним картуванням. Плазмиди виділяли за допомогою лужного лізису [19]. Ферментативні реакції проводили згідно з рекомендаціями фірми-постачальника.

Рекомбінантні плазмиди, що містили інсerti 5S рДНК, секвенували з використанням Big Due Terminator Cycle Sequencing Kit на приладі ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems, США). Первинну обробку отриманої нуклеотидної послідовності проводили за допомогою комп'ютерної програми Chromas та пакету програм комп'ютерної обробки даних DNASTAR [21]. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Clustal V [22]. Для пошуку послідовностей у базі даних Genbank користувались програмою BLAST [23].

Результати досліджень та їх обговорення. За допомогою електрофоретичного аналізу отриманих ПЛР-продуктів встановлено існування в геномі *R. rugosa* лише одного варіанта 5S рДНК послідовностей із довжиною повторюваної одиниці в межах близько 520–550 п.н. Отри-

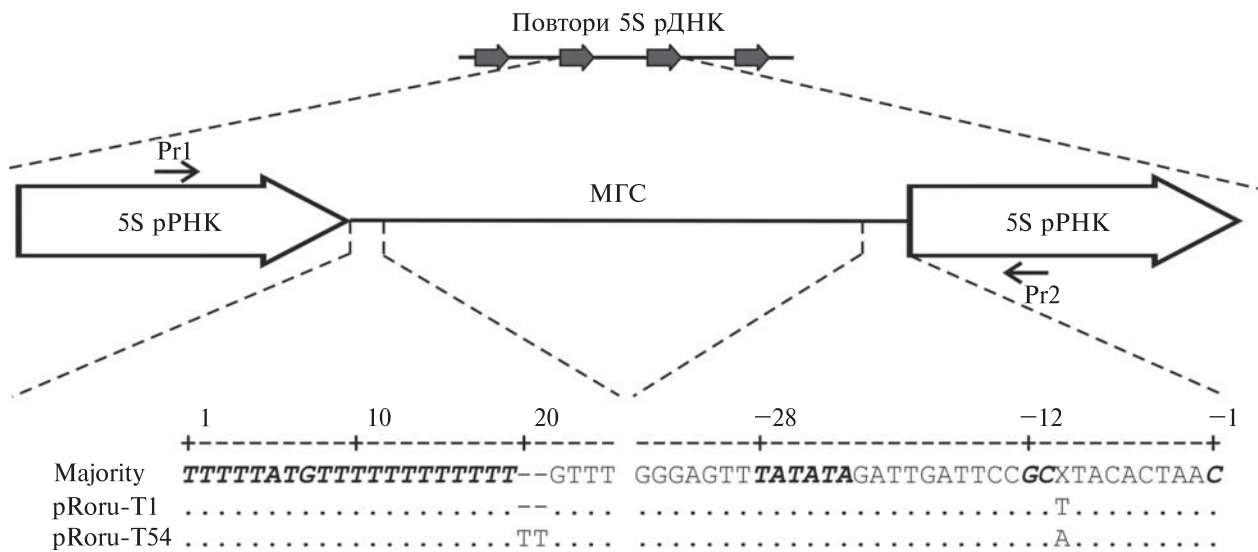


Рис. 1. Структурна організація 5S рДНК *Rosa rugosa*. Наведено фрагменти вирівнювання нуклеотидних послідовностей МГС, що містять регуляторні елементи. Стрілками вказано розташування праймерів Pr1 та Pr2. Жирним курсивом позначено мотиви зовнішнього промотора та термінатора

мані ПЛР-продукти клонувано у бактеріальний вектор.

Із використанням *blue-white colony selection* відібрано 12 колоній трансформантів, з яких виділено зразки плазмідної ДНК. Для перевірки наявності інсерту 5S рДНК провели обробку цих плазмід рестриктазою *Eco52I*, що призвело до утворення двох фрагментів ДНК на електрофореграмі. Фрагмент більшого розміру для всіх зразків мав довжину приблизно 2800–2900 п.н., що відповідає розміру лінійної ДНК вектора pLitmus 38. Фрагмент меншого розміру в більшості зразків (зокрема, клон pRou-T1) мав довжину приблизно 530 п.н., що відповідає розміру ПЛР-продукту 5S рДНК *R. rugosa*, проте для клону pRou-T54 зафіксовано незвичайний розмір інсерту ~600 п.н. Загалом ідентифіковано п'ять плазмід зі вставкою, з яких для секвенування відібрано дві – pRou-T1 та pRou-T54.

Комп'ютерна обробка отриманих в результаті секвенування послідовностей показала, що клон pRou-T1 містить МГС 5S рДНК, фланкований з обох боків фрагментами кодуєчої послідовності. Безпосередньо з полілінкерними ділянками вектора межують послідовності праймерів, використаних при проведенні ПЛР. Загальна довжина інсерту становила 524 п.н.

Структура вставки клону pRou-T54 виявилась більш складною. В ній знайдено дві послідовності різного розміру, що розміщувались одна за одною, і кожна з них обмежувалась з двох боків парою праймерів. Очевидно, в даному випадку у вектор клонувано одразу дві копії ПЛР-продуктів. Довжина короткого інсерту становила 79 п.н., довгого – 526 п.н. Короткий інсерт містив нуклеотидну послідовність фрагмента кодуєчої ділянки 5S рДНК. Цей факт вказує на наявність вкорочених мінорних варіантів 5S рДНК у геномі *R. rugosa*, що присутні в незначній кількості, завдяки чому вони не виявляються при електрофоретичному розділенні ПЛР-продуктів. Те, що кодуєча ділянка в короткому інсерті є неповною, а МГС відсутній, дозволяє віднести цю послідовність до групи псевдогенів.

Визначення меж кодуєчої ділянки дозволило встановити розміри МГС, що складають для послідовностей pRou-T1 і довгого інсерту pRou-T54, – 410 та 412 п.н. відповідно. Подібні розміри – 400 та 392 п.н. – встановлені нами раніше для основного (мажорного) варіанта МГС іншого диплоїдного виду – *R. nitida* [18]. В цілому наведені значення довжин МГС потрапляють в характерні для еукаріотів межі від 200 до 900 п.н. [24, 25]. Довжина ампліфіко-

ваних фрагментів кодуючої ділянки становить 57 п.н. (включаючи послідовність праймера 5S-14a-Not) та 56 п.н. (включаючи послідовність праймера 5S-15-Not), що разом із частиною, яка залишається неампліфікованою, становить 120 п.н. Такий розмір кодуючої ділянки є характерним для переважної більшості видів вищих рослин [24]. У двох проаналізованих нами послідовностях 5S рРНК *R. rugosa* не знайдено мутацій в кодуючій ділянці. Послідовності кодуючої ділянки та міжгенного спейсера істотно відрізняються за нуклеотидним складом. Так, для рRogu-T1 і рRogu-T54 відсоток А-Т пар становить 45,1 в кодуючій ділянці і 62,0 – в МГС.

Вирівнювання отриманих нуклеотидних послідовностей показало, що рівень подібності між повторами 5S рДНК з клонів рRogu-T1 і рRogu-T54 становить 98,7 %. При цьому в межах кодуючої ділянки відмінностей не виявлено, а в МГС знайдено лише одну двонуклеотидну делецію та дві одонуклеотидні трансверсії.

Послідовність псевдогена з клону рRogu-T54 містить два праймери, між якими розміщений фрагмент з 3'-кінця кодуючої ділянки довжиною 29 п.н. Порівняно з аналогічним фрагментом в послідовностях рRogu-T1 і рRogu-T54 знайдено три нуклеотидні заміни – одну транзицію і дві трансверсії.

Пошук важливих для ініціації транскрипції елементів показав, що в МГС клонів рRogu-T1

і рRogu-T54 присутні сигнали, що відповідають зовнішнім регуляторним елементам промотора 5S рДНК [26]. До таких сигналів належить шестинуклеотидний мотив ТАТАТА, розміщений на 3'-кінці МГС в позиції –28 п.н. від 5'-кінця кодуючої ділянки, а також мотиви GC та C в позиціях –12 та –1 п.н. відповідно (рис. 1). Безпосередньо після 3'-кінця кодуючої ділянки також локалізована послідовність оліго-Т, що виконує функцію термінатора транскрипції РНК-полімерази III [26].

В середній частині МГС (позиція –255) знайдено ділянку, що складається з чотирьох коротких субповторів, довжина яких коливається від 6 до 9 п.н. (рис. 2). Консенсусна послідовність цих субповторів виглядає як TTGGGCC.

Для порівняння структурної організації повторюваних одиниць 5S рДНК *R. rugosa* та *R. nitida* з іншими представниками родини Rosaceae використовували послідовності з бази даних GenBank. Всі наявні в GenBank послідовності 5S рДНК розоцвітих належать представникам однієї триби – *Sanguisorbeae*, що відноситься до підродини *Rosoideae*. Встановлено, що в межах кодуючої ділянки між послідовностями 5S рДНК *R. rugosa* та інших розоцвітих існують лише поодинокі нуклеотидні заміни. На противагу цьому подібність між МГС видів роду *Rosa* та представників триби *Sanguisorbeae* виявилась низькою. За результатами вирівнювання послідовностей МГС розраховано відсо-

Рівень подібності МГС 5S рДНК представників підродини *Rosoideae*

Номер клона	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	–	98,3	96,3	97,5	93,7	36,7	26,5	40,3	39,9	36,0
2		–	96,3	97,5	94,7	36,4	26,6	39,2	40,2	35,6
3			–	99,5	94,7	40,0	27,6	33,3	33,8	36,3
4				–	92,2	40,0	27,7	37,8	32,2	34,6
5					–	36,4	34,5	41,7	35,9	35,4
6						–	35,6	76,0	72,4	78,9
7							–	85,1	65,9	73,4
8								–	76,4	75,7
9									–	64,0
10										–

Примітка. *Rosa rugosa*: 1 – рRogu-T1; 2 – рRogu-T54; *Rosa nitida*: 3 – рRoni-T30, 4 – рRoni-T32, 5 – рRoni-T31 (мінорний варіант із вкороченим МГС) [18]; 6 – *Sanguisorba officinalis* (GenBank Accession No EU931696.1); 7 – *Cliffortia arborea* (EU931700); 8 – *Cliffortia graminea* (EU931711); 9 – *Acaena cylindristachya* (EU931697); 10 – *Acaena latebroza* (EU931698).

Рис. 2. Порівняння первинної нуклеотидної послідовності зони субповторів в центральній частині МГС 5S рДНК представників підродино *Rosoideae* (GenBank Acc. Nos, див. таблицю)

	→	→	→	→
pRou-T1	TTGGCC	TTGGGCC	TTGGGGCTC	TTGGGCTTT
pRou-T54
<i>Rosa nitida</i>	-----
<i>Sanguisorba officinalis</i>	.A....	-----
<i>Cliffortia arborea</i>	.G....	-----
<i>Cliffortia graminea</i>	.G...G	-----
<i>Acaena cylindristachya</i>	.G....
<i>Acaena latebrosa</i>	.G....	-----G.....

ток подібності між ними (таблиця). Цей показник складав 98,3 % для МГС двох інсертів 5S рДНК *R. rugosa* та знаходився в межах 92,2–99,5 % між різними клонами *R. nitida*. Високою була також подібність між МГС обох диплоїдних видів роду *Rosa* – від 93,7 до 97,5 %. Однак гомологія між послідовностями МГС *R. rugosa* та інших представників *Rosaceae* виявилась незначною і не перевищувала 40,3 %. При цьому зонами з найвищим рівнем подібності між всіма використаними послідовностями виявились 3'-кінцева ділянка МГС, яка містить зовнішні елементи промотора РНК-полімерази III, та центральна частина, що відповідає зоні субповторів.

Як показав аналіз, структурна організація послідовностей мажорного класу 5S рДНК *R. rugosa* є аналогічною до цих генів із інших еукаріотичних організмів [10, 11, 22, 24]. Високий рівень нуклеотидної гомології кодуєчої ділянки генів 5S рРНК як усередині роду, так і в порівнянні з іншими представниками розоцвітих узгоджується з уявленнями про низьку швидкість її молекулярної еволюції [6, 14, 15, 26]. Незначна кількість мутацій в двох досліджених клонах МГС *R. rugosa* свідчить про існування процесів гомогенізації між тандемними повторами 5S рДНК [14], проте послідовність короткого інсерту клону pRou-T54, імовірно, уникла гомогенізації. Повна відсутність МГС разом з елементами промотору РНК-полімерази III, часткова елімінація кодуєчої ділянки та наявні мутації у її складі є яскравим свідченням перетворення у псевдоген. Передумовою виникнення псевдогена може бути зміна локалізації окремого повтору 5S рДНК у геномі, наслідком чого є відсутність гомогенізації із функціонально повноцінними повторами [28]. Цей процес імовірно є селективно нейтральним, оскільки послідовність псевдогена не зазнає елімінації, незважаючи на втра-

ту нею функції кодування 5S рРНК. Останнє підтверджує точку зору, що геном рослин містить більше повторів 5S рДНК, ніж необхідно для забезпечення нормального біогенезу рибосом.

Несподіваним є виявлений нами факт високої подібності послідовності МГС двох диплоїдних видів різного географічного походження – *R. rugosa* (Східна Азія) та *R. nitida* (Північна Америка). Імовірним поясненням цього може бути те, що радіація згаданих видів від спільного предка і міграція *R. nitida* до Північної Америки мала місце у порівняно недалекому геологічному минулому. В той же час *R. nitida* (та деякі інші види роду *Rosa* [17]) на відміну від *R. rugosa* містить у геномі мінорний варіант 5S рДНК, який виник за рахунок делеції частини (196 п.н.) МГС [18]. Імовірно, цей мінорний варіант втрачений з геному *R. rugosa* після дивергенції від спільного предка.

Поряд з цим низький рівень подібності між МГС *Rosa* та іншими представниками підродино *Rosoideae* вказує на високу швидкість еволюції цієї ділянки геному і значну філогенетичну відстань між трибами *Sanguisorbeae* та *Roseae* в межах підродино. Основні ділянки гомології знаходяться в дистальній та центральній частинах МГС. Існування високого рівня подібності в дистальній зоні спейсера пов'язано з розташуванням у ній зовнішніх регуляторних ділянок. Таким чином, мутації, що виникають в цій зоні, не завжди є еволюційно нейтральними і можуть зазнавати елімінації за дії стабілізуючого добору. Що стосується центральної частини МГС, то в даному випадку існування групи субповторів з високим рівнем гомології у різних видів, очевидно, потребує пошуку іншого пояснення. Імовірно, що ця послідовність виникла на ранніх етапах еволюції таксону, до радіації триб *Sanguisorbeae* та *Roseae*, що передбачає монофілетичне походження всієї підро-

дини. Проте, встановлення причин та механізмів консервації цієї ділянки потребує подальших досліджень.

Висновки. Виходячи з отриманих експериментальних даних, можна констатувати, що в геномі *R. rugosa* присутній єдиний мажорний тип функціонально активних послідовностей 5S рДНК. Кодуюча ділянка демонструє високу ідентичність в межах підродини *Rosoideae*. На відміну від цього МГС зазнав швидкої еволюції внаслідок накопичення селективно нейтральних мутацій. Висока швидкість еволюції МГС обмежує можливість його використання в дослідженнях філогенії та систематики таксонів високого рангу. Гомогенність послідовностей МГС з геному *R. rugosa*, що контролюється концертною еволюцією, відкриває перспективи використання його як молекулярного маркера для вивчення таксономії та еволюції роду *Rosa*.

Y.O. Tynkevich, R.A. Volkov

Yurii Fedkovych University of Chernivtsi, Ukraine
E-mail: ra.volkov@gmail.com

STRUCTURAL ORGANIZATION OF 5S RIBOSOMAL DNA OF *ROSA RUGOSA*

In order to clarify molecular organization of the genomic region encoding 5S rRNA in diploid species *Rosa rugosa* several 5S rDNA repeated units were cloned and sequenced. Analysis of the obtained sequences revealed that only one length variant of 5S rDNA repeated units, which contains intact promoter elements in the intergenic spacer region (IGS) and appears to be transcriptionally active is present in the genome. Additionally, a limited number of 5S rDNA pseudogenes lacking a portion of coding sequence and the complete IGS was detected. A high level of sequence similarity (from 93,7 to 97,5 %) between the IGS of major 5S rDNA variants of East Asian *R. rugosa* and North American *R. nitida* was found indicating comparatively recent divergence of these species.

Ю.О. Тынкевич, Р.А. Волков

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ 5S РИБОСОМНОЙ ДНК *ROSA RUGOSA*

С целью изучения молекулярной организации участка генома, кодирующего 5S рРНК у диплоидного вида *Rosa rugosa*, клонированы и секвенированы несколько повторяющихся единиц 5S рДНК. Анализ полученных последовательностей показал наличие в геноме единственной по длине повторяющейся еди-

ницы варианта 5S рДНК, который содержит интактные промоторные элементы в межгенном спейсере (МГС) и, вероятно, является транскрипционно активным. Обнаружено также ограниченное количество 5S рДНК-псевдогенов, у которых полностью утрачены МГС и часть кодирующего участка. Высокий уровень сходства (от 93,7 до 97,5 %), выявленный при сравнении МГС мажорных вариантов 5S рДНК восточноазиатской *R. rugosa* и североамериканской *R. nitida*, свидетельствует об относительно недавней дивергенции этих видов.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Volkov R.A., Zanke C., Panchuk I.I., Hemleben V. Molecular evolution of 5S rDNA of *Solanum* species (sect. *Petota*): application for molecular phylogeny and breeding // Theor. Appl. Genet. – 2001. – **103**. – P. 1273–1282.
2. Komarova N.Y., Grimm G.W., Hemleben V., Volkov R.A. Molecular evolution of 35S rDNA and taxonomic status of *Lycopersicon* within *Solanum* sect. *Petota* // Plant Syst. Evol. – 2008. – **276**, № 1/2. – P. 59–71.
3. Goncharov N.P., Golovnina K.A., Kondratenko E.Y. Taxonomy and molecular phylogeny of natural and artificial wheat species // Breed. Sci. – 2009. – **59**. – P. 492–498.
4. Martínez-Azorín M., Crespo M., Juan A., Fay M. Molecular phylogenetics of subfamily Ornithogaloideae (Hyacinthaceae) based on nuclear and plastid DNA regions, including a new taxonomic arrangement // Ann. Bot. – 2010. – **107**. – P. 1–37.
5. Shulaev V., Korban S., Sosinski B. et al. Multiple models for rosaceae genomics // Plant Phys. – 2008. – **147**. – P. 985–1003.
6. Volkov R.A., Panchuk I.I., Borisjuk L.G., Borisjuk M.V. Plant rDNA: Organization, evolution, and use // Cytology and Genetics. – 2003. – **37**, № 1. – P. 68–72.
7. Blattner F.R. Progress in phylogenetic analysis and a new infrageneric classification of the barley genus *Hordeum* (Poaceae: Triticeae) // Breed. Sci. – 2009. – **59**. – P. 471–480.
8. Volkov R.A., Kozeretka I.A., Kyryachenko S.S. et al. Molecular evolution and variability of ITS1–ITS2 in populations of *Deschampsia antarctica* from two regions of the maritime Antarctic // Pol. Sci. – 2010. – **4**, № 3. – P. 469–478.
9. Wisseman V. The genus *Rosa* (Rosaceae) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and atpB–rbcL intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy // Bot. J. Linn. Soc. – 2005. – **147**. – P. 275–290.
10. Grimm G.W., Denk T. The reticulate origin of modern plane trees (*Platanus*, Platanaceae): A nuclear marker puzzle // Taxon. – 2010. – **59**, № 1. – P. 134–147.

11. Poczai P., Huvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects // *Mol. Biol. Rep.* – 2010. – **37**. – P. 1897–1912.
12. Denk T., Grimm G. The oaks of western Eurasia : Traditional classifications and evidence from two nuclear markers // *Taxon.* – 2010. – **59**. – P. 351–366.
13. Cloix C., Tutois S., Mathieu O. et al. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms // *Genome Res.* – 2000. – **10**. – P. 679–690.
14. Coen E.S., Thoday J.M., Dover G. Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster* // *Nature.* – 1982. – **295**, № 5850. – P. 564–568.
15. Fulnecek J., Lim K.Y., Leitch A.R. et al. Evolution and structure of 5S rDNA loci in allotetraploid *Nicotiana tabacum* and its putative parental species // *Heredity.* – 2002. – **88**. – P. 19–25.
16. Lim K.Y., Werlemark G., Matyasek R. et al. Evolutionary implication of permanent odd polyploidy in the stable sexual, pentaploid of *Rosa canina* L. // *Heredity.* – 2005. – **94**. – P. 501–506.
17. Тинкевич Ю.О., Сербенюк М.П., Волков Р.А. Поліморфізм 5S рДНК видів роду *Rosa* L. // *Наук. Вісн. Чернів. ун-ту.* – 2009. – № 455. – С. 142–144.
18. Тинкевич Ю.О., Волков Р.А. Структурна організація 5S рибосомальної ДНК *Rosa nitida* Wild. // *Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів.* – 2011. – **9**, № 2. – С. 276–282.
19. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning.* Cold Spring Harbor. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
20. Панчук І.І., Волков Р.А. Практикум з молекулярної генетики. – Чернівці : Рута, 2007. – 120 с.
21. DNASTAR, 1998. MegAlign 3.18 edit. Software distributed by DNASTAR Inc., Madison, WI, USA.
22. Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment // *Bioinformatics.* – 1992. – **8**. – P. 189–191.
23. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A. et al. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs // *Nucl. Acids Res.* – 1997. – **25**. – P. 3389–3402.
24. Singh D., Ahuja P.S. 5S rDNA gene diversity in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) and its use for variety identification // *Genome.* – 2006. – **49**. – P. 91–96.
25. Cherevatov O.V., Volkov R.A. Organization of 5S ribosomal DNA of *Melitaea trivia* // *Cytology and Genetics.* – 2011. – **45**, № 2. – P. 115–120.
26. Douet J., Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis* // *Heredity.* – 2007. – **99**. – P. 5–13.
27. Suzuki H., Moriwaki K., Sakura S. Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs // *Mol. Biol. Evol.* – 1994. – **11**. – P. 704–710.
28. Takahata N., Kimura M. A model of evolutionary base substitutions and its application with special reference to rapid change of pseudogenes // *Genetics.* – 1981. – **98**. – P. 641–657.

Надійшла 19.11.12