УДК 577.21:582.951.4 https://doi.org/10.31861/biosystems2026.02.375

ПОЛІМОРФІЗМ ДІЛЯНКИ ITS1–5.8S–ITS2 У ДВОХ КУЛЬТИВАРІВ *PETUNIA × ATKINSIANA*

А. І. БАБИНА, Р. А. ВОЛКОВ*

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

Ділянка ITS1–5.8S–ITS2 35S рДНК є одним із найпоширеніших молекулярних маркерів для ідентифікації, баркодування та філогенетичного аналізу рослин. Проте 35S рДНК представлена в геномі великою кількістю тандемних копій, які можуть відрізнятися між собою, а пряме секвенування ПЛР-продуктів не дозволяє виявити такий внутрішньогеномний поліморфізм. Особливо важливим це питання є для організмів гібридного походження, до яких належить петунія гібридна (Petunia × atkinsiana) – одна з найпоширеніших декоративних культур і модельний об'єкт біології рослин. Метою роботи було охарактеризувати внутрішньогеномний поліморфізм ділянки ITS1–5.8S–ITS2 у двох комерційних культиварів P. × atkinsiana – «Petit F1 Violet» (зразок Pt7) і «Wine Red» (зразок WR1) – та оцінити можливість використання ампліконного секвенування для їх ідентифікації і з'ясування походження. Ділянку ITS1–5.8S–ITS2 ампліфікували з геномної ДНК праймерами з двонуклеотидними баркодами, суміш ампліконів двох зразків секвенували парними прочитаннями на платформі Illumina MiSeq. Після контролю якості та розподілу за зразками отримано 364 ріди для Pt7 і 260 для WR1 завдовжки 596 нт. Химерні послідовності виявляли за алгоритмом UCHIME, філогенетичне дерево будували методом максимальної правдоподібності із залученням референсних послідовностей видів родів Petunia і Calibrachoa з бази даних GenBank. В обох зразках виявлено значний поліморфізм: 220 варіантів послідовностей у Pt7 і 190 у WR1. Дванадцять основних риботипів (R1–R12), представлених щонайменше п'ятьма рідами, охоплювали 30,8 % рідів. За наявністю специфічних мутацій ці риботипи розподілилися між двома класами: класом I (R1, R3–R5, R7, R8), подібним до послідовностей видів комплексу P. integrifolia, і класом II (R2), подібним до P. axillaris, P. exserta та P. occidentalis. Найпоширеніші риботипи R1 і R2 відрізнялися 20 замінами нуклеотидів і трьома однонуклеотидними інделами, переважно в ITS2. На філогенетичному дереві риботипи двох класів увійшли до різних клад із високою статистичною підтримкою, що підтверджує успадкування двох варіантів ITS від різних батьківських видів. П'ять риботипів (R6, R9–R12), виявлених лише в Pt7, мали мозаїчну будову; для чотирьох із них аналіз UCHIME вказує на походження внаслідок утворення ПЛР-химер між R1 і R2. Склад риботипів культиварів суттєво різнився: у Pt7 переважали R1 (44,4 %) і R2 (31,6 %), тобто були представлені обидва класи, тоді як у WR1 майже всі ріди основних риботипів належали до класу I з переважанням R3 (39,0 %) і R4 (23,7 %), а частка R2 становила лише 1,7 %. Отже, профілі риботипів ITS1–5.8S–ITS2, отримані методом ампліконного секвенування, дозволяють чітко розрізняти досліджені культивари і можуть бути використані для ідентифікації культиварів петунії та вивчення їх походження.

Ключові слова: ампліконне секвенування, внутрішньогеномний поліморфізм, гібридизація, ідентифікація культиварів, молекулярні маркери, ПЛР-химери, рибосомна ДНК, риботип, ITS1–5.8S–ITS2, Petunia × atkinsiana

Вступ. *Petunia* × *atkinsiana* (Sweet) D.Don ex W.H.Baxter (синонім: *P.* × *hybrida* hort. ex E.Vilm.) – нотовид (гібрид), який уперше було отримано у XIX ст. в Англії (Forbes, 2017). Його батьківськими формами вважають *P. axillaris* (Lam.) Britton, Sterns & Poggenb. та *P. integrifolia* (Hook.) Schinz & Thell. (або близький до останнього вид *P. inflata* R.E.Fries) (Segatto et al., 2014; Bombarely et al., 2016; Saei et al., 2025). У подальшій селекційній роботі для виведення нових сортів петунії неодноразово використовували схрещування як із цими видами, так і з іншими представниками роду, зокрема *P. exserta* Stehm. та *P. altiplana* T.Ando & Hashim. (Griesbach, 2007; Guo and Warner, 2020). Сьогодні численні форми *P.* × *atkinsiana* належать до найпоширеніших декоративних культур і є популярним модельним об'єктом для досліджень у родині Solanaceae (Gerats and Vandenbussche, 2005; Vandenbussche et al., 2016).

Походження багатьох сортів *P.* × *atkinsiana* досі залишається нез'ясованим, і для його встановлення необхідне використання молекулярних методів. Зокрема, зручним молекулярним маркером для визначення видової належності та баркодування рослин є ділянка ITS1–5.8S–ITS2 у складі 35S рДНК.

35S рДНК належить до тандемно організованих повторюваних послідовностей, які присутні в ядерному геномі всіх еукаріотів. Повторювана одиниця (повтор) 35S рДНК містить ділянки, які кодують 18S, 5.8S та 26S

рРНК, розділені внутрішніми транскрибованими спейсерами (internal transcribed spacers) ITS1 та ITS2, котрі видаляються під час процесингу пре-рРНК (Hemleben et al., 2021). Поєднання консервативних кодувальних ділянок із мінливими спейсерами зумовило широке використання ITS у таксономії, молекулярній ідентифікації та філогенетиці рослин (Baldwin et al., 1995; Álvarez and Wendel, 2003; Grimm et al., 2005; Hollingsworth et al., 2011).

Традиційно вважається, що окремі копії повторів ДНК дуже схожі одна на одну внаслідок концертної еволюції, або внутрішньогеномної гомогенізації, основними механізмами якої є нерівний кросинговер і генна конверсія (Dover, 1982; Eickbush and Eickbush, 2007). Тому в дослідженнях ITS1–5.8S–ITS2 широко застосовують ПЛР-ампліфікацію з подальшим прямим секвенуванням отриманого продукту. Проте такий підхід може призводити до втрати інформації про внутрішньогеномний поліморфізм 35S рДНК, пов'язаний, зокрема, з гібридним походженням досліджуваних зразків.

Високопродуктивне секвенування виявило в геномах багатьох рослин співіснування кількох варіантів ITS, що різняться окремими замінами та інделами (Song et al., 2012; Wang et al., 2023). Ці варіанти можуть являти собою як функціональні повтори 35S рДНК, так і псевдогени, що важливо враховувати при філогенетичних реконструкціях (Bailey et al., 2003; Nieto Feliner and Rosselló, 2007; Poczai and Hyvönen, 2010). Оцінка внутрішньогеномного поліморфізму особливо важлива при дослідженні геномів організмів гібридного походження, у яких батьківські класи рДНК можуть зберігатися, елімінуватися або перебудовуватися (Volkov et al., 1999, 2007, 2017).

Раніше за допомогою рестрикційного аналізу шести ліній *P.* × *atkinsiana* було виявлено внутрішньогеномну мінливість 35S рДНК (Zeboudj et al., 1994). Проте різноманіття цієї ділянки у *P.* × *atkinsiana* досі залишається маловивченим. Метою цієї роботи було охарактеризувати молекулярний поліморфізм ITS1–5.8S–ITS2 з використанням високопродуктивного секвенування ампліконів та оцінити можливість його застосування для баркодування і визначення походження сучасних культиварів петунії на прикладі двох комерційних форм «Petit F1 Violet» та «Wine Red».

Матеріали та методи.

Рослинний матеріал та виділення ДНК. Матеріалом дослідження слугували рослини двох комерційних культиварів *Petunia* × *atkinsiana*: «Petit F1 Violet» типу мініфлора (зразок Pt7; Černý Seed, Чехія) та «Wine Red» типу грандіфлора супербісіма нана (зразок WR1; Černý Seed, Чехія). Для кожного культивару аналізували по одній індивідуальній рослині, вирощеній із насіння. Для вирощування в умовах *in vitro* насіння стерилізували та висівали на безгормональне агаризоване середовище Мурасіге–Скуга (Murashige and Skoog, 1962). Після формування 3–4 справжніх листків рослини пересаджували на середовище Гамборга B5 (Gamborg et al., 1968) і культивували за температури 20–21 °C і фотоперіоду 16 год світла / 8 год темряви.

Геномну ДНК виділяли з листків модифікованим цетавлоновим методом (Porebski et al., 1997; Panchuk and Volkov, 2007). Концентрацію та чистоту отриманих препаратів ДНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 1000.

Ампліфікація та секвенування. Ділянку ITS1–5.8S–ITS2 35S рДНК ампліфікували методом ПЛР із праймерами, комплементарними до фланкувальних консервативних фрагментів генів 18S та 26S рРНК (табл. 1). Застосовували дві пари праймерів, які різнилися двонуклеотидними баркодами на 5′-кінці (GG або AA), що дозволяло розрізняти зразки. ПЛР-ампліфікацію проводили з використанням полімеразної суміші FIREPol Master Mix (Solis BioDyne) згідно з рекомендаціями виробника. Температура гібридизації для обох пар праймерів становила 61 °C.

Таблиця 1.

Праймери, використані для ампліфікації ділянки ITS1–5.8S–ITS2 35S рДНК

Table 1.

Primers used for amplification of the ITS1–5.8S–ITS2 region of 35S rDNA

Праймер / Primer	**Послідовність 5′→3′ / Sequence 5′→3′**
ITS-Fd-GG	GGACCTGCGGAAGGATCATTGTCG
ITS-Fd-AA	AAACCTGCGGAAGGATCATTGTCG
ITS-Rev-GG	GGCCCCGCCTGACCTGGGGTC
ITS-Rev-AA	AACCCCGCCTGACCTGGGGTC

Наявність та концентрацію продуктів ампліфікації перевіряли електрофорезом в 1,5 % агарозному гелі. ПЛР-продукти двох зразків змішували в еквімолярній концентрації, після чого суміш ампліконів очищали екстракцією з 2 % агарозного гелю за допомогою набору Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Амплікони секвенували парними (paired-end) прочитаннями 2 × 300 нт на платформі Illumina MiSeq з використанням сервісу Amplicon-EZ (GENEWIZ).

Обробка результатів секвенування. «Сирі» парні ріди Illumina очищали від залишків адаптерів і ділянок низької якості в програмі fastp v0.23.4 (Chen et al., 2018) з використанням жорстких параметрів: -l 200, --cut_tail, --cut_front, --cut_tail_window_size 1, --cut_tail_mean_quality 30. Оскільки ампліфікована ділянка ITS1–5.8S–ITS2 була довшою за сумарну довжину прямого та зворотного рідів, їх об'єднували без перекриття за допомогою програми SeqKit v0.15.0 (Shen et al., 2016). Отримані послідовності у форматі FASTA розподіляли за зразками за послідовностями двонуклеотидних баркодів на 5′-кінці праймерів за допомогою оригінального Python-скрипту. У результаті для подальшого аналізу залишилося 364 ріди зразка Pt7 і 260 – зразка WR1, усі завдовжки 596 нт.

Виявлення риботипів та оцінка їх частки у зразках. Ідентичні послідовності групували в унікальні риботипи, зберігаючи для кожного з них кількість відповідних рідів. Для подальшого аналізу використовували лише найпоширеніші риботипи, які були представлені щонайменше двома ідентичними рідами. Відсоткову частку риботипів у кожному зразку розраховували як частку рідів, що відповідають певному риботипу, від загальної кількості успішно картованих рідів. Наявність химерних послідовностей перевіряли *de novo* за алгоритмом UCHIME (Edgar et al., 2011), реалізованим у VSEARCH v2.30.0 (Rognes et al., 2016), з типовими параметрами.

Вирівнювання послідовностей і філогенетичний аналіз. Для порівняння з ідентифікованими нами риботипами з бази даних GenBank було відібрано 24 послідовності ITS представників роду *Petunia* та дві – видів роду *Calibrachoa* (номери доступу наведено на рис. 2, 3). Множинне вирівнювання риботипів і референсних послідовностей виконували за алгоритмом G-INS-i у MAFFT v7 (Katoh et al., 2019). Перед побудовою дерева вирівнювання обрізали до ділянки, яку охоплювала більшість послідовностей (позиції 46–566 вихідного вирівнювання). Остаточне вирівнювання включало 36 послідовностей і 521 позицію. Дендрограму реконструювали методом максимальної правдоподібності в IQ-TREE v2.3.6 (Minh et al., 2020) із моделлю еволюції HKY+F+R2, яку було визначено як оптимальну за допомогою ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). Статистичну підтримку гілок оцінювали за ультрашвидким bootstrap (Hoang et al., 2018) для 1000 реплікацій. Як зовнішню групу для вкорінення дерева використовували два види *Calibrachoa*.

Результати та їх обговорення.

Секвенування ампліконів і внутрішньогеномний поліморфізм ITS1–5.8S–ITS2. Після контролю якості, об'єднання парних рідів і розподілу за зразками для аналізу було відібрано 624 послідовності ITS1–5.8S–ITS2 завдовжки 596 нт: 364 для Pt7 і 260 для WR1. Дереплікація рідів виявила значний поліморфізм ITS у геномах обох зразків: 220 варіантів послідовностей у Pt7 і 190 у WR1. Загальна кількість риботипів, представлених щонайменше двома рідами, становила 47. Ці риботипи включали 47,5 % рідів Pt7 і 37,3 % рідів WR1, причому лише дев'ять із них були спільними для обох культиварів. Решта рідів траплялися лише один раз.

Наявність таких унікальних рідів можна пояснити як помилками секвенування, так і високим внутрішньогеномним поліморфізмом ділянки ITS1–5.8S–ITS2 рДНК. Тому подальший аналіз ми зосередили на дванадцяти основних риботипах (R1–R12), представлених не менше, ніж п'ятьма рідами кожен (табл. 2). Ці риботипи охоплювали 192 ріди (30,8 %); розподіл рідів між ними для обох зразків представлено на тепловій карті (рис. 1).

Вирівнювання всіх отриманих рідів для кожного зразка дозволило встановити середню попарну подібність, яка становила 97,8 % для Pt7 і 98,7 % для WR1, а частка ідентичних позицій – 66,4 % і 73,0 % відповідно. Попри це, ріди WR1 гірше об'єднувалися в риботипи: унікальні ріди для цього зразка становили 64,6 % проти 54,1 % у Pt7, а на основні риботипи припадало 22,7 % проти 36,5 % у Pt7.

Два класи ITS1–5.8S–ITS2 та їх відповідність батьківським видам. Вирівнювання основних риботипів показало, що за наявністю специфічних мутацій їх можна розподілити між двома чітко відмінними класами – I (R1, R3, R4, R5, R7, R8) і II (R2). Ще п'ять риботипів (R6, R9–R12) мають мозаїчну будову, тобто складаються із сегментів, які належать до обох виявлених класів (табл. 2; рис. 2).

Таблиця 2.

Характеристика основних риботипів ITS1–5.8S–ITS2

Table 2.

Characteristics of the major ITS1–5.8S–ITS2 ribotypes

Риботип / Ribotype	Клас / Class	Відмінності від R1 (заміни/індели) / Differences from R1 (substitutions/indels)	Відмінності від R2 (заміни/індели) / Differences from R2 (substitutions/indels)
R1	I	0/0	20/3
R2	II	20/3	0/0
R3	I	1/0	21/3
R4	I	4/0	20/3
R5	I	2/0	22/3
R6*	мозаїка / mosaic	15/3	5/0
R7	I	1/0	21/3
R8	I	1/0	21/3
R9*	мозаїка / mosaic	5/0	15/3
R10*	мозаїка / mosaic	16/3	9/0
R11*	мозаїка / mosaic	16/3	4/0
R12*	мозаїка / mosaic	4/0	16/3

*Примітка: * – мозаїчні риботипи; індели подано як кількість подій*
*Note: *, mosaic ribotypes; indels are given as the number of events*

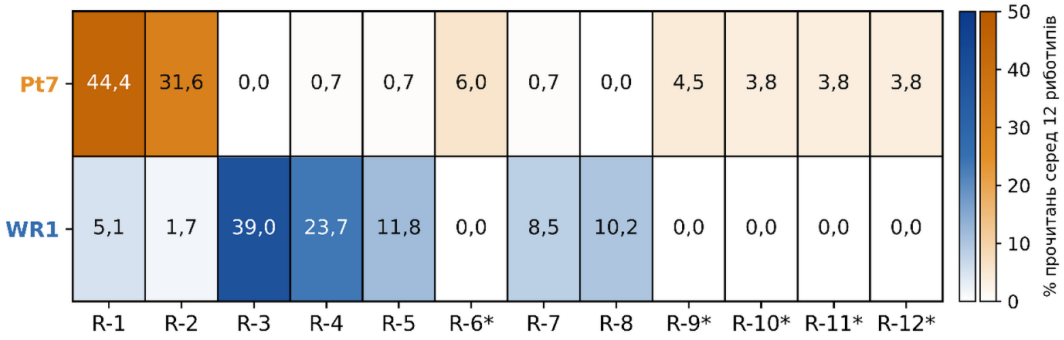


Рис. 1. Частка рідів (%) основних риботипів ITS1–5.8S–ITS2 у зразках Pt7 і WR1 (від сумарної кількості рідів дванадцяти основних риботипів у зразку). Зірочкою позначено мозаїчні риботипи

Fig. 1. Relative content of reads (%) of the major ITS1–5.8S–ITS2 ribotypes in samples Pt7 and WR1 (as a percentage of the total number of reads of the twelve major ribotypes in the sample). Asterisk indicates mosaic ribotypes.

Найпоширеніші риботипи, R1 і R2, відрізняються між собою 20 замінами нуклеотидів та трьома однонуклеотидними інделами. Більшість цих відмінностей зосереджена в ITS2, тоді як в ITS1 присутні лише чотири мутації.За набором специфічних мутацій клас I подібний до референсних послідовностей ITS1–5.8S–ITS2 з бази даних GenBank, знайдених для видів комплексу *P. integrifolia* (*P. integrifolia*, *P. littoralis*, *P. bajeensis*), а клас II – до *P. axillaris*, *P. exserta* та *P. occidentalis* (рис. 2). Одночасна присутність двох ITS-класів у геномі однієї рослини узгоджується з гібридним походженням *P.* × *atkinsiana* внаслідок схрещування *P. axillaris* та *P. integrifolia* (Segatto et al., 2014; Bombarely et al., 2016).

Мозаїчні риботипи. Порівняння отриманих послідовностей показало, що серед десяти основних риботипів культивару Pt7 п’ять (R6, R9–R12) мають мозаїчну будову (рис. 2). У риботипів R6 та R11 ділянка ITS1 відповідає класу I, а ділянка ITS2 – класу II, тоді як у риботипів R9 та R12 спостерігається зворотна картина. При цьому детальний аналіз розташування класоспецифічних мутацій показує, що риботипи R6 і R9, а також R11 і R12 утворюють взаємно «зворотні пари», які характерні для ПЛР-химер, що утворюються внаслідок перехресної гібридизації матриці під час ампліфікації суміші високоподібних послідовностей (Cronn et al., 2002).

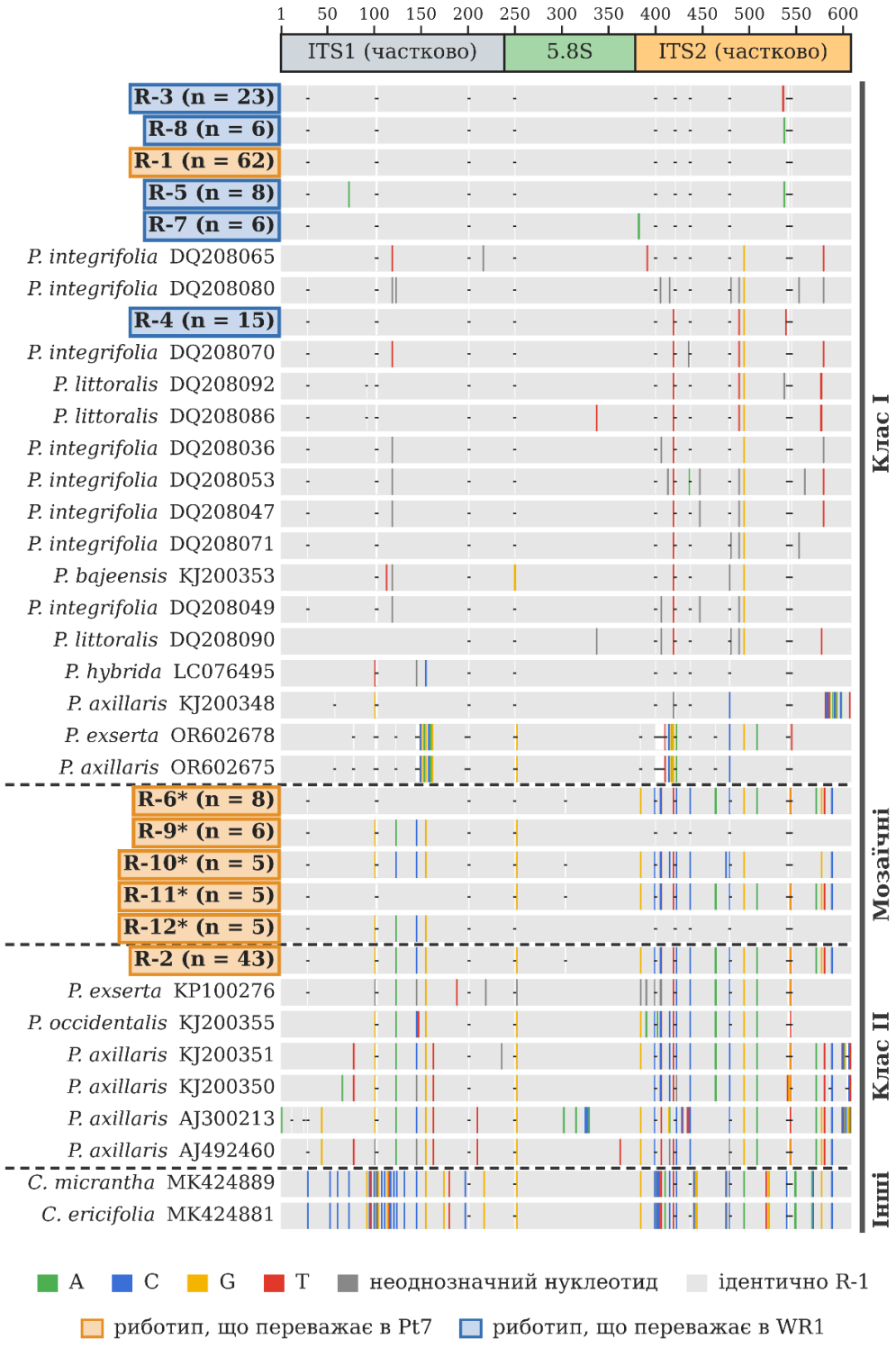


Рис. 2. Множинне вирівнювання послідовностей ITS1–5.8S–ITS2 основних риботипів Pt7 та WR1 (R1–R12; n – кількість рідів) і референсних послідовностей Petunia та Calibrachoa з GenBank (позиції 46–566 вихідного вирівнювання). Кольором показано відмінності від риботипу R1; білі проміжки – індели; сірі позначки – неоднозначні нуклеотиди; зірочка – мозаїчні риботипи; рамки навколо назв риботипів – зразок, у якому риботип переважає (помаранчева – Pt7, синя – WR1)

Fig. 2. Multiple alignment of ITS1–5.8S–ITS2 sequences of the major ribotypes of Pt7 and WR1 (R1–R12; n, number of reads) and reference sequences of Petunia and Calibrachoa from GenBank (positions 46–566 of the initial alignment). Colours indicate differences from ribotype R1; white spaces indicate indels; grey marks indicate ambiguous nucleotides; an asterisk indicates mosaic ribotypes; frames around ribotype names indicate the sample in which the ribotype predominates (orange, Pt7; blue, WR1)

Згідно з проведеним нами за допомогою інструменту UCHIME аналізом, мозаїчні риботипи R6/R9 та R11/R12 виникли (з імовірністю 0,64 та 0,54, відповідно) як химери від найбільш поширених у геномі Pt7 батьківських риботипів R1 і R2. Мозаїчний риботип R10, імовірно, складається з кількох сегментів та містить мутації, які відсутні як у R1, так і в R2. Проведений аналіз не підтверджує химерну природу R10 (імовірність 0,10).

Крім основних риботипів, у геномі Pt7 химерними було визначено ще 26 варіантів послідовностей. У геномі зразка WR1 химерних риботипів виявлено не було.

Аналіз за алгоритмом UCHIME не дозволяє розрізняти ПЛР-химери і справжні рекомбінантні послідовності, які можуть утворюватися між різними варіантами 35S рДНК у геномі. Наш аналіз свідчить, що в мозаїчних риботипів межі між класоспецифічними сегментами переважно розташовані в кодувальній ділянці 5.8S та в прилеглій частині ITS1, де послідовності обох класів майже ідентичні. Саме тут найімовірніше можуть відбуватися як перехресна гібридизація матриць під час ПЛР, так і рекомбінація між повторами внаслідок нерівного кросинговеру чи генної конверсії. Показово, що в описаних раніше ймовірно рекомбінантних клонах ITS1–ITS2 *Amelanchier* ділянки рекомбінації також локалізувалися між 3′-кінцем ITS1 і кодувальною ділянкою 5.8S (Campbell et al., 1997).

Філогенетичний аналіз. Для побудови філогенетичного дерева використали лише риботипи класів I і II, оскільки мозаїчні послідовності порушують дихотомічну модель еволюції. Після вкорінення за середньою точкою види роду *Calibrachoa* утворили зовнішню групу, а послідовності *Petunia* розділилися на дві клади з високою статистичною підтримкою (рис. 3).

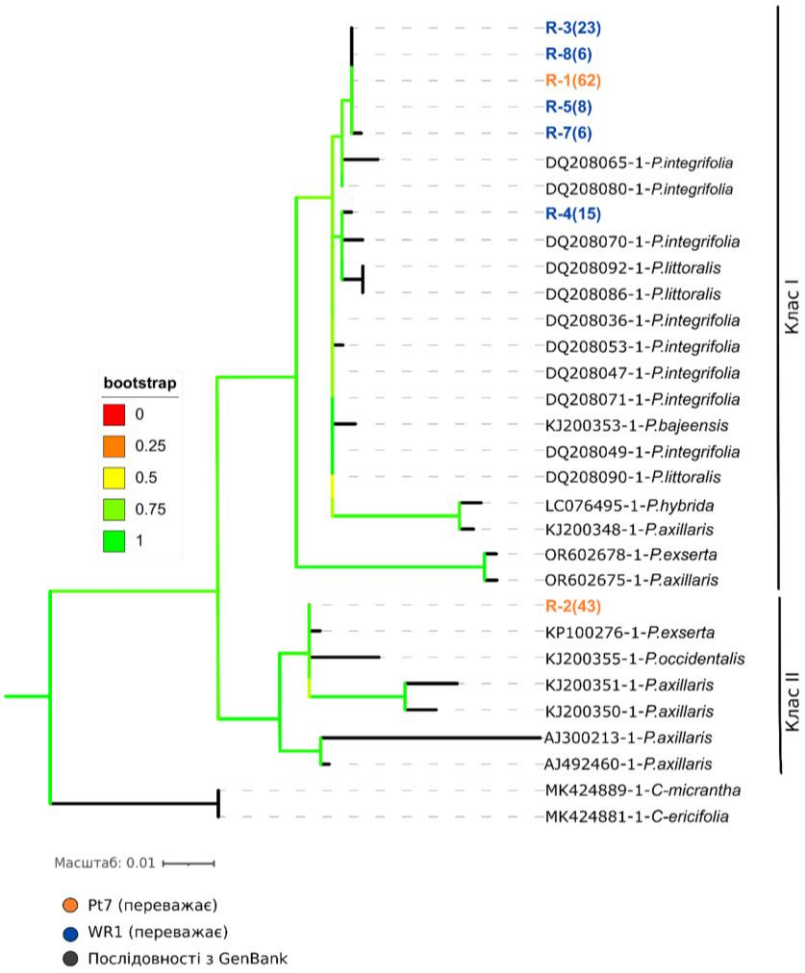


Рис. 3. Філогенетична дендрограма послідовностей ITS1–5.8S–ITS2 Petunia, побудована методом максимальної правдоподібності (IQ-TREE, модель HKY+F+R2). Колір гілок відповідає підтримці UFBoot. У дужках показано кількість рідів, що відповідають риботипу. Масштаб – кількість замін на сайт

Fig. 3. Phylogenetic dendrogram of Petunia ITS1–5.8S–ITS2 sequences constructed using the maximum likelihood method (IQ-TREE, HKY+F+R2 model). Branch colours correspond to UFBoot support. The number of reads corresponding to each ribotype is shown in parentheses. Scale bar, number of substitutions per site

Кладу I утворили всі риботипи класу I разом із референсними послідовностями комплексу *P. integrifolia*. У межах клади I риботипи R1, R3, R5, R7 і R8 групувалися з послідовностями *P. integrifolia* (DQ208065 і DQ208080), а R4 – з *P. integrifolia* (DQ208070) та *P. littoralis* (DQ208086 і DQ208092). Крім того, до клади I потрапили одна послідовність *P. axillaris* (KJ200348), що можна пояснити гібридним походженням або помилковим визначенням цього зразка, а також послідовності *P. axillaris* (OR602675) і *P. exserta* (OR602678), у яких у позиціях, специфічних для класів I і II, знаходяться делеції. Це часто є наслідком некоректної обробки результатів прямого секвенування суміші варіантів, коли неоднозначні нуклеотиди (ambiguous nucleotides) видаляють із послідовностей. Відповідно, розташування цих двох послідовностей на дендрограмі потребує додаткового уточнення.

Кладу II утворює риботип R2 разом із більшістю послідовностей *P. axillaris*, *P. exserta* (KP100276) і *P. occidentalis*. Таким чином, топологія дерева підтверджує гіпотезу про успадкування двох варіантів ділянки ITS1–5.8S–ITS2 від різних батьківських видів.

Співвідношення риботипів у культиварів. Склад основних риботипів двох досліджуваних культиварів суттєво різнився (рис. 1). У Pt7 переважали R1 (44,4 % рідів основних риботипів) і R2 (31,6 %). Тобто в геномі цього культивару представлені обидва класи ITS1–5.8S–ITS2 у співвідношенні приблизно 1,5 : 1, тоді як ще 22,8 % рідів припадає на мозаїчні риботипи. Натомість у WR1 до класу I належали 58 із 59 рідів основних риботипів, а до класу II – тільки один, R2, відносний вміст якого становить лише 1,7 % (рис. 1). Культивари різнилися не лише наявністю послідовностей класу II, а й відносною представленістю риботипів класу I. У Pt7 цей клас представлений майже виключно риботипом R1, тоді як у WR1 переважали R3 (39,0 %) і R4 (23,7 %). Риботипи R3, R4, R5, R7 і R8 відрізняються від R1 наявністю від однієї до чотирьох замін нуклеотидів. Різний склад риботипів ITS1–5.8S–ITS2 двох культиварів узгоджується з уявленням про їх походження внаслідок неодноразової гібридизації кількох батьківських видів.

Отже, порівняння профілів риботипів дозволяє чітко розрізняти досліджувані культивари. Тобто ампліконне секвенування ділянки ITS1–5.8S–ITS2 може бути ефективним інструментом для ідентифікації культиварів петунії та дослідження їх походження.

Висновки:

1. Ділянка ITS1–5.8S–ITS2 обох досліджених культиварів *P.* × *atkinsiana* характеризується значним внутрішньогеномним поліморфізмом. Основні риботипи належать до двох класів, які відповідають батьківським видам *P. integrifolia* та *P. axillaris*, від яких було отримано сучасні комерційні форми петунії.

2. Культивари суттєво різняться складом риботипів: у Pt7 наявні послідовності ITS1–5.8S–ITS2 двох класів, тоді як у WR1 клас II практично відсутній, а клас I представлений кількома варіантами.

3. Профілі риботипів, отримані методом ампліконного секвенування, дозволяють чітко розрізняти два досліджені культивари петунії.

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

Подяки. *Автори висловлюють щиру подяку старшому досліднику Юрію Тинкевичу за допомогу у проведенні біоінформатичного аналізу та участь в обговоренні отриманих результатів.*

Список літератури / References:

1. Álvarez, I., Wendel, J.F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Mol Phylogenet Evol, 29 (3), 417–434. https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2
2. Bailey, C.D., Carr, T.G., Harris, S.A., Hughes, C.E. (2003). Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. Mol Phylogenet Evol, 29 (3), 435–455. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.08.021
3. Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Missouri Bot Gard, 82 (2), 247–277. https://doi.org/10.2307/2399880
4. Bombarely, A., Moser, M., Amrad, A., et al. (2016). Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of *Petunia hybrida*. Nat Plants, 2, 16074. https://doi.org/10.1038/nplants.2016.74
5. Campbell, C.S., Wojciechowski, M.F., Baldwin, B.G., Alice, L.A., Donoghue, M.J. (1997). Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). Mol Biol Evol, 14 (1), 81–90. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025705
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. Cronn, R., Cedroni, M., Haselkorn, T., Grover, C., Wendel, J.F. (2002). PCR-mediated recombination in amplification products derived from polyploid cotton. Theor Appl Genet, 104 (2), 482–489. https://doi.org/10.1007/s001220100741
8. Dover, G. (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. Nature, 299, 111–117. https://doi.org/10.1038/299111a0
9. Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics, 27 (16), 2194–2200. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381
10. Eickbush, T.H., Eickbush, D.G. (2007). Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. Genetics, 175 (2), 477–485. https://doi.org/10.1534/genetics.107.071399
11. Forbes, S. (2017). Greenspace: Why we should praise Petunias. The Adelaide Review. https://www.adelaidereview.com.au/latest/opinion/2017/02/13/greenspace-praise-petunias/
12. Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res, 50 (1), 151–158. https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5
13. Gerats, T., Vandenbussche, M. (2005). A model system for comparative research: *Petunia*. Trends Plant Sci, 10 (5), 251–256. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.03.005
14. Griesbach, R.J. (2007). Petunia. In: Anderson, N.O. (ed.) Flower Breeding and Genetics. Dordrecht: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4428-1_11
15. Grimm, G.W., Schlee, M., Komarova, N.Y., Volkov, R.A., Hemleben, V. (2005). Low-level taxonomy and intrageneric evolutionary trends in higher plants. In: From plant taxonomy to evolutionary biology. Nova Acta Leopold NF, 92 (342), 129–145.
16. Guo, Y., Warner, R.M. (2020). Dissecting genetic diversity and genomic background of *Petunia* cultivars with contrasting growth habits. Hortic Res, 7, 155. https://doi.org/10.1038/s41438-020-00373-2
17. Hemleben, V., Grierson, D., Borisjuk, N., Volkov, R.A., Kovařík, A. (2021). Personal perspectives on plant ribosomal RNA genes research: from precursor-rRNA to molecular evolution. Front Plant Sci, 12, 797348. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.797348
18. Hoang, D.T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B.Q., Vinh, L.S. (2018). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. Mol Biol Evol, 35 (2), 518–522. https://doi.org/10.1093/molbev/msx281.
19. Hollingsworth, P.M., Graham, S.W., Little, D.P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS ONE, 6 (5), e19254. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254
20. Kalyaanamoorthy, S., Minh, B.Q., Wong, T.K.F., von Haeseler, A., Jermiin, L.S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nat Methods, 14 (6), 587–589. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285
21. Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. Brief Bioinform, 20 (4), 1160–1166. https://doi.org/10.1093/bib/bbx108
22. 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. Mol Biol Evol, 37 (5), 1530–1534. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015
23. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant, 15 (3), 473–497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
24. Nieto Feliner, G., Rosselló, J.A. (2007). Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. Mol Phylogenet Evol, 44 (2), 911–919. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.01.013
25. Panchuk, I.I., Volkov, R.A. (2007). Practical course in molecular genetics [Praktykum z molekuliarnoi henetyky]. Chernivtsi: Ruta. [in Ukrainian].
26. Poczai, P., Hyvönen, J. (2010). Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. Mol Biol Rep, 37 (4), 1897–1912. https://doi.org/10.1007/s11033-009-9630-3.
27. 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 Mol Biol Rep, 15 (1), 8–15. https://doi.org/10.1007/BF02772108.
28. 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
29. Saei, A., Hunter, D., Hilario, E., et al. (2025). Chromosome-level genome assembly and annotation of *Petunia* × *atkinsiana*. Sci Data, 12, 1262. https://doi.org/10.1038/s41597-025-05553-0
30. Segatto, A.L., Ramos-Fregonezi, A.M., Bonatto, S.L., Freitas, L.B. (2014). Molecular insights into the purple-flowered ancestor of garden petunias. Am J Bot, 101 (1), 119–127. https://doi.org/10.3732/ajb.1300223
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. Song, J., Shi, L., Li, D., et al. (2012). Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA. PLoS ONE, 7 (8), e43971. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043971
33. Vandenbussche, M., Chambrier, P., Rodrigues Bento, S., Morel, P. (2016). *Petunia*, your next supermodel? Front Plant Sci, 7, 72. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00072
34. Volkov, R.A., Borisjuk, N.V., Panchuk, I.I., Schweizer, D., Hemleben, V. (1999). Elimination and rearrangement of parental rDNA in the allotetraploid *Nicotiana tabacum*. Mol Biol Evol, 16 (3), 311–320.

https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026112
35. Volkov, R.A., Komarova, N.Y., Hemleben, V. (2007). Ribosomal DNA in plant hybrids: inheritance, rearrangement, expression. Syst Biodivers, 5 (3), 261–276. https://doi.org/10.1017/S1477200007002447
36. 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 Biol, 17, 21. https://doi.org/10.1186/s12870-017-0978-6
37. 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.
38. Zeboudj, F., Kabbaj, A., Sossey Alaoui, K., Peltier, D., Tagmount, A., Raquin, C., Darmency, M., Maizonnier, D., Dulieu, H., Bervillé, A. (1994). Variation of ribosomal DNA and inheritance of polymorphisms in 6 *Petunia hybrida* hort lines. Agronomie, 14 (8), 485–495. https://doi.org/10.1051/agro:19940801

POLYMORPHISM OF THE ITS1–5.8S–ITS2 REGION IN TWO CULTIVARS OF *PETUNIA* × *ATKINSIANA*

A. I. Babyna, R. A. Volkov*

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

The ITS1–5.8S–ITS2 region of 35S rDNA is one of the most widely used molecular markers for plant identification, barcoding and phylogenetic analysis. However, 35S rDNA is present in the genome as a large number of tandem copies that may differ from each other, and direct sequencing of PCR products does not reveal such intragenomic polymorphism. This issue is particularly important for organisms of hybrid origin, such as garden petunia (Petunia × atkinsiana), one of the most widespread ornamental crops and a model object of plant biology. The aim of this work was to characterize the intragenomic polymorphism of the ITS1–5.8S–ITS2 region in two commercial cultivars of P. × atkinsiana, «Petit F1 Violet» (sample Pt7) and «Wine Red» (sample WR1), and to evaluate the potential of amplicon sequencing for their identification and for elucidating their origin. The ITS1–5.8S–ITS2 region was amplified from genomic DNA with primers carrying two-nucleotide barcodes, and the mixture of amplicons of the two samples was sequenced on the Illumina MiSeq platform. After quality control and demultiplexing, 364 reads were obtained for Pt7 and 260 for WR1, each 596 nt long. Chimeric sequences were detected with the UCHIME algorithm, and a phylogenetic tree was constructed by the maximum likelihood method using reference sequences of Petunia and Calibrachoa species from the GenBank database. Considerable polymorphism was found in both samples: 220 sequence variants in Pt7 and 190 in WR1. Twelve major ribotypes (R1–R12), each represented by at least five reads, accounted for 30.8 % of reads. Based on specific mutations, these ribotypes were assigned to two classes: class I (R1, R3–R5, R7, R8), similar to sequences of species of the P. integrifolia complex, and class II (R2), similar to P. axillaris, P. exserta and P. occidentalis. The most abundant ribotypes, R1 and R2, differed by 20 nucleotide substitutions and three single-nucleotide indels, mainly in ITS2. On the phylogenetic tree, ribotypes of the two classes fell into different clades with high statistical support, confirming the inheritance of the two ITS variants from different parental species. Five ribotypes (R6, R9–R12), found only in Pt7, had a mosaic structure; for four of them, UCHIME analysis indicates an origin as PCR chimeras between R1 and R2. The ribotype composition of the cultivars differed markedly: in Pt7, R1 (44.4 %) and R2 (31.6 %) predominated, i.e. both classes were represented, whereas in WR1 almost all reads of the major ribotypes belonged to class I, with R3 (39.0 %) and R4 (23.7 %) predominating, and the content of R2 was only 1.7 %. Thus, ITS1–5.8S–ITS2 ribotype profiles obtained by amplicon sequencing clearly distinguish the studied cultivars and can be used for the identification of petunia cultivars and for studying their origin.

Keywords: amplicon sequencing, cultivar identification, intragenomic polymorphism, ITS1–5.8S–ITS2, hybridization, molecular markers, PCR chimeras, ribosomal DNA, ribotype, Petunia × atkinsiana

Отримано редколегією 14.09.2026 р.
Підписано до друку 15.10.2026 р.
Дата публікації 31.10.2026 р.

ORCID ID
Альона Бабина: https://orcid.org/0009-0004-5418-4607
Роман Волков: https://orcid.org/0000-0003-0673-2598