УДК 577.113.5 + 582.657.2 https://doi.org/10.31861/biosystems2026.02.349

ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ПОЛІМОРФІЗМ ПОВТОРІВ 5S рДНК У ІНВАЗІЙНИХ ВИДІВ РОДУ *REYNOUTRIA*

Д.В. ЯКОБИШЕН, Ю.О. ТИНКЕВИЧ

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58022, Україна
y.tynkevich@chnu.edu.ua

Reynoutria japonica Houtt., R. sachalinensis (F. Schmidt) Nakai та гібрид між ними R. × bohemica Chrtek & Chrtkova належать до найбільш агресивних інвазійних рослин Європи. Поєднання поліплоїдії, міжвидової гібридизації та клонального розмноження робить рід Reynoutria привабливою моделлю для дослідження еволюції геномів, а надійна ідентифікація батьківських видів і гібридів має важливе практичне значення у природоохоронній діяльності. Перспективним маркером таких цілей є міжгенний спейсер (IGS) 5S рДНК, проте організація та поліморфізм цих ділянок геному у представників роду Reynoutria досі не досліджувались.

Метою цієї роботи було охарактеризувати молекулярну організацію та внутрішньогеномний поліморфізм 5S рДНК R. japonica та R. sachalinensis з території України. Ділянку IGS 5S рДНК ампліфікували за допомогою ПЛР та секвенували методом Illumina. Для основних риботипів провели філогенетичний аналіз, оцінили їх представленість у геномах обох видів та проаналізували регуляторні елементи в IGS.

В обох видів виявлено високий рівень внутрішньогеномного поліморфізму 5S рДНК. Мінливість IGS зумовлена майже виключно нуклеотидними замінами: з 85 варіабельних сайтів 65 є парсимоній-інформативними, тоді як кількість інделів низька. Передбачуваний термінатор транскрипції та зовнішні елементи промотора загалом консервативні. На філогенетичному дереві 29 основних риботипів утворюють три кластери, лише один з яких є спільним для обох видів, тоді як два інші характерні для R. japonica або R. sachalinensis. Такі відмінності можуть бути наслідком швидкої еволюції масивів 5S рДНК після дивергенції цих видів. Видоспецифічні кластери риботипів можуть бути використані для ідентифікації R. japonica, R. sachalinensis та їх гібридів. Виявлена присутність окремих риботипів R. japonica в геномі R. sachalinensis може вказувати на інтрогресивну гібридизацію між цими видами.

Ключові слова: біологічне різноманіття, інвазійні види, генетичний баркодинг, 5S рДНК

Вступ. Рід *Reynoutria* Houtt. (Polygonaceae) походить зі Східної Азії, а два його представники, *R. japonica* Houtt. та *R. sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai, були завезені до Європи у XIX ст. як декоративні рослини (Stafiniak et al., 2025). Сьогодні ці види та гібрид між ними, *R.* × *bohemica* Chrtek & Chrtkova, належать до найбільш агресивних інвазійних рослин Європи, Північної Америки, Австралії та Нової Зеландії, а *R. japonica* внесено до переліку 100 найнебезпечніших інвазійних видів світу (Bzdega et al., 2016; Wang et al., 2025). Утворюючи густі монодомінантні зарості, рослини роду *Reynoutria* пригнічують ріст аборигенних видів, змінюють структуру рослинних угруповань та пошкоджують будівлі й інфраструктуру (Budzhak et al., 2026; D'Hertefeldt et al., 2026).

Поза межами природного ареалу *R. japonica* представлена переважно октаплоїдними (2n=8x=88) рослинами, *R. sachalinensis* – тетраплоїдними (2n=4x=44) та гексаплоїдними (2n=6x=66) формами, а *R.* × *bohemica* - здебільшо гексаплоїдними (2n=6x=66) (Mandak et al., 2003; Mereda et al., 2023). Всі три види розмножуються переважно вегетативно, фрагментами кореневищ і стебел, причому гібриди часто мають вищу регенераційну здатність, ніж батьківські види (Pysek et al., 2003). Вважається, що *R. japonica* в Європі представлена єдиним чоловічостерильним генотипом, натомість *R. sachalinensis* і *R.* × *bohemica* характеризуються вищим генетичним різноманіттям у вторинному ареалі (Hollingsworth and Bailey, 2000; Gaskin et al., 2014; Stafiniak et al., 2025). В Україні зафіксовано всі три таксони, причому *R.* × *bohemica* поширюється активніше, ніж батьківські види (Shevera, 2017; Budzhak et al., 2026).

Попри переважання вегетативного розмноження, важливу роль в еволюції інвазійних популяцій рейнутрії відіграє статевий процес. Чоловічостерильні рослини *R. japonica* утворюють насіння внаслідок запліднення пилком *R. sachalinensis*, *R.* × *bohemica*, а також близькоспорідненої *Fallopia baldschuanica* (Regel) Holub. В останньому випадку утворюється міжродовий гібрид *F.* × *conollyana* J.P. Bailey (Bailey, 2001; Bailey et al., 2009). Схрещування гібридів між собою та з батьківськими видами

призводить до появи беккросів і гібридів наступних поколінь (Bailey, 2013; Bzdega et al., 2016).

Поєднання поліплоїдії, міжвидової гібридизації та клонального розмноження робить рід *Reynoutria* привабливою моделлю для дослідження еволюції геномів. Нещодавно отримана хромосомна збірка геному *R. japonica* показала, що цей вид є змішаним авто-/алооктаплоїдом із геномною формулою AAAABBBB, тоді як формула *R. sachalinensis* має вигляд AABB, а *R.* × *bohemica* – AAABBB (Wang et al., 2025).

Гібридизація та поліплоїдія часто супроводжуються масштабними геномними перебудовами, особливо на рівні повторюваної частини геному - ріпітому (Soares et al., 2026). Одним із важливих компонентів ріпітому є повторювані одиниці рибосомних генів: 35S та 5S рДНК. Дослідження останніх років показали особливо динамічну природу 5S рДНК (Volkov et al., 2017; Tynkevich et al., 2022; Ding et al., 2022). Гени 5S рРНК кодують один із компонентів великої субодиниці рибосоми, транскрибуються РНК-полімеразою III і в геномах рослин організовані у кластери тандемних повторюваних одиниць (повторів). Кожен повтор складається з кодувальної ділянки (coding sequence – CDS) та міжгенного спейсера (intergenic spacer – IGS) (Tynkevich et al., 2020; Hemleben et al., 2021). Кількість повторів 5S рДНК у геномах покритонасінних варіює від десятків до десятків і сотень тисяч (Stepanenko et al., 2026; Vitales et al., 2026). Кластери 5S рДНК зазвичай розташовані в одному-двох хромосомних локусах гаплоїдного набору (Stepanenko et al., 2026). У поліплоїдів кількість локусів часто менша за теоретично очікувану, що пояснюють втратою рибосомних повторів одного із субгеномів у ході диплоїдизації (Volkov et al., 2017; Gonzalez et al., 2026). У зразків трьох видів *Reynoutria* сигнали 5S рДНК було виявлено методом FISH на 10 хромосомах октаплоїдної *R. japonica*, 7 хромосомах гексаплоїдної *R. sachalinensis* і лише на 4 хромосомах гексаплоїдного гібрида *R.* × *bohemica*, у якого були відсутні мінорні термінальні сигнали, характерні для *R. japonica* (Bzdega et al., 2016).

Тривалий час вважалося, що повтори 5S рДНК еволюціонують концертно (узгоджено), тобто нові мутації або поширюються на всі копії, або елімінуються, що забезпечує високу подібність повторів у межах геному (Elder and Turner, 1995). Проте, з розповсюдженням повногеномного секвенування, в багатьох групах виявлено значний внутрішньогеномний поліморфізм ділянки IGS 5S рДНК (Tynkevich et al., 2022; Tynkevich et al., 2023b), який визначається співвідношенням внесків гомогенізації, мутаційного процесу, геномних перебудов та добору, та суттєво різниться між таксонами (Wang et al., 2023). У гібридів і алополіплоїдів батьківські варіанти 5S рДНК можуть зберігатися (Garcia et al., 2020), зазнавати уніпарентального сайленсингу (Mandakova et al., 2024) або втрачатися разом з цілими локусами в ході диплоїдизації (Volkov et al., 2017; Gonzalez et al., 2026).

Завдяки високій варіабельності, IGS 5S рДНК є перспективним маркером для ідентифікації батьківських видів і гібридів роду *Reynoutria*, а поліплоїдні геноми цих рослин з гомеологічними субгеномами – зручною моделлю для дослідження еволюції 5S рДНК. Проте, молекулярна організація та внутрішньогеномний поліморфізм повторів 5S рДНК представників цього роду досі не досліджувались. У цій роботі ми використали Illumina секвенування ампліконів IGS 5S рДНК для ідентифікації та характеристики риботипів *R. japonica* та *R. sachalinensis*. Ми провели філогенетичний аналіз виявлених риботипів, оцінили їх представленість у геномах обох видів та проаналізували зовнішні елементи промотора в IGS для оцінки можливості використання цієї ділянки геному у дослідженні генетичного поліморфізму та гібридизації інвазійних рослин роду *Reynoutria*.

Матеріали та методи. *Рослинний матеріал та виділення ДНК***.** Зразки рослин *Reynoutria* з Чернівецької і Тернопільської областей України були відібрані з гербарію Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича (CHER) та надані науковцями Кременецького ботанічного саду (табл. 1). Таксономічна приналежність зразків була визначена за морфологічними критеріями. Геномну ДНК виділяли з гербарних зразків цетавлоновим методом (Porebski et al., 1997).

*Ампліфікація та секвенування***.** Ділянку IGS 5S рДНК ампліфікували за допомогою праймерів, комплементарних до центральної частини CDS 5S рДНК. Застосовували дві пари праймерів, які відрізнялись внутрішніми інлайн-баркодами на 5’-кінці. Для ампліфікації застосовували 5× полімеразну суміш FIREPol Master Mix (Solis BioDyne) згідно рекомендацій виробника. Температура гібридизації для обох комбінацій праймерів складала 61 °C. Кількість ДНК на 20 мкл реакційної суміші становила 10–20 нг.

Якість та концентрацію ПЛР-продуктів визначали методом електрофоретичного розділення у 2% агарозному гелі, після чого

змішували в еквімолярній концентрації. Змішаний амплікон очищали екстракцією з 2% агарозного геля за допомогою набору Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Секвенування ампліконів здійснювали на платформі MiSeq Illumina з використанням сервісу Amplicon-EZ (GENEWIZ).

Таблиця 1.

Проаналізовані в роботі зразки Reynoutria

Table 1.

Reynoutria samples analyzed in this study

Назва зразку	Походження зразку	Кількість рідів
Rey-31	м. Кременець, Кременецький р-он, Тернопільська обл.	1793
Rey-104	с. Грозинці, Хотинський р-он, Чернівецька обл.	2382

Обробка результатів секвенування. Контроль якості отриманих в результаті секвенування парних Illumina рідів проводили з використанням програми fastp 0.23.4 (Chen et al., 2018). Контроль, який включав трімінг адаптерів, видалення коротких рідів та трімінг рідів за якістю, проводився за порівняно жорстких параметрів: -l 200, -cut_tail, -cut_front, cut_tail_window_size 1, cut_tail_mean_quality 30. Парні ріди об'єднували за перекриттям. За допомогою програми SeqKit 0.15.0 (Shen et al., 2016) «чисті» ріди були переведені у формат FASTA та сортовані за послідовностями праймерів на два fasta файли відповідно до секвенованих зразків (табл. 1).

Аналіз риботипів. Всі унікальні послідовності дереплікували за допомогою програми vsearch (Rognes et al., 2016) з автоматичним підрахунком їх частоти (--derep_fulllength, --sizeout). Для аналізу були відібрані найбільш багаточисельні риботипи, які повторювались не менше 9 разів в об'єднаній вибірці рідів обох зразків. Далі всі прочитані послідовності картували на отриману базу риботипів з використанням vsearch (--usearch_global, --id 1.0) для визначення їх приналежності. Відсоткове співвідношення риботипів у кожному зразку розраховували як частку рідів, що відповідають певному риботипу, від загальної кількості успішно картованих рідів. Обробку результатів картування та розрахунок відсотків проводили за допомогою власного Python скрипту з використанням бібліотек pandas та collections.

*Множинне вирівнювання та філогенетичний аналіз***.** Послідовності риботипів вирівнювали в програмі MAFFT методом G-INS-i (Katoh & Standley, 2013). Кількість варіабельних та парсимоній-інформативних сайтів визначали в програмі MEGA11 (Tamura et al., 2021). Середня попарна подібність між послідовностями була розрахована з використанням програми Geneious Prime 2026.0.1. Філогенетичні дерева будували методом Maximum likelihood у програмі IQ-TREE v2 (Minh et al., 2020) із автоматичним підбором оптимальної моделі нуклеотидних замін за допомогою інструменту ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Підтримку вузлів на дереві методом bootstrap визначали за 1000 реплікацій. Отримане філогенетичне дерево візуалізували в iTOL (Letunic & Bork, 2024).

Результати та їх обговорення. *Секвенування ампліконів та внутрішньогеномний поліморфізм 5S рДНК.* Ділянку IGS 5S рДНК зразків *R. japonica* (Rey-31) та *R. sachalinensis* (Rey-104) було ампліфіковано та секвеновано методом Illumina. Загалом було отримано 4175 послідовностей: 1793 для Rey-31 та 2382 для Rey-104, які містили повну ділянку IGS, фланковану фрагментами CDS.

Дереплікація об'єднаної вибірки рідів виявила високий рівень внутрішньогеномного поліморфізму 5S рДНК в обох досліджених зразках. Загалом було ідентифіковано 198 риботипів, кожен із яких був представлений щонайменше двома ідентичними рідами. При цьому на них припадало лише 24,0% рідів Rey-31 та 27,8% рідів Rey-104. Решту становили унікальні ріди, тобто такі, які зустрічались лише один раз. Важливо, що 90% цих унікальних послідовностей відрізнялися від реконструйованих риботипів лише однією нуклеотидною заміною.

Виявлену гетерогенність навряд чи можна пояснити лише помилками секвенування, з огляду на високу точність отриманих даних та застосовані процедури їх обробки. Зокрема, частка нуклеотидів із показником якісті Q30 і вище у вихідних («сирих») рідах становила 96,8%. Під час тримінгу застосовували жорсткі параметри фільтрації, а парні ріди об'єднували за ділянками перекриття із використанням корекції якості нуклеотидів. Додатковим аргументом є результати іншого дослідження, у якому за аналогічного протоколу Illumina-секвенування ампліконів низькокопійного гена *LEAFY* у зразків

R. sachalinensis, зокрема Rey-104, частка унікальних рідів становила лише близько 13% (Yakobyshen et al., 2025). Отже, значно вища частка унікальних послідовностей у випадку 5S рДНК навряд чи є наслідком лише технічних похибок і, найімовірніше, відображає реальну внутрішньогеномну гетерогенність повторів 5S рДНК.

Для подальшого аналізу ми відібрали 29 основних риботипів (R1–R29), кожен з яких був представлений щонайменше 9 рідами (рис. 1A). Із 29 основних риботипів 14 виявлено лише в геномі *R. sachalinensis*, вісім – лише в геномі *R. japonica*, а сім є спільними для обох видів (рис. 1A, C).

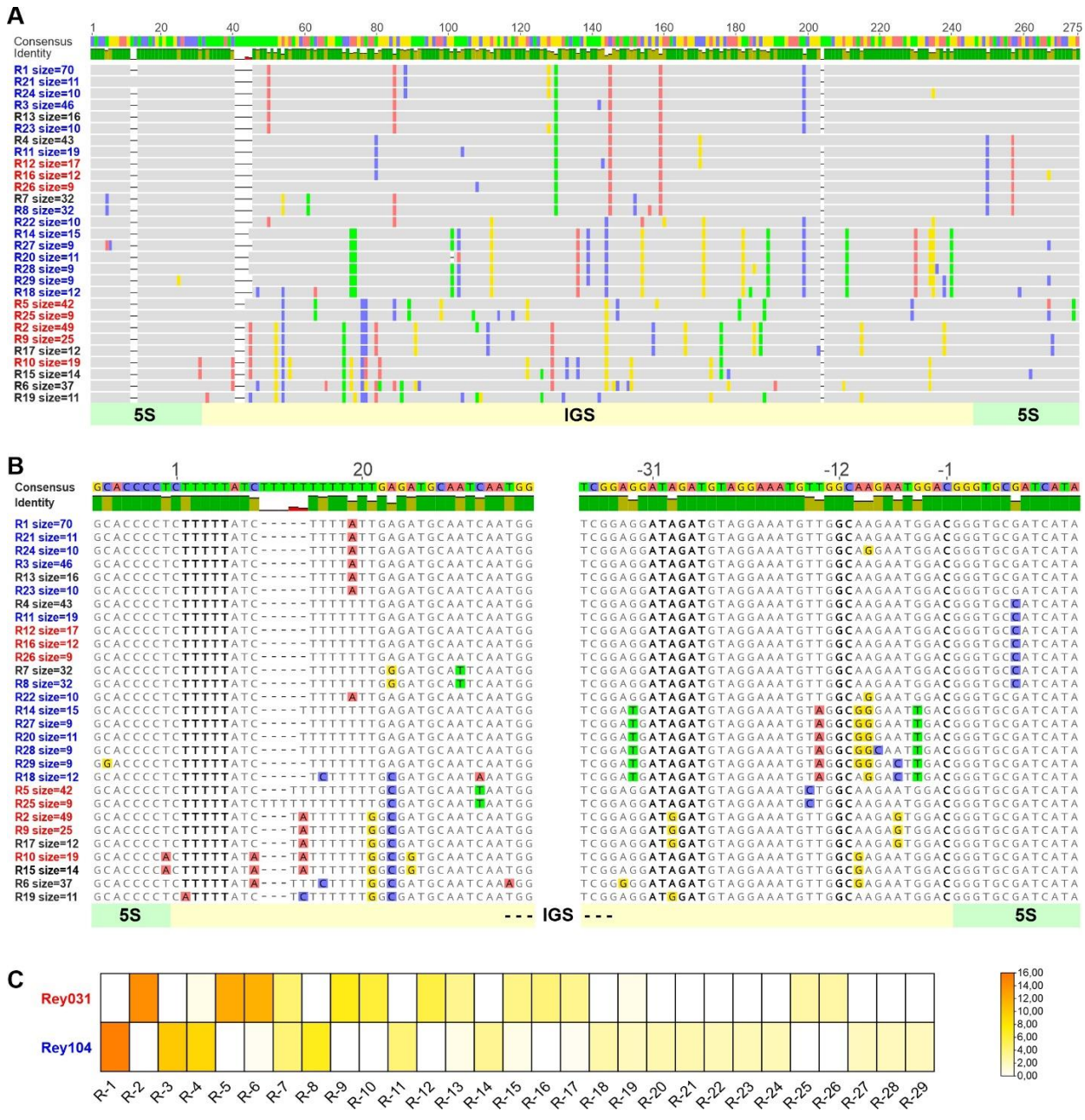


Рис. 1. Поліморфізм риботипів ділянки 5S рДНК зразків роду Reynoutria. A – схема вирівнювання основних риботипів; B – вирівнювання 5′ та 3′ - кінцевих фрагментів IGS, жирним шрифтом виділені потенційні регуляторні мотиви транскрипції; C – теплова карта, що представляє відсоткове співвідношення основних риботипів у досліджуваних зразках, після назви риботипу вказана кількість рідів, які йому відповідають (size).

Fig. 1. Polymorphism of 5S rDNA ribotypes in samples of the genus Reynoutria. A – alignment scheme of the major ribotypes; B – alignment of the 5'- and 3'-terminal IGS fragments, with potential transcription regulatory motifs highlighted in bold; C – heatmap showing the percentage distribution of the major ribotypes in the analyzed samples, following the ribotype name, the number of corresponding reads is indicated (size).

Молекулярна організація повторів 5S рДНК. Вирівнювання послідовностей основних риботипів мало довжину 275 нп, з яких 212 нп припадає на IGS, а 63 нп – на фланкуючі фрагменти CDS (рис. 1A). Довжина IGS у різних риботипів становить від 206 до 211 нп. У фрагментах CDS виявлено 11 варіабельних сайтів, сім з яких є парсимоній-інформативними. Зокрема, дві спільні заміни в 5′-ділянці CDS відрізняють риботипи R4, R7, R8, R11, R12, R16 та R26 від решти послідовностей (рис. 1A, B), а в CDS риботипу R21 наявна двонуклеотидна інсерція (рис. 1A). Така кількість мутацій є відносно високою для консервативної кодувальної ділянки. Тому не виключено, що частина повторів 5S рДНК *Reynoutria* є псевдогенами, як це було показано для роду *Goniolimon* (Tynkevich et al., 2023b).

В IGS виявлено 85 варіабельних сайтів, з яких 65 є парсимоній-інформативними. Висока частка парсимоній-інформативних сайтів (76%) свідчить про те, що більшість замін є спільними для груп риботипів, тобто риботипи утворюють кілька дивергованих класів. Для порівняння, в IGS 5S рДНК видів роду *Tulipa* частка таких сайтів становила лише 56% (Tynkevich et al., 2023a). Натомість кількість інделів в IGS *Reynoutria* є порівняно низькою. Загалом, в основних риботипах виявлено лише три індели в IGS, та єдину інсерцію в CDS у риботипі R21. Отже, мінливість IGS 5S рДНК *Reynoutria* зумовлена майже виключно нуклеотидними замінами, тоді як для багатьох інших груп Покритонасінних характерні численні індели, які призводять до значних відмінностей за довжиною IGS (Tynkevich et al., 2022b; Tynkevich et al., 2023b; Liu et al., 2025).

Середня попарна подібність основних риботипів становить 91,1%, а всіх 198 риботипів – 91,6%. Для риботипів, специфічних для *R. sachalinensis* та *R. japonica,* цей показник становить, відповідно, 93,4% та 91,8%. Отже, рівень внутрішньогеномної мінливості 5S рДНК у видів роду *Reynoutria* не значно відрізняється від мінливості між видами.

Регуляторні елементи транскрипції 5S рДНК у IGS. На початку IGS, у позиціях 2-6 нп від 3′-кінця CDS, у 28 з 29 риботипів розташована п’ятинуклеотидна оліго-Т послідовність (рис. 1B), яка імовірно виконує роль термінатора транскрипції 5S рРНК (Ciganda and Williams, 2011). Лише у риботипу R19, внаслідок трансверсії T→A, ця послідовність скорочена до чотирьох Т. На відстані трьох нуклеотидів від першої оліго-Т послідовності розташована друга, кількість тимідинів в якій варіює від 4 до 12. Подібна організація термінаторної ділянки описана для представників родів *Quercus, Tulipa* та *Gentiana* (Tynkevich and Volkov, 2019; Tynkevich et al., 2023a; Mel’nyk et al., 2026). Раніше ми припускали, що друга оліго-Т послідовність може відігравати роль «запасного» термінатора транскрипції (Tynkevich and Volkov, 2019; Tynkevich et al., 2023a).

На 3′-кінці IGS у всіх риботипів присутні цитозин у позиції -1 та GC-динуклеотид у позиції -12, які є елементами зовнішнього промотору у 5S рДНК *Arabidopsis thaliana* (Cloix et al., 2003; Douet and Tourmente, 2007). Проте, у позиції -31 замість канонічного TATA-боксу у більшості риботипів розташований AT-багатий мотив ATAGAT, а у риботипів R2, R9, R17 та R19 внаслідок транзиції A→G у позиції -29 цей мотив набуває вигляду ATGGAT (рис. 1B). Привертає увагу, що до цієї групи належить найбільш представлений у геномі *R. japonica* риботип R2 (рис. 1C). Вплив цієї заміни на ефективність транскрипції потребує подальшого дослідження. Отже, зовнішній промотор 5S рДНК *Reynoutria* загалом подібний до описаного для арабідопсиса.

Філогенетичний аналіз риботипів. На невкоріненому ML-дереві риботипи 5S рДНК групуються у три кластери – A, B та C (рис. 2). Кластери A і B мають високу статистичну підтримку, тоді як підтримка кластера C є нижчою. Кластер A об’єднує п’ять специфічних для *R. japonica* (R2, R5, R9, R10, R25) та чотири спільні для обох видів (R6, R15, R17, R19) риботипи. Кластер B утворений виключно специфічними для *R. sachalinensis* риботипами (R14, R18, R20, R22, R27–R29). Кластер C містить риботипи обох видів і розпадається на дві групи: першу утворюють риботипи R4, R7, R8, R11, R12, R16 і R26 зі спільними замінами в CDS, а до другої належать найбільш представлені у *R. sachalinensis* риботипи R1 і R3.

Таким чином, кластер A характерний переважно для риботипів *R. japonica*, а кластер B – виключно для риботипів *R. sachalinensis,* тоді як кластер C є спільним для послідовностей 5S рДНК обох видів. Такий результат є дещо несподіваним з огляду на запропонований на основі геномних досліджень сценарій виникнення октаплоїдної *R. japonica* внаслідок дуплікації геному тетраплоїдної *R. sachalinensis* (Wang et al., 2025), за якого можна було б очікувати подібного набору класів 5S рДНК в обох видів. Відмінності між видами можуть бути наслідком швидкої еволюції масивів 5S рДНК після їх дивергенції, зокрема ампліфікації одних варіантів повторів та елімінації інших відповідно до моделі «народження і смерті» (Nei and Rooney, 2005). На

користь цього свідчать і відмінності в організації локусів 5S рДНК: у *R. japonica*, на відміну від *R. sachalinensis*, виявлено мінорні термінальні FISH-сигнали 5S рДНК (Bzdega et al., 2016).

Аналіз відносного вмісту риботипів (рис. 1C) показав, що у геномі *R. japonica* близько 73% рідів основних риботипів належать до кластера A, а решта – до кластера C, причому майже половину всіх рідів основних риботипів становлять R2, R5 і R6. Натомість у геномі *R. sachalinensis* переважають риботипи кластера C (близько 70%), зокрема R1, R3 і R4, тоді як на специфічний кластер B припадає близько 20%. У *R. sachalinensis* виявлено лише чотири риботипи кластера A, причому R6, R15 і R17 – у незначній кількості, тоді як вміст R19 у Rey-104 навіть вищий, ніж у Rey-31. Раніше у геномі цього ж зразка *R. sachalinensis* була виявлена незначна домішка характерних для *R. japonica* варіантів ITS1-2, що може бути наслідком інтрогресивної гібридизації (Tynkevich et al., 2024). Отримані нові дані узгоджуються з таким припущенням, проте з огляду на невелику кількість відповідних рідів воно потребує перевірки на більшій вибірці зразків.

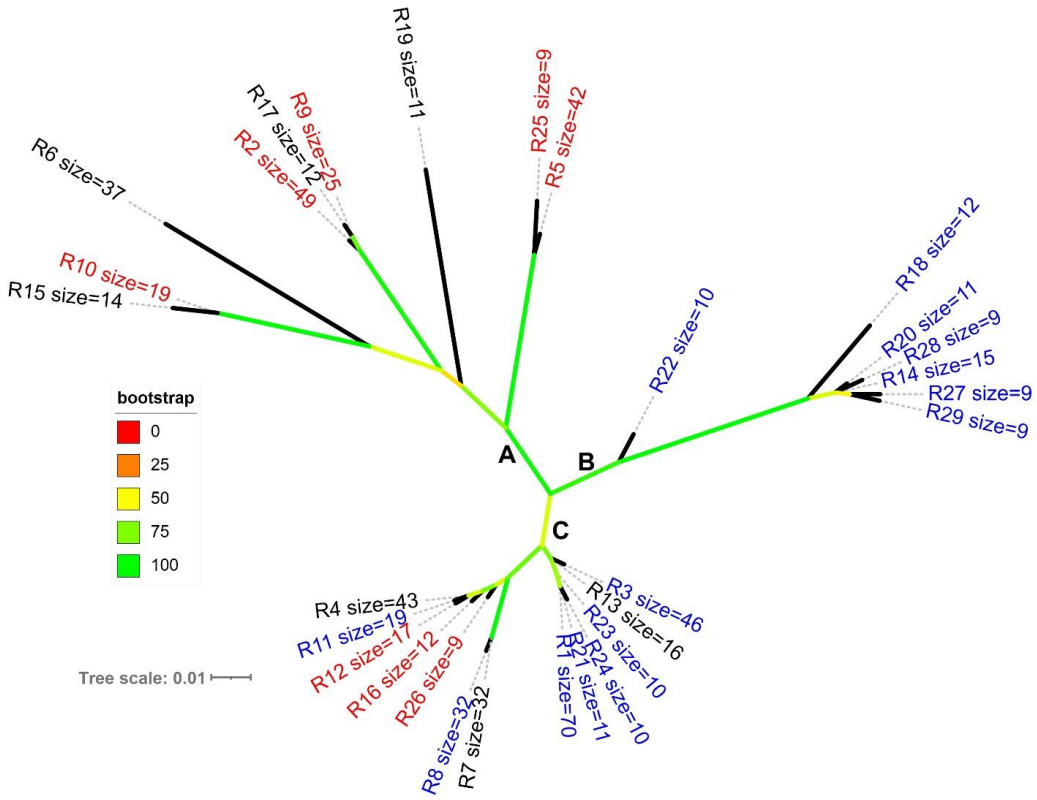


Рис. 2. Maximum likelihood невкорінене філогенетичне дерево основних риботипів ділянки IGS 5S рДНК

Fig. 2. Maximum-likelihood unrooted phylogenetic tree of the major 5S rDNA IGS ribotypes

Отже, кластери риботипів A і B можуть бути використані як маркери для ідентифікації *R. japonica, R. sachalinensis* та їх гібридів, у геномах яких слід очікувати присутності риботипів обох кластерів. Оскільки окремі риботипи одного виду можуть у малій кількості траплятися в геномі іншого, для ідентифікації гібридних форм важливо оцінювати не лише наявність, але й відносний вміст видоспецифічних риботипів.

Висновки. Ампліконне Illumina-секвенування показало високий рівень внутрішньогеномного поліморфізму 5S рДНК в зразках інвазійних видів *R. japonica* та *R. sachalinensis*. Філогенетичний аналіз виявив три основні клади, дві з яких є видоспецифічними, тоді як третя - спільна для обох видів. Наявність значної кількості нуклеотидних замін, більшість з яких є парсимоній-інформативними, робить IGS 5S рДНК перспективним молекулярним маркером для філогенії та баркодингу інвазійних представників роду *Reynoutria*.

Конфлікт інтересів: *Автори заявляють, що дослідження проводилося за відсутності будь-яких комерційних або фінансових відносин, які можна було б витлумачити як потенційний конфлікт інтересів.*

Фінансування: *дослідження проводились за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (грант № 0124U000591).*

Подяки. *Автори висловлюють щиру подяку професору Роману Волкову за участь в обговоренні отриманих результатів, а також професору Іллі Чорнею і Ліані Онук за наданий рослинний матеріал.*

Список літератури / References:

1. Bailey, J. P. (2001). *Fallopia* × *conollyana*: The railway-yard knotweed. *Watsonia*, *23*, 539–541.
2. Bailey, J. P. (2013). The Japanese knotweed invasion viewed as a vast unintentional hybridisation experiment. *Heredity*, *110*(2), 105–110. https://doi.org/10.1038/hdy.2012.98
3. Bailey, J. P., Bímová, K., & Mandák, B. (2009). Asexual spread versus sexual reproduction and evolution in Japanese knotweed s.l. sets the stage for the "Battle of the Clones". *Biological Invasions*, *11*(5), 1189–1203. https://doi.org/10.1007/s10530-008-9381-4
4. Budzhak, V. V., Shevera, M. V., Budzhak, T. V., Shelyfist, A. Y., & Volkov, R. A. (2026). *Reynoutria* × *bohemica* (Polygonaceae): Modeling potential changes in its secondary range in Ukraine. *Environmental & Socio-economic Studies*, *14*(3), 66–77. https://doi.org/10.2478/environ-2026-0020
5. Bzdęga, K., Janiak, A., Książczyk, T., Lewandowska, A., Gancarek, M., Sliwinska, E., & Tokarska-Guzik, B. (2016). A survey of genetic variation and genome evolution within the invasive *Fallopia* complex. *PLOS ONE*, *11*(8), e0161854. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161854
6. Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, *34*(17), i884–i890. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560
7. Ciganda, M., & Williams, N. (2011). Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *2*(4), 523–533. https://doi.org/10.1002/wrna.74
8. Cloix, C., Yukawa, Y., Tutois, S., Sugiura, M., & Tourmente, S. (2003). In vitro analysis of the sequences required for transcription of the *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA genes. *The Plant Journal*, *35*(2), 251–261. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01793.x
9. D'Hertefeldt, T., Andersson, A., Andersson, E., Nerer, B., West, M., & Zimmerman, A. (2026). Sexual reproduction in invasive Japanese knotweed (*Reynoutria japonica*) in south Sweden. *Nordic Journal of Botany*, *2026*, e05040. https://doi.org/10.1002/njb.05040
10. Ding, Q., Li, R., Ren, X., Chan, L. Y., Ho, V. W. S., Xie, D., Ye, P., & Zhao, Z. (2022). Genomic architecture of 5S rDNA cluster and its variations within and between species. *BMC Genomics*, *23*(1), 238. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08476-x
11. Douet, J., & Tourmente, S. (2007). Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity*, *99*(1), 5–13. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800964
12. Elder, J. F., Jr., & Turner, B. J. (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*, *70*(3), 297–320. https://doi.org/10.1086/419073
13. Garcia, S., Wendel, J. F., Borowska-Zuchowska, N., Aïnouche, M., Kuderova, A., & Kovarik, A. (2020). The utility of graph clustering of 5S ribosomal DNA homoeologs in plant allopolyploids, homoploid hybrids, and cryptic introgressants. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 41. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00041
14. Gaskin, J. F., Schwarzländer, M., Grevstad, F. S., Haverhals, M. A., Bourchier, R. S., & Miller, T. W. (2014). Extreme differences in population structure and genetic diversity for three invasive congeners: Knotweeds in western North America. *Biological Invasions*, *16*(10), 2127–2136. https://doi.org/10.1007/s10530-014-0652-y
15. González, G. E., Fourastié, M. F., Linares Gonzáles, J., & Poggio, L. (2026). Evolutionary dynamic of rDNA during diploidization in allopolyploid *Zea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *211*(4), 588–595. https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaf072
16. Hemleben, V., Grierson, D., Borisjuk, N., Volkov, R. A., & Kovarik, A. (2021). Personal perspectives on plant ribosomal RNA genes research: From precursor-rRNA to molecular evolution. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 797348. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.797348
17. Hollingsworth, M. L., & Bailey, J. P. (2000). Evidence for massive clonal growth in the invasive weed *Fallopia japonica* (Japanese knotweed). *Botanical Journal of the Linnean Society*, *133*(4), 463–472. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2000.tb01589.x
18. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., & Jermiin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, *14*(6), 587–589. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285
19. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772–780. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010
20. Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, *52*(W1), W78–W82. https://doi.org/10.1093/nar/gkae268
21. Liu, J., Lin, J., Li, X., Deng, Z., & Huang, Y. (2025). Divergent landscapes and evolutionary trajectories of 5S rDNA and Cassandra retroelement in Saccharinae. *BMC Plant Biology*, *25*, 1233. https://doi.org/10.1186/s12870-025-07279-y
22. Mandák, B., Pyšek, P., Lysák, M., Suda, J., Krahulcová, A., & Bímová, K. (2003). Variation in DNA-ploidy levels of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic. *Annals of Botany*, *92*(2), 265–272. https://doi.org/10.1093/aob/mcg141

23. Mandáková, T., Krumpolcová, A., Matyášek, R., Volkov, R., Lysák, M. A., & Kovařík, A. (2024). Uniparental silencing of 5S rRNA genes in plant allopolyploids – insights from *Cardamine* (Brassicaceae). *The Plant Journal*, *119*(3), 1313–1326. https://doi.org/10.1111/tpj.16850
24. Mel'nyk, V. M., Andreev, I. O., & Kunakh, V. A. (2026). Genetic diversity of *Gentiana* sect. *Cruciata* (Gentianaceae) species inferred from intergenic spacer of 5S rRNA gene sequences. *Botanical Journal of the Linnean Society*. Advance online publication. https://doi.org/10.1093/botlinnean/boag068
25. Mereďa, P., Jr., Mártonfiová, L., Skokanová, K., Španiel, S., & Hodálová, I. (2023). Cytogeography of invasive knotweeds (*Fallopia* sect. *Reynoutria*) in central Europe: Rare aneuploids and evidence for a climatically determined distribution. *Preslia*, *95*, 241–266. https://doi.org/10.23855/preslia.2023.241
26. Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(5), 1530–1534. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015
27. Nei, M., & Rooney, A. P. (2005). Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annual Review of Genetics*, *39*, 121–152. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.112240
28. Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, *15*(1), 8–15. https://doi.org/10.1007/BF02772108
29. Pyšek, P., Brock, J. H., Bímová, K., Mandák, B., Jarošík, V., Koukolíková, I., Pergl, J., & Štěpánek, J. (2003). Vegetative regeneration in invasive *Reynoutria* (Polygonaceae) taxa: The determinant of invasibility at the genotype level. *American Journal of Botany*, *90*(10), 1487–1495. https://doi.org/10.3732/ajb.90.10.1487
30. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., & Mahé, F. (2016). VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, *4*, e2584. https://doi.org/10.7717/peerj.2584
31. Shen, W., Le, S., Li, Y., & Hu, F. (2016). SeqKit: A cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PLOS ONE*, *11*(10), e0163962. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962
32. Shevera, M. V. (2017). *Reynoutria* × *bohemica* (Polygonaceae), a potentially invasive species of the Ukrainian flora [In Ukrainian]. *Ukrainian Botanical Journal*, *74*(6), 548–555. https://doi.org/10.15407/ukrbotj74.06.548
33. Soares, N. R., da Costa, Z. P., Cauz-Santos, L. A., Carneiro, M. S., & Vieira, M. L. C. (2026). The repeatome landscape in the "*Saccharum* complex". *Frontiers in Plant Science*, *17*, 1809735. https://doi.org/10.3389/fpls.2026.1809735
34. Stafiniak, M., Bielecka, M., Kujawa, K., Jezierska-Domaradzka, A., Pencakowski, B., Basiak, A., Matkowski, A., & Nawrot-Hadzik, I. (2025). Integrative morphological, phytochemical, and molecular identification of three invasive and medicinal *Reynoutria* species. *Scientific Reports*, *15*, 6001. https://doi.org/10.1038/s41598-025-90494-2
35. Stepanenko, A., Schubert, V., Chen, G., Kishchenko, O., Michael, T. P., Lam, E., Hrmova, M., Schubert, I., & Borisjuk, N. (2026). Genome sequence assembly of the 5S rDNA loci informs haplotype specificity and evolution in the greater duckweed *Spirodela polyrhiza*. *Communications Biology*. Advance online publication. https://doi.org/10.1038/s42003-026-09598-8
36. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022–3027. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120
37. Tynkevich, Y. O., Bushyla, K. D., & Volkov, R. A. (2020). Organization of the 5S rDNA intergenic spacer of *Quercus rubra* L. and its relationship to the Ukrainian *Quercus* species [In Ukrainian]. *Factors in Experimental Evolution of Organisms*, *26*, 125–131. https://doi.org/10.7124/FEEO.v26.1254
38. Tynkevich, Y. O., Roshka, N. M., Timkanych, E. E., Moysiyenko, I. I., & Volkov, R. A. (2023a). The use of the 5S rDNA IGS region for DNA barcoding and molecular taxonomy of two Ukrainian species of the genus *Tulipa* L. [In Ukrainian]. *The Bulletin of Ukrainian Society of Geneticists and Breeders*, *21*(1–2), 6–14. https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.21.1-2.1596
39. Tynkevich, Y. O., Shelyfist, A. Y., Kozub, L. V., Hemleben, V., Panchuk, I. I., & Volkov, R. A. (2022). 5S ribosomal DNA of genus *Solanum*: Molecular organization, evolution, and taxonomy. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 852406. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.852406
40. Tynkevich, Y. O., Valin, M. O., Moysiyenko, I. I., Panchuk, I. I., & Volkov, R. A. (2023b). 5S ribosomal DNA in the family Plumbaginaceae. *Cytology and Genetics*, *57*(6), 524–537. https://doi.org/10.3103/S0095452723060099
41. Tynkevich, Y. O., & Volkov, R. A. (2019). 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: Molecular organization and taxonomic application. *Cytology and Genetics*, *53*(6), 459–466. https://doi.org/10.3103/S0095452719060100
42. Tynkevich, Y. O., Yakobyshen, D. V., Cherkazianova, A. S., Shelyfist, A. Y., & Volkov, R. A. (2024). Intragenomic polymorphism of the ITS1-5.8S-ITS2 region in invasive species of the genus *Reynoutria*. *Cytology and Genetics*, *58*(6), 536–546. https://doi.org/10.3103/S0095452724060112
43. Vitales, D., Pascual-Díaz, J. P., Zoulová, V., Kovarik, A., & Garcia, S. (2026). Genome architecture modulates 35S and 5S rDNA homogenization in Asteraceae. *The Plant Journal*, *128*(2), e71174. https://doi.org/10.1111/tpj.71174
44. Volkov, R. A., Panchuk, I. I., Borisjuk, N. V., Hosiawa-Baranska, M., Maluszynska, J., & Hemleben, V. (2017). Evolutional dynamics of 45S and 5S ribosomal DNA in ancient allohexaploid *Atropa belladonna*. *BMC Plant Biology*, *17*(1), 21. https://doi.org/10.1186/s12870-017-0978-6

45. Wang, F., Li, M., Liu, Z., Li, W., He, Q., Xing, L., Xiao, Y., Wang, M., Wang, Y., Du, C., Zhang, H., Zhou, Y., & Du, H. (2025). The mixed auto-/allooctoploid genome of Japanese knotweed (*Reynoutria japonica*) provides insights into its polyploid origin and invasiveness. *The Plant Journal*, *121*(4), e70005. https://doi.org/10.1111/tpj.70005
46. Wang, W., Zhang, X., Garcia, S., Leitch, A. R., & Kovařík, A. (2023). Intragenomic rDNA variation – the product of concerted evolution, mutation, or something in between? *Heredity*, *131*(3), 179–188. https://doi.org/10.1038/s41437-023-00634-5
47. Yakobyshen, D. V., Tynkevich, Y. O., & Volkov, R. A. (2025). *LEAFY* gene variants in the genomes of Ukrainian samples of the invasive species *Reynoutria sachalinensis* [In Ukrainian]. *The Bulletin of Ukrainian Society of Geneticists and Breeders*, *23*(1–2), 37–44. https://doi.org/10.7124/visnyk.utgis.23.1-2.1779

ORGANIZATION AND POLYMORPHISM OF 5S rDNA REPEATS IN INVASIVE SPECIES OF THE GENUS *REYNOUTRIA*

D.V. Yakobyshen, Y.O. Tynkevich

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University,
Ukraine, 58022, Chernivtsi, Kotsiubynsky 2 Str.
y.tynkevich@chnu.edu.ua

Reynoutria japonica Houtt., R. sachalinensis (F. Schmidt) Nakai and their hybrid R. × bohemica Chrtek & Chrtkova are among the most aggressive invasive plants in Europe. The combination of polyploidy, interspecific hybridization and clonal reproduction makes the genus Reynoutria an attractive model for studying genome evolution, while reliable identification of the parental species and their hybrids is of great practical importance for nature conservation. The intergenic spacer (IGS) of 5S rDNA is a promising marker for such purposes; however, the organization and polymorphism of this genomic region in members of the genus Reynoutria have not been studied to date.

The aim of this study was to characterize the molecular organization and intragenomic polymorphism of 5S rDNA in accessions of R. japonica and R. sachalinensis from Ukraine. The 5S rDNA IGS region was amplified by PCR and sequenced using Illumina technology. The major ribotypes were subjected to phylogenetic analysis, their representation in the genomes of both species was estimated, and the regulatory elements within the IGS were analyzed.

A high level of intragenomic 5S rDNA polymorphism was revealed in both species. IGS variability is due almost exclusively to nucleotide substitutions: of the 85 variable sites, 65 are parsimony-informative, whereas the number of indels is low. The putative transcription terminator and the external promoter elements are generally conserved. In the phylogenetic tree, the 29 major ribotypes form three clusters, only one of which is shared by both species, while the other two are characteristic of either R. japonica or R. sachalinensis. These differences may result from rapid evolution of 5S rDNA arrays after the divergence of these species. The species-specific ribotype clusters can be used to identify R. japonica, R. sachalinensis and their hybrids. The presence of individual R. japonica ribotypes in the R. sachalinensis genome may indicate introgressive hybridization between these species.

Keywords: biological diversity, invasive species, genetic barcoding, 5S rDNA

Отримано редколегією 21.07.2026 р.
Підписано до друку 15.10.2026 р.
Дата публікації 31.10.2026 р.

ORCID ID
Даніель Якобишен: https://orcid.org/0009-0002-1799-7460
Юрій Тинкевич: https://orcid.org/0000-0002-0222-8098