

ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

РОШКА НАДІЯ МИХАЙЛІВНА

УДК 577.29:595.787 + 577.212.3 + 595.799

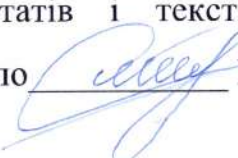
ДИСЕРТАЦІЯ

**5S РИБОСОМНА ДНК ТА ГЕНИ *CO1-CO2* ЯК МОЛЕКУЛЯРНІ
МАРКЕРИ В ОЦІНЦІ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ КОМАХ**

091 – Біологія

09 – Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії (PhD).

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне
джерело  Н.М. Рошка

Науковий керівник: **Роман Анатолійович Волков**, доктор біол. наук,
професор, завідувач кафедри молекулярної генетики та біотехнології

Чернівці – 2023

АНОТАЦІЯ

Рошка Н.М. «5S рибосомна ДНК та гени *COI-CO2* як молекулярні маркери в оцінці генетичного різноманіття комах». – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія. – Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича МОН України, Чернівці, 2023 рік.

Дисертаційна робота присвячена аналізу молекулярної організації, еволюції та використання 5S рДНК та генів *COI-CO2* в якості маркерних ділянок в оцінці генетичного різноманіття представників різних груп комах (Insecta).

У *Вступі* обґрунтовано вибір теми та її актуальність, зформулюванні мета та завдання дослідження, наведені дані про оприлюднення результатів у наукових працях та апробацію дисертації на наукових форумах. Охарактеризовані наукова новизна та практична цінність отриманих результатів. Завершується вступ інформацією про структуру та обсяг дисертації.

Перший розділ являє собою стислий огляд літератури, у якій висвітлюються існуючі проблеми та невирішені питання в систематиці комах. Також, у розділі охарактеризовано широко розповсюджені маркерні послідовності, які застосовуються в сучасних молекулярно-генетичних дослідженнях для оцінки біорізноманіття (ДНК-баркодингу) не лише комах, а й загалом еукаріот. Одним із найінформативніших ДНК-маркерів для комах на сьогоднішній день вважаються поліморфні локуси мітохондріальної ДНК, однак використання лише ділянок мітогеному має свої певні обмеження та недоліки. Зважаючи на це крім послідовностей мтДНК необхідно залучати й маркерні гени ядерного геному, до яких належать гени рибосомних РНК, а саме 5S рДНК. Проте, для комах потенціал використання 5S рДНК в якості молекулярного маркеру все ще залишається недостатньо вивченим. З огляду на це, метою дисертаційного дослідження було проаналізувати мінливість мітохондріальних генів *COI-CO2* та ядерної 5S рДНК у різних групах комах та

оцінити можливості використання цих ділянок геному в якості молекулярних маркерів для баркодингу та реконструкції філогенетичних відносин у досліджуваних таксонах.

Для досягнення мети було поставлено наступні завдання:

1. Ампліфікувати, клонувати та сиквенувати послідовності генів *COI-CO2* та 5S рДНК представників різних таксономічних груп комах.
2. Проаналізувати банк нуклеотидних послідовностей (GenBank) на наявність просиквенованих ділянок *COI-CO2* та 5S рДНК досліджуваних та близькоспоріднених видів.
3. Дослідити молекулярну організацію обраних для аналізу ділянок геному та оцінити їх поліморфізм
4. За допомогою отриманих даних зробити висновок про можливість використання ділянок *COI-CO2* та 5S рДНК в оцінці генетичного різноманіття комах.

Об'єкт дослідження – генетичний поліморфізм та еволюція геномів еукаріот.

Предмет – 5S рибосомна ДНК та гени цитохром оксидази *COI* та *CO2*.

Методи дослідження: у процесі підготовки дисертації було використано сучасні лабораторні методи дослідження, які згадані у *другому розділі*, зокрема: виділення геномної та плазмідної ДНК, квантифікація ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофоретичний аналіз, створення рекомбінантних конструктів та клонування фрагментів ДНК, сиквенування ДНК. Також були використані біоінформатичні методи: аналіз сиквенованих послідовностей ДНК, скринінг геномних баз даних, аналіз повногеномних архівів, вирівнювання послідовностей ДНК та побудова філогенетичних дендрограм.

Наукову новизну дисертаційного дослідження на основі отриманих результатів (*третій розділ*) розкривають наступні положення:

1. Вперше клоновано та сиквеновано гени *COI-CO2* та повторювані ділянки 5S рДНК для різних підвидів медоносної бджоли *Apis mellifera*, метеликів-шкідників родини Drepanidae та плодових мушок родини Tephritidae.

2. Вперше описано хромосомну локалізацію кластерів 5S рДНК у медоносних бджіл, метеликів та плодових мушок, виявлено новий тип диспергованої організації 5S рДНК у геномах метеликів.

3. Детально описано та проаналізовано молекулярну організацію, поліморфізм та характер мінливості 5S рДНК у досліджуваних видів.

4. Встановлено суттєві відмінності в молекулярній організації та швидкості еволюції 5S рДНК у різних групах комах.

5. Проведено порівняльну оцінку можливостей застосування різних молекулярних маркерів, 5S рДНК та гени *COI-CO2* для баркодингу та реконструкції філогенезу комах.

Отримані результати можуть бути використані для молекулярної паспортизації (баркодингу) та ідентифікації комах, зокрема підвидів/порід медоносної бджоли та комах-шкідників. Частина отриманих результатів було впроваджено у селекційну роботу ГО «Спілка пасічників України» та «Асоціація виробників продуктів бджільництва «Буковинський бджоляр»». Тематика дисертаційної роботи повністю відповідає науковій тематиці кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету в рамках кафедральної теми: «Структурно-функціональна організація геному та механізми адаптації у еукаріот» (2021-2025; номер державної реєстрації 0121U111109) та держбюджетної теми «Генетичний поліморфізм, розповсюдженість та адаптаційні здатності українських порід медоносної бджоли» (2020-2022; номер державної реєстрації 0120U102119).

Дисертаційну роботу викладено на 158 сторінках машинописного тексту. Дисертація складається зі вступу, огляду наукової літератури, опису використаних матеріалів та методів досліджень, отриманих результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел літератури та додатків.

Робота містить 11 таблиць, 26 рисунків та додаток. Бібліографічний список складається з 188 літературних джерел.

Ключові слова: молекулярна еволюція, генетичний поліморфізм, молекулярні маркери, ДНК-баркодинг, філогенетика, гени, цитохром оксидаза *COI-CO2*, міжгенний спейсер 5S рДНК, біоінформатичний аналіз, ПЛР, сиквенування, біорізноманіття, еукаріоти, *Insecta*

ABSTRACT

Roshka N.M. «5S ribosomal DNA and *COI-CO2* genes as molecular markers in the evaluation of insects genetic diversity». Manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Philosophy (PhD) in speciality 091 – Biology. – Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University, Chernivtsi, 2023.

The dissertation is focused on the analysis of the molecular organization, evolution and use of 5S rDNA and *COI-CO2* genes as marker loci in the evaluation of the genetic diversity of representatives of different groups of insects (*Insecta*).

The *Introduction* justifies the choice of topic and its relevance, formulates the aim and tasks of the research, provides information on the publication of results in scientific papers and on the approval of the dissertation at scientific forums. The scientific novelty and practical value of the obtained results are characterized. The introduction ends with information about the structure and scope of the dissertation.

The *first section* is a brief review of the literature highlighting existing problems and unresolved issues in insect taxonomy. The section also describes popular marker sequences used in modern molecular genetic studies to assess biodiversity (DNA barcoding) not only of insects but also of eukaryotes in general. Polymorphic loci of mitochondrial DNA are now considered one of the most informative DNA markers for insects. However, the use of only mitogenome regions has its limitations and disadvantages. Considering this, in addition to mtDNA sequences, it is necessary to use marker genes of the nuclear genome, which include ribosomal RNA genes, namely 5S rDNA. However, for insects, the potential of using

5S rDNA as a molecular marker still remains insufficiently studied. In view of this, the aim of the dissertation research was to analyze the variability of mitochondrial *COI-CO2* genes and nuclear 5S rDNA in different groups of insects and to evaluate the possibilities of using these genomic regions as molecular markers for barcoding and reconstruction of phylogenetic relationships in the taxa studied.

To achieve the goal, the following tasks were set:

1. To amplify, clone and sequence the *COI-CO2* genes and 5S rDNA of representatives of different taxonomic groups of insects.
2. To search the nucleotide sequences database (GenBank) for the presence of *COI-CO2* and 5S rDNA sequences of the studied and closely related species.
3. To study the molecular organization of the genomic regions selected for analysis, and to evaluate their polymorphism.
4. Based on the data obtained, draw a conclusion about the possibility of using *COI-CO2* and 5S rDNA regions in the assessment of the genetic diversity of insects.

The *object* of research is genetic polymorphism and evolution of eukaryotic genomes.

The *subject* is 5S ribosomal DNA and genes of cytochrome oxidase *COI* and *CO2*.

Research methods: in the process of preparing the dissertation, modern laboratory research methods were used, which are mentioned in the *second chapter*, in particular: isolation of genomic and plasmid DNA, DNA quantification, polymerase chain reaction (PCR), electrophoretic analysis, creation of recombinant constructs and cloning of DNA fragments, DNA sequencing. Bioinformatics methods were also used: analysis of DNA sequences, screening of genomic databases, analysis of whole genome archives, alignment of DNA sequences and construction of phylogenetic dendrograms.

The following statements reveal the scientific novelty of dissertation research based on the results obtained (*third section*):

1. For the first time, *COI-CO2* genes and 5S rDNA repeated regions were cloned and sequenced for different subspecies of the honey bee *Apis mellifera*, pest butterflies of the Drepanidae family, and fruit flies of the Tephritidae family.

2. The chromosomal localization of 5S rDNA clusters in honeybees, butterflies and fruit flies was described for the first time, and a new type of dispersed organization of 5S rDNA in butterfly genomes was discovered.

3. The molecular organization, polymorphism, and nature of variability of 5S rDNA in the studied species are described and analyzed in detail.

4. Significant differences in the molecular organization and rate of evolution of 5S rDNA in different groups of insects were revealed.

5. A comparative assessment of the possibilities of using various molecular markers, i.e., 5S rDNA and *COI-CO2* genes for barcoding and insect phylogeny reconstruction was carried out.

The obtained results can be used for molecular genotyping (barcoding) and identification of insects, in particular subspecies/breeds of honey bees and insect pests. The obtained results were partially implemented in the breeding process of the NGO «Beekeepers' Union of Ukraine» and «Association of beekeeping products producers «Bukovynsky beekeeper»». The topic of the dissertation fully corresponds to the research area of the Department of Molecular Genetics and Biotechnology of Chernivtsi National University within the framework of the project: «Structural-functional organization of the genome and mechanisms of adaptation in eukaryotes» (2021-2025; state registration number 0121U111109) and the state budget grant «Genetic polymorphism, distribution and adaptive abilities of Ukrainian honey bee breeds» (2020-2022; state registration number 0120U102119).

The thesis is presented on 158 pages of typewritten text. It consists of the introduction, the literature review, the description of research materials and methods, the results of own research and their discussion, the conclusions, the list of references. The work contains 11 tables and 26 figures. The references consist of 188 literature sources.

Keywords: molecular evolution, genetic polymorphism, molecular markers, DNA-barcoding, phylogenetics, genes, cytochrome oxidase *COI-CO2*, 5S rDNA intergenic spacer, bioinformatics analysis, PCR, sequencing, biodiversity, eukaryotes, *Insecta*.

Список публікацій здобувачки за темою дисертації

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus:

1. **Roshka N.M.**, Cherevatov O.V., Volkov R.A. (2021) Molecular organization and polymorphism of 5S rDNA in Carpathian bees. *Cytology and Genetics*, 55(5), 405-413.

Статті у фахових наукових виданнях України:

1. **Рошка, Н. М.**, Череватов, О. В., & Волков, Р. А. (2020) 5S рибосомна ДНК совковидки рожевої *Thyatira batis* L. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12(1), 20-25.

2. Череватов, О. В., & **Рошка, Н. М.** (2020) Поліморфізм ділянки *CoII* медоносних бджіл західних регіонів України. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12(2), 174-179.

3. **Рошка, Н. М.**, Волкова А. Р., & Панчук, І. І. (2021) Молекулярна організація 5S рибосомної ДНК *Apis mellifera ligustica*. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 19(1-2), 31-39.

4. **Рошка Н.М.** (2023) Організація міжгенного спейсера 5S рибосомної ДНК *Aratea tonoglypha* (Lepidoptera). *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 15(1), 26-31.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Roshka, N. M.**, Cherevatov, A. V., & Volkov, R. A. (2019) Polymorphism of the 5S rDNA intergenic spacer in *A. mellifera carnica* and *A. m. macedonica*. *Biopolymers & Cell*, 35(5), 391.

2. **Рошка, Н.М.**, & Волков, Р. А. (2019) Поліморфізм міжгенного спейсера 5S рДНК у підвидів бджоли медоносної (*Apis mellifera* L.). І

Міжнародна науково-практична конференція «Стале бджільництво в Україні», Чернівці. С. 28- 29.

3. **Рошка, Н. М., & Волков, Р. А.** (2020) Поліморфізм міжгенного спейсера 5S рДНК бджоли медоносної *Apis mellifera macedonica* (Insecta: Hymenoptera). *Українська ентомофауністика*, 11(1), 69-70.

4. **Roshka, N. M., & Volkov, R. A.** (2021) Bioinformatic analysis of the 5S rDNA IGS in the honeybee *Apis mellifera caucasica*. *Мат. XV Всеукраїнської конференції молодих вчених ІМБГ з міжнародною участю*, 26-27 травня, Київ. С. 239.

5. **Рошка, Н. М., & Волков, Р. А.** (2021) Структурна організація міжгенного спейсера 5S рДНК медоносних бджіл еко типу «Рахівська». *Мат. Наукової конференції «Зоологія в сучасному світі: виклики XXI століття»*, 1-3 червня, Київ. С.97

6. **Рошка, Н. М. & Волков, Р. А.** (2021) Структурна організація та поліморфізм міжгенного спейсера 5S рДНК карпатської бджоли. *Вісник Одеського національного університету. Біологія*. 26. Вип. 2(49). С. 125

7. Hlopina, K-H. D., **Roshka, N. M., & Volkov, R. A.** (2022) Molecular organization of 5S rDNA in *Cupido argiades* (Lycaenidae). *All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against russian invaders*, June 15-17, Kyiv. P. 31

8. **Roshka, N. M. & Volkov, R. A.** (2022) Long and short 5S rDNA variants in the genomes of *Apis* species. *Вісник Одеського національного університету. Біологія*. 27 (2(51)). P. 116-117

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	12
ВСТУП	13
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	19
1.1. Основні етапи розвитку таксономії комах.....	19
1.2. Актуальні проблеми таксономії та біогеографії комах.....	20
1.2.1. Надрізноманітні групи.....	20
1.2.2. Криптичні види. Види двійники.....	23
1.2.3. Інтродукція комах та явище гібридизації.....	26
1.3. Молекулярні маркери у дослідженні філогенії комах.....	29
1.3.1. Мітохондріальні маркери. ДНК-баркодинг.....	29
1.3.2. Маркери ядерного геному . Рибосомні РНК.....	32
Висновки до розділу 1.....	37
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	39
2.1. Матеріали для дослідження.....	39
2.2. Методи досліджень.....	44
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	53
3.1. Використання гену <i>CO2</i> та 5S рДНК для оцінки генетичного поліморфізму медоносної бджоли <i>Apis mellifera</i> L.....	53
3.1.1. Використання поліморфізм гену <i>CO2</i> для ідентифікації підвидів/порід медоносної бджоли.....	54
3.1.2. Організація 5S рДНК у видів роду <i>Apis</i>	57
3.1.2.1 Клонування повторів 5S рДНК та біоінформатичний скринінг геномів у GenBank	57
3.1.2.2. Хромосомна локалізація 5S рДНК у геномах видів роду <i>Apis</i>	65
3.1.2.3. Молекулярна організація IGS S-типу.....	65
3.1.2.4. Молекулярна організація IGS L-типу.....	75
3.1.2.5. Поліморфізм IGS S-типу у різних підвидів <i>A. mellifera</i>	77
3.1.2.6. Організація та поліморфізм кодувальних ділянок 5S рДНК медоносних бджіл	81

	11
Висновки до пірозділу 3.1.....	86
3.2. Організація та поліморфізм маркерних генів мтДНК та 5S рДНК лускокрилих.....	87
3.2.1. Поліморфізм за послідовністю <i>COI</i> мтДНК метеликів родини <i>Drepanidae</i>	87
3.2.2. Клонування повторів 5S рДНК метеликів та біоінформатичний скринінг геномів у Genbank.....	92
3.2.2.1. Хромосомна локалізація 5S рДНК у геномах метеликів родини <i>Drepanidae</i>	98
3.2.2.2. Молекулярна організація та поліморфізм IGS 5S рДНК представників родини <i>Drepanidae</i>	100
3.2.2.3. Організація та поліморфізм кодувальної ділянки 5S рДНК метеликів.....	107
Висновки до підрозділу 3.2.....	112
3.3. Молекулярна організація та поліморфізм генів <i>COI-CO2</i> мтДНК та 5S рДНК деяких представників родини <i>Tephritidae</i> (<i>Diptera</i>).....	113
3.3.1. Поліморфізм генів <i>CO</i> мтДНК у представників родини <i>Tephritidae</i>	114
3.3.2. Клонування IGS, скринінг геномів у GenBank та хромосомна локалізація 5S рДНК у представників родини <i>Tephritidae</i>	123
3.3.2.1. Молекулярна організація IGS у представників родини <i>Tephritidae</i> ...	126
3.3.2.2. Організація та поліморфізм кодувальної ділянки 5S рДНК у родині <i>Tephritidae</i>	131
Висновки до підрозділу 3.3.....	134
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ	135
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	136
ДОДАТОК	157

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

5S рДНК – ділянки геному, що кодують 5S рибосомну РНК

35S (45S) рДНК – ділянка геному, що складається з послідовностей, які кодують 18S, 5,8S і 25S рРНК та некодуючих ділянок між ними

ITS – internal transcribed spacer, внутрішні транскрибовані спейсери

IGS – intergenic spacer, міжгенний спейсер

CDS – coding sequence, кодувальна ділянка

CO – cytochrome oxidase, цитохром оксидаза,

ЕДТА- Na₂ – натрієва сіль етилендіамінтетраацетата

Індели – вставки чи делеції в нуклеотидній послідовності

нп – нуклеотидні пари

оліго-dT – ділянка нуклеотидної послідовності, яка складається з кількох тимінів

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

FISH – fluorescence *in situ* hybridization (флуоресцентна гібридизація *in situ*)

RFLP – restriction fragment length polymorphism (аналіз поліморфізму довжини рестриктних фрагментів ДНК)

SNP – single nucleotide polymorphisms (технологія з використанням маркера на основі поліморфізму по одиничному нуклеотиду)

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Станом на сьогодні видове різноманіття багатьох живих організмів знаходиться під загрозою повного або часткового зникнення (Powers & Jetz, 2019; Knapp et al., 2021; Turnhout & Purvis, 2021). За останні десятиліття для ідентифікації видів, оцінки біорізноманіття та моніторингу динаміки популяцій стали широко використовувати маркерні нуклеотидні послідовності, або молекулярні маркери, до числа яких входять поліморфні локуси мітохондріального та ядерного геномів (Szitenberg et al., 2013; Patwardhan et al., 2014; Tekpinar & Kalmer, 2019).

Комахи – найбільш чисельна та різноманітна група тварин. Традиційно у систематиці комах використовують морфолого-анатомічні методи. Проте, велика кількість питань все ще залишаються відкритими. Так, зокрема незрозумілими залишаються філогенетичні відносини для чисельних груп комах низького рангу, їх правильна видова та внутрішньовидова ідентифікація. Значною мірою це пов'язано з неузгодженістю у таксономічних поглядах між окремими дослідниками, що викликає необхідність залучення більш точних та об'єктивних підходів у таких дослідженнях. Так, задля коректної ідентифікації видів, які неможливо розмежувати за допомогою морфологічних параметрів (види-двійники/види-близнюки, криптичні види) єдиним надійним інструментарієм можуть слугувати молекулярно-генетичні методи, які базуються на порівнянні особливостей структури ДНК.

Одним із найінформативніших ДНК-маркерів для комах на сьогоднішній день вважаються поліморфні локуси мітохондріальної ДНК, серед яких ген CO1 найчастіше застосовується як інструмент у дослідженнях в галузі молекулярної систематики (Li et al., 2014; Elbrecht et al., 2016). Проте, використання лише ділянок мітогеному має свої певні обмеження та недоліки. З огляду на це крім послідовностей мтДНК необхідно залучати й маркерні гени ядерного геному, серед яких значної популярності набули повторювані

послідовності. До їх числа входять гени рибосомних РНК, а саме 5S рДНК, які являють собою зручний інструментарій в молекулярно-генетичних дослідженнях еукаріотичних організмів (Farslow et al., 2015; Garcia et al., 2017; Ding et al., 2022). Проте, для комах потенціал використання 5S рДНК в якості молекулярного маркеру все ще залишається недостатньо вивченим.

Мета і завдання дослідження. У дисертаційній роботі поставлено за *мету* дослідити мінливість мітохондріальних генів *COI-CO2* та ядерної 5S рДНК у різних групах комах та оцінити можливості використання цих ділянок геному в якості молекулярних маркерів для баркодингу та реконструкції філогенетичних відносин у досліджуваних таксонах.

Відповідно до поставленої *мети* були визначені наступні *завдання*:

5. Ампліфікувати, клонувати та сиквенувати послідовності генів *COI-CO2* та 5S рДНК представників різних таксономічних груп комах.
6. Проаналізувати банк нуклеотидних послідовностей (GenBank) на наявність просиквенованих ділянок *COI-CO2* та 5S рДНК досліджуваних та близькоспоріднених видів.
7. Дослідити молекулярну організацію обраних для аналізу ділянок геному та оцінити їх поліморфізм
8. За допомогою отриманих даних зробити висновок про можливість використання ділянок *COI-CO2* та 5S рДНК в оцінці генетичного різноманіття комах.

Об'єкт дослідження – генетичний поліморфізм та еволюція геномів еукаріот.

Предмет – 5S рибосомна ДНК та гени цитохром оксидази *COI* та *CO2*.

Методи дослідження: у процесі підготовки дисертації було використано сучасні лабораторні методи дослідження, зокрема: виділення геномної та плазмідної ДНК, квантифікація ДНК, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), електрофоретичний аналіз, створення рекомбінантних конструктів та клонування фрагментів ДНК, сиквенування ДНК. Також були використані біоінформатичні методи: аналіз сиквенованих послідовностей ДНК, скринінг

геномних баз даних, аналіз повногеномних архівів, вирівнювання послідовностей ДНК та побудова філогенетичних дендрограм.

Наукова новизна роботи.

1. Вперше клоновано та сиквеновано гени *COI-CO2* та повторювані ділянки 5S рДНК для різних підвидів медоносної бджоли *Apis mellifera*, метеликів-шкідників родини Drepanidae та плодових мушок родини Tephritidae.

2. Вперше описано хромосомну локалізацію кластерів 5S рДНК у медоносних бджіл, метеликів та плодових мушок, виявлено новий тип диспергованої організації 5S рДНК у геномах метеликів.

3. Детально описано та проаналізовано молекулярну організацію, поліморфізм та характер мінливості 5S рДНК у досліджуваних видів.

4. Встановлено суттєві відмінності в молекулярній організації та швидкості еволюції 5S рДНК у різних групах комах.

5. Проведено порівняльну оцінку можливостей застосування різних молекулярних маркерів, 5S рДНК та гени *COI-CO2* для баркодингу та реконструкції філогенезу комах.

Особистий внесок здобувача. Дане дисертаційне дослідження являє собою самостійну та оригінальну наукову працю, в якій викладені власні ідеї та розробки, що дозволили виконати поставлені завдання. Всі результати дисертаційної роботи одержані авторкою самостійно. Дисертантка здійснила пошук та аналіз наукової літератури за тематикою дослідження, виконала експериментальну частину роботи та біоінформатичний аналіз отриманих даних. Планування етапів роботи та обговорення результатів проводились спільно із науковим керівником проф. Р.А. Волковим та за участі співавторів відповідних публікацій.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційного дослідження були представлені на міжнародних конференціях: Біологічній секції XX Міжнародної Гамовської конференції-школи «Важливість ідей Г. Гамова для біології 21-ого століття» (Одеса, 2021 та 2022), I Міжнародній науково-практичній конференції «Стале бджільництво в Україні» (Чернівці,

2019), та всеукраїнських: Всеукраїнській конференції молодих вчених ІМБГ з міжнародною участю (Київ, 2021), Науковій конференції «Зоологія в сучасному світі: виклики XXI століття» (Київ, 2021), Всеукраїнській конференції з молекулярної та клітинної біології з міжнародною участю, присвяченій героїчній боротьбі українського народу проти російських загарбників (Київ, 2022).

Публікації. Основні результати висвітлені в 5 наукових публікаціях, серед яких одна стаття, оприлюднена в міжнародному виданні, включеному до науково-метричних баз даних Scopus та Web of Science та чотири статті – у фахових виданнях України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційну роботу викладено на 158 сторінках машинописного тексту. Дисертація складається зі вступу, огляду наукової літератури, опису використаних матеріалів та методів досліджень, отриманих результатів та їх обговорення, висновків, списку використаних джерел літератури та додатків. Робота містить 11 таблиць, 26 рисунків та додаток. Бібліографічний список складається з 183 літературних джерела.

У *вступі* висвітлені загальні характеристики роботи, мета, поставлені завдання, актуальність виконаного дослідження, його об'єкт та предмет. Вказано особистий внесок здобувачки у роботу та матеріали, які засвідчують апробацію отриманих результатів. Окремо також наведено список опублікованих наукових праць за темою дисертації.

Розділ 1, що включає в себе три підрозділи, присвячені огляду наукової літератури за тематикою роботи. Зокрема, стисло згадано історію розвитку молекулярно-генетичних досліджень комах, а також описано в загальному існуючі філогенетичні проблемні питання в межах ряду Комах, вирішення яких є наразі актуальним. Завершується перший розділ характеристикою молекулярних маркерів, які широко використовуються в дослідженні еукаріотичних організмів, а саме – мітохондріальних генів та ядерних рибосомних ДНК.

Розділ 2 містить відомості про використаний для дослідження матеріал та застосовані молекулярно-генетичні та біоінформатичні методи.

Отримані результати висвітлені в *розділі 3*. Зокрема, в межах трьох підрозділів розглянуто структуру та поліморфізм ділянок 5S рДНК та генів *COI-CO2* представників різних груп комах: Перетинчастокрилих (рід *Apis*), Лускокрилих (підродини Drepaninae, Thyatirinae) та Двокрилих (підродини Dacinae, Trypetinae, Tephritinae). Наведено відомості про хромосомну локалізацію та молекулярну організацію цих послідовностей, описано характер молекулярної еволюції 5S рДНК у різних групах комах, проаналізовано переваги та недоліки досліджених ділянок як молекулярних маркерів для баркодингу. Для кожної групи комах наведені ML-дендрограми, які відображають філогенетичні взаємозв'язки між аналізованими представниками на основі порівняння отриманих нуклеотидних послідовностей. Кожен підрозділ в межах третього розділу завершується висновками.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані результати можуть бути використані для молекулярної паспортизації (баркодингу) та ідентифікації комах, зокрема підвидів/порід медоносної бджоли та комах-шкідників. Частина отриманих результатів було впроваджено у селекційну роботу ГО «Спілка пасічників України» та «Асоціація виробників продуктів бджільництва «Буковинський бджоляр»». Окрім того, результати впроваджено в навчальний процес на кафедрі молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича при читанні лекцій та проведенні практичних і семінарських занять з курсів «Загальна та молекулярна ентомологія», «Молекулярна геноміка» та «Молекулярна таксономія».

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Обрана тематика дисертаційної роботи повністю відповідає науковій тематиці кафедри молекулярної генетики та біотехнології Чернівецького національного університету в рамках кафедральної теми: «Структурно-функціональна організація геному та механізми адаптації у еукаріот» (2021-2025; номер

державної реєстрації 0121U111109) та держбюджетної теми «Генетичний поліморфізм, розповсюдженість та адаптаційні здатності українських порід медоносної бджоли» (2020-2022; номер державної реєстрації 0120U102119).

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Основні етапи розвитку таксономії комах

Клас комах (Insecta) на сьогодні становить найчисельнішу та найрізноманітнішу за видовим складом групу організмів (Trautwein et al., 2012; Walker et al., 2018). Детальне їх вивчення та ідентифікація нових видів необхідні для вирішення актуальних питань еволюційної теорії, екології та природоохоронної біології.

З огляду на важливе значення комах, систематика цієї групи традиційно привертає увагу дослідників. В середині вісімнадцятого століття Карл Лінней (1707-1778) в своїй праці «Systema Naturae» описав більш як 10000 видів, серед яких понад 2000 склали комах. Таксономічні назви, які він ввів задля їх упорядкування, базувалися на характеристиках крилець.

Чисельні спроби упорядкувати біорізноманіття комах з використанням анатомо-морфологічних підходів неодноразово робилися й пізніше. Проте, саме через надзвичайно високий рівень видового різноманіття та широкі межі варіабельності морфологічних ознак у філогенетиці комах і досі залишається велика кількість невирішених питань (Tihelka et al., 2021).

Складність реконструкції еволюції комах підштовхнула В. Хенніга до розробки кладистичної систематики, поява якої свого часу стала справжньою революційною подією, що мала наслідки далеко за рамками ентомології (Hennig, 1966; Tihelka et al., 2021). Він висвітлив розбіжності між вихідними та похідними (апоморфними) спадковими ознаками, а також підкреслив важливість побудови класифікації, що базується на монофілетичних групах, які визначаються спільними апоморфними ознаками (синапоморфія). Ці праці стали своєрідним фундаментом для майбутніх обширних морфологічних досліджень філогенії комах та статистичної філогенетики загалом (Farris, 1986). Пізніше було опубліковано чимало робіт, в яких розглядався значно більший

спектр морфологічних ознак в якості доказів існуючої на той час філогенії комах (Kristensen, 1975; Boudreaux, 1979; Grimaldi, 2001).

Наступна революційна подія в вивченні еволюції комах була пов'язана із розвитком молекулярної філогенетики. Перша масштабна робота у цьому напрямку була опублікована в 1989 році і була присвячена порівняльному аналізу послідовності 35S рДНК для 12 видів комах з використанням рестрикційного картування (Wheeler, 1989).

Тривалий час філогенія комах базувалась лише на морфометричних показниках та частково результатах аналізу нуклеотидної послідовності гену 18S рРНК, але згодом спектр маркерних генів, які стали використовуватися для досліджень, значно розширився (Vignal et al., 2002; Grover & Sharma, 2016).

Сучасні геномні та транскриптомні дослідження дозволяють вирішувати вже більш складні питання філогенетики комах. Загалом, станом на 2021 рік було опубліковано більше, як 600 геномів комах, 440 транскриптомів, 1400 мітохондріальних геномів та 69000 ДНК-баркодів (Hotaling et al., 2021; Tihelka et al., 2021).

Отже, використання молекулярних методів стало широко розповсюдженим. Тим не менш, на сьогодні найуспішнішим вважається використання комплексного підходу, який полягає в поєднанні результатів отриманих шляхом класичних морфометричних та сучасних, молекулярно-генетичних методів аналізу.

1.2. Актуальні проблеми таксономії та біогеографії комах

1.2.1. Надрізноманітні групи

Як правило, нові наразі не описані види трапляються серед багатовидових груп (Hamilton et al., 2010; Srivathsan et al., 2019). Яскравим прикладом такої надрізноманітної групи комах є ряд Hymenoptera, в межах якого часто описують нові види (Onuferko & Sheffield, 2022; Ranjiryh et al., 2022; Pham et al.,

2022). Встановлення видових меж в надзвичайно різноманітних групах часто видається складним завданням. У безхребетних ідентифікація видів зазвичай починається з масового забору матеріалу. Для комах одним із розповсюджених методів забору є використання пастки Малеза (Bartholomew & Prowell, 2008; Skvarla et al., 2020). Таким способом вдається зібрати тисячі, а інколи й навіть десятки тисяч особин на певній ділянці. Якісна ідентифікація на видовому рівні при такій кількості досліджуваного матеріалу видається практично неможливою. Це призводить до того, що в природничих музеях можуть тривалий час зберігатись мільярди несорттованих зразків (Srivathsan et al., 2019).

Прикладом проблемної надрізноманітної групи комах в межах ряду Hymenoptera є неотропічний рід мурах *Rasopone* (Schmidt & Shattuck, 2014). Висока морфологічна подібність представників даного роду та часті випадки конвергенції ознак роблять ідентифікацію видів цих мурах надзвичайно складною, особливо серед географічно розділених популяцій. Раніше рід *Rasopone* був охарактеризований за набором морфологічних показників, жоден з яких не видавався беззаперечно аутапоморфним (Longino et al., 2020). Таким чином, виникла потреба в детальному дослідженні з додатковим залученням даних, отриманих шляхом аналізу нуклеотидних послідовностей. Зважаючи на недостатню інформативність невеликої вибірки молекулярних маркерів, науковцями було вирішено застосувати ДНК-баркодинг в комплексі з філогеномним методом – таргетоване «збагачення» ультраконсервативних елементів (UCEs – ultraconserved elements) (Branstetter et al., 2017). Аналіз на основі UCEs дозволяє генерувати тисячі ядерних локусів для досліджуваних зразків на відміну від звичайного ДНК-баркодингу для якого використовують лише один маркерний ген. Такий підхід дає змогу отримувати в кінцевому рахунку вичерпну інформацію для таксонів як високого так і низького рангів. Попередні результати вказали на немонофілетичне походження роду *Rasopone*. Проте, монофілію вдалось «відновити» шляхом перенесення декількох видів до роду *Mayaponera*.

Яскравим прикладом надрізноманітної групи комах є друга за чисельністю в межах ряду *Lepidoptera* родина метеликів-геометрид (*Geometridae*), яка включає близько 23 тисяч добре описаних видів та більше 40 тисяч тих, які все ще потребують детального вивчення (Miller et al., 2016; Beck et al., 2016). Одне з найбільш вичерпних філогенетичних досліджень представників цієї родини було опубліковано у праці Sihvonen et al. (2011). У цій роботі було проаналізовано набір даних для 164 таксонів на основі результатів аналізу послідовностей восьми молекулярних маркерів. Було підтверджено монофілетичне походження більшої частини багатовидових підродин в межах даної родини. Проте, систематичне положення підродин *Oenochrominae* та *Desmobathrinae* залишалося невизначеним, ймовірно через малу вибірку та недостатній рівень інформативності молекулярних маркерів. Відповідно, було висунуте припущення щодо поліфілетичного походження обидвох підродин, яке все ще вимагає уточнення.

З більш як 60 тис. описаними видами, ще однією надрізноманітною групою комах є надродина м'якотілих жуків-довгоносиків *Curculionoidea*, яка традиційно вважалась монофілетичною. Попередні спроби встановити філогенетичні зв'язки таксонів в межах цієї групи долгоносиків з використанням морфометричних та молекулярно-генетичних методів призвели до генерації різних варіантів їх взаємозв'язків (Kuschel et al., 1995; Marvaldi et al., 2002; Hundsdoerfer et al., 2009; Jordal et al., 2011). Більш пізні дослідження долгоносиків, зокрема в межах родини *Curculionidae*, було здійснено на основі комплексу молекулярних маркерів (28S, 16S рДНК та CO1) (Gunter et al., 2016). Результати дозволили отримати докази того, що підродини *Dryophthorinae* та *Platyrodinae* є ймовірно монофілетичними, в той час як підродина *Brachycerinae*, разом з двома основними кладами вищих *Curculionidae* – парафілетичними.

Окрім вищезгаданих, до надрізноманітних таксономічних груп комах також відносять рід двокрилих *Sarcophaga* (Buenaventura et al., 2017), надродину паразитичних ос *Chalcidoidea* (van de Kamp et al., 2022), родину

жуків Zopheridae (Buckley et al., 2020), трибу мурах Crematogastrini (Blaimer et al., 2018) та багато інших. На загал можна стверджувати, що збільшення кількості видів всередині окремого таксону призводить до ускладнення задач, які виникають на шляху розуміння філогенії такої групи. Як показують наведені вище приклади, використання молекулярних методів дозволяє успішно долати такі складності.

1.2.2. Криптичні види. Види-двійники

Враховуючи те, що величезна кількість видів комах досі не описана в літературі, їх каталогізація та детальний аналіз є важливим завданням, оскільки така інформація безпосередньо впливає на розуміння масштабів біорізноманіття певних таксонів. Особливо складною є проблема криптичних видів комах, яка інтенсивно досліджувалась за останні два десятиліття, в основному завдяки впровадженню молекулярно-генетичних методів дослідження (Bickford et al., 2006).

Частина авторів вважає, що термін «криптичні види» є синонімом до терміну «види-двійники» (Saez & Lozano, 2005). В той же час, інші вказують на більш раннє походження терміну «криптичні види» порівняно з визначенням «види-двійники». В роботі Bickford et al. (2006) два або більше видів прийнято вважати криптичними в тому випадку, коли вони були класифіковані як єдиний номінальний вид за зовнішніми ознаками. Окрім того, деякі автори схиляються до думки, що криптичні види обов'язково повинні демонструвати недавню дивергенцію та відрізнитись лише за даними нуклеотидних послідовностей. Додатково також висувалась вимога щодо репродуктивної ізоляції. Хоча ідентифікація криптичних видів відіграє не останню роль для розуміння глобального біорізноманіття, цьому питанню все ще приділено недостатньо уваги (Gill et al., 2016).

В статусі криптичних на сьогоднішній день знаходиться велика кількість видів в межах класу Insecta. Зокрема, до таких видів можна віднести плодових

мушок-шкідників з родини Tephritidae, котрі включають в себе таксономічно описані види, які насправді можуть виявлятися географічними варіантами одного й того ж виду (Hendrich et al., 2015). Водночас, деякі популяції цих мушок, які таксономічно згруповані в межах одного виду, демонструють різні ознаки, включаючи репродуктивну ізоляцію, що дозволяє припустити їх дивергенцію на різні види (Clarke & Schutze, 2014). З огляду на це, невизначеність таксономічного статусу може призводити до неправильних стратегій щодо захисту сільськогосподарських культур, шкідниками яких є представники родини Tephritidae. Завдяки інтегративному таксономічному підходу були детально проаналізовані біологія, цитогенетика, екологія, морфологія та фізіологія основних комплексів криптичних видів мушок-тефритід. У випадку з видом *Anastrepha fraterculus* було показано, що він складається з комплексу різних видів немонофілетичного походження, які демонструють територіальний та екологічний розподіл. Для групи *Ceratis* були отримані докази існування п'яти різних видів в межах цього таксону. Також було виявлено, що вид *Bactrocera cucurbitae* являє собою парафілетичне угруповання, наслідком чого стало віднесення підроду *Zeugodacus* в родовий статус. В результаті вид *Bactrocera cucurbitae* отримав нову назву *Zeugodacus cucurbitae* (Hendrich et al., 2015).

Існування великої кількості криптичних видів та явище «прихованого» різноманіття є складним питанням і для представників ряду Lepidoptera. Більша частина ранніх робіт по систематиці проблемних таксонів метеликів наразі вимагають повного перегляду з залученням молекулярно-генетичних методів. Прикладом цього може бути вид *Astrartes fuligator* (Hesperiidae), вперше описаний в 1775 році. І якщо раніше питань щодо його статусу не виникало, то результати досліджень популяцій цього метелика на північному заході Коста-Ріки підтвердили факт існування щонайменше десяти різних видів в комплексі *Astrartes fuligator* (Hebert et al., 2004).

В неоднозначному статусі криптичних видів/видів-двійників знаходяться також метелики роду *Leptidea* (Pieridae). Було виявлено, що вид *Leptidea sinapis*,

який широко розповсюджений в Палеарктиці, «приховує» криптичний вид *Leptidea reali* (Lorković, 1993). Згодом для цих двох видів було проведене комплексне дослідження на основі цитологічного аналізу, маркерних послідовностей ядерного та мітохондріального геномів та морфометрії генітальних препаратів (Dincă et al., 2011). Результати показали, що вид *L. reali* насправді складається з двох синморфних, проте генетично та каріологічно відмінних груп. Виявилось, що нові індивідууми ймовірно є сестринськими до *L. sinapis* + *L. reali*, утворюючи криптичний комплекс. Відповідно, була висунута гіпотеза про те, що група *L. sinapis* + *L. reali* насправді може являти собою триплет криптичних видів.

Іншою родиною метеликів, яка являє собою важку для ідентифікації таксономічну групу, є родина *Lycaenidae* (Синявці), представники якої надзвичайно подібні між собою за зовнішніми ознаками (Lukhtanov et al., 2019). Види даної родини, наприклад підтриби *Polyommata*, дуже слабо диференціюються за морфологією, проте значно відрізняються за розміром та кількістю хромосом, зокрема тих, що несуть в собі кластери рДНК (Vershina et al., 2015). На відміну від інших, добре вивчених родин метеликів, представникам *Lycaenidae* зазвичай не вистачає добре проілюстрованих визначників/каталогів, довідників та оновлених контрольних списків для різних територій. Складність при спробах класифікувати їх, висока зовнішня подібність, невеликий розмір, високе видове різноманіття та обмежене географічне розповсюдження окремих груп в межах даної родини є найімовірнішими причинами того, що певні таксони метеликів-ліценід все ще недостатньо досліджені. Поряд з цим, спостерігаються випадки описів нових видів в межах даної родини (Safian et al., 2021).

Не дивлячись на досить великий розмір та легко впізнаване яскраве забарвлення деякі види роду *Bombus* (Hymenoptera) теж є криптичними. Особливо важко вдається ідентифікувати північноамериканські симпатричні види підроду *Pyrobombus*: *B. vagans*, *B. sandersoni* та *B. perplexus* (Milam et al., 2020). Ще одним відомим прикладом в межах ряду Hymenoptera є вид-

паразитоїд *Encyrtus sasakii*, який нещодавно був розділений на три криптичні види, які чітко диференційовані за нуклеотидними послідовностями, проте практично не відрізняються за морфологічними ознаками (Rudoy et al., 2022).

Дослідження криптичних видів приводить до нового розуміння моделей та процесів біорізноманіття, включаючи масштабну переоцінку видового різноманіття загалом та їх географічні відмінності в поширенні (Fišer et al., 2017). Останнім часом практично всі подібні роботи базуються на комплексній методології, основою якої є детальний аналіз нуклеотидних послідовностей молекулярних маркерів.

1.2.3. Інтродукція комах та явище гібридизації

На сьогодні, значна кількість видів комах вважається інтродукованими, що, в свою чергу, становить одну із серйозних загроз біорізноманіттю (McLaughlin & Dearden, 2019). Шляхи їх ввезення в нехарактерні для них середовища існування можуть бути різними, але більшість з них інтродукуються завдяки діяльності людини (Gippen et al., 2019). Проте не всі інтродуковані види в кінцевому рахунку є особливо небезпечними. Деякі з них можуть бути швидко еліміновані, а інші – ефективно контролюватись завдяки різним відповідним процедурам (Simberloff, 2009). Тим не менш, навіть не дивлячись на існування успішних стратегій щодо контролю інтродукованих популяцій, окремі випадки інтродукції можуть призводити до серйозних екологічних та економічних наслідків (McLaughlin & Dearden, 2019). Однією з проблем, що безпосередньо становить загрозу, є явище гібридизації, яке може виникати внаслідок неконтрольованих випадків схрещування інтродукованих та аборигенних видів. Подібні ситуації в кінцевому рахунку можуть призводити до стрімкого збідніння генофонду місцевих/локальних популяцій, або ж до тотального їх витіснення з природнього середовища існування.

Питання інтродукції та гібридизації гостро постає серед комах-запилювачів ряду Hymenoptera. Не дивлячись на загальну тенденцію глобального скорочення кількості запилювачів, деякі представники ряду

Нуменоптера стали надзвичайно успішними інвазійними видами, чисельність яких значно перевищує ту, що спостерігалась на їх природній території розповсюдження. Одним з прикладів цього є вид джмелів *Bombus terrestris*, який походить з Євразії та Північної Африки. Господарчі потреби призвели до його вимушеної інтродукції до Японії, Нової Зеландії, Південної Америки та Тасманії. Завезений спочатку в Чилі, він згодом колонізував північно-західну Патагонію, Аргентину, і до цих пір активно розповсюджується південною частиною континенту (Morales et al., 2013). Було встановлено, що чисельність та щільність популяцій цього виду як мінімум в три рази перевищує аналогічні характеристики майже вимерлого близькоспорідненого виду *B. dahlbomii*.

Схожа ситуація спостерігається і для африканського підвиду медоносної бджоли *A. mellifera scutellata*, котрий монополізував чисельні квіткові ресурси в Неотропіках. В 50-х роках минулого століття даний підвид був завезений на територію Бразилії з ціллю подальшого схрещування з раніше інтродукованими європейськими підвидами. Проте, не дивлячись на успішні спроби схрещування, було виявлено, що африканські підвиди, колонізуючи території з місцевими європейськими підвидами, призводять до поступового зникнення характеристик останніх (Schneider et al., 2003). З того часу, ця адаптована до тропічних умов раса бджіл поширилась південними, центральними та південно-західними територіями Америки. У деяких місцевостях різниця в розповсюдженні та запиленні даним видом певних квіткових рослин, порівняно з іншими локальними комахами-запилювачами, була надзвичайно великою (Aizen et al., 2014).

Застосування мітохондріальних молекулярних маркерів (*CO1*, *ND*, *CO1-CO2*) показало, що медоносна бджола *A. mellifera* диференційована на 35 підвидів, які належать до 4 еволюційних ліній (Ruttner, 1988; Garnery et al., 1992; Arias & Sheppard, 1996; Franck et al., 2000). Проте на основі мікросателітних локусів і рестриктного картування рестриктазою *DraI* локусу *CO1-CO2* мтДНК, виявилися нові, раніше невідомі еволюційні гілки: бджоли підвиду *A. m. jemenitica*, що мешкають на території Республіки Ємен і які

згодом були віднесені до еволюційної гілки Y, а також бджоли підвиду *A. m. syriaca*, які освоїли територію Сирії, та увійшли в еволюційну гілку Z (Alburaki et al., 2013). Таким чином, за сучасними молекулярно-генетичним даними, підвиди бджіл *A. mellifera* підрозділяються на шість еволюційних гілок: A, M, C, O, Y, Z.

Протягом останніх десятиліть в Європі пасічники активно практикували переміщення на великі відстані різних підвидів *A. mellifera*. І навіть якщо це не було систематичним явищем, інтродукція неаборигенних порід та опосередкована діяльністю людини гібридизація призвели до серйозного порушення просторового розподілу еволюційних гілок та підвидів медоносних бджіл (Cherevatov et al., 2014; Cherevatov et al., 2016; Cherevatov et al., 2019; Requier et al., 2019). Початково, на території Європи існувало три еволюційні гілки *A. mellifera*: гілка M (підвид *A. m. mellifera*, «темна європейська бджола») ареал якої охоплює Британські острови, Західну та Північну Європу від Атлантичного узбережжя до Уральських гір, та гілка C (підвиди *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* та *A. m. macedonica*) представники якої поширились південніше Альпійських та Карпатських гірських хребтів (Ruttner, 1988). Третя еволюційна гілка A (африканська) була представлена в Середземномор'ї в результаті вторинного контакту між європейськими та африканськими підвидами (Sanovas et al., 2008). В деяких країнах було відмічено зменшення популяції західно- та північноєвропейського підвиду *A. m. mellifera* внаслідок гібридизації, що згодом призвело до створення організацій, націлених на захист даного підвиду. Зокрема на території Німеччини, де особливо успішно здійснювалась інтродукція нових ліній бджіл, практично всі особини на сьогоднішній день являють собою гібриди чотирьох підвидів: *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* та *A. m. caucasica* (Oleksa et al., 2011).

На сьогодні, медоносні бджоли інтродуковані на територіях Азії, Північної Америки, Південної Америки та Австралії, внаслідок чого змішані популяції бджіл існують як в контрольованому, так і в дикому стані. Розуміння генетики та структури популяцій медоносних бджіл надзвичайно важливі для

підтримання їх генетичного різноманіття, виявлення геномних локусів з корисними ознаками, і в кінцевому рахунку для подальшої розробки ефективних програм щодо їх селекції (Carpenter & Harpur, 2021). З'ясування видового/підвидового складу аборигенних популяцій постає гострим питанням з огляду існування загрози щодо їх зникнення. Морфологічні ознаки у гібридизованих колоній можуть сильно варіювати, що суттєво знижує достовірність та навіть унеможливує їх коректну ідентифікацію з використанням традиційного морфометричного аналізу (Cherevatov et al., 2014; Cherevatov et al., 2016; Тимочко та ін., 2023). Тому з огляду на існуючі проблеми вивчення популяцій медоносних бджіл потребує залучення сучасних молекулярно-генетичних методів, які передбачають детальний аналіз за нуклеотидними послідовностями.

1.3. Молекулярні маркери у дослідженні філогенії комах

1.3.1. Мітохондріальні маркери. ДНК-баркодинг

Для ентомологічних досліджень, станом на сьогодні, доступний надзвичайно широкий спектр молекулярних маркерів. Використання ДНК маркерів здійснило справжню революцію в біологічних науках, значно розширивши межі можливостей досліджень. Одними із найінформативніших ДНК-маркерів для комах вважаються поліморфні локуси мітохондріальної ДНК (мтДНК).

Послідовності мтДНК набули надзвичайно широкого розповсюдження в якості маркерних при проведенні досліджень у галузях систематики, філогенетики, еволюційної біології та екології. Це пов'язано із технічною зручністю в використанні, материнським успадкуванням, відсутністю рекомбінації та швидкою еволюцією цих маркерів (Dong et al., 2021). Найчастіше саме з аналізу генів мтДНК розпочинаються масштабні філогенетичні дослідження комах.

Мітогеном комах являє собою кільцеву дволанцюгову молекулу ДНК довжиною, як правило, 15-18 тис. нп (Cameron et al., 2014). В її межах виділяють 37 генів, серед яких 13 кодують мітохондріальні білки, 2 – рибосомні РНК, 22 – транспортні РНК, та міжгенні спейсерні послідовності, в яких розташовані елементи, що беруть участь в регуляції реплікації та транскрипції генів мтДНК. Продукти генів (*ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*, *COI*, *COII*, *COIII*, *ATP6*, *ATP8* та *Cyt b*) кодують субодиниці білків, які входять до електрон-транспортного ланцюга мітохондрій.

Мітохондріальна ДНК характеризується відносно високою частотою виникнення мутацій. Як правило, це пов'язують з вторинними метаболітами, а також з менш строгими механізмами репарації порівняно з ядерним геномом (Freeland et al., 2020). Швидкість еволюції цих білок-кодувальних генів досить різна. До прикладу, гени *ND* демонструють більш високий рівень швидкості заміни нуклеотидів, у порівнянні з генами *CO*. Проте, не дивлячись на різні темпи еволюції, саме АТ-багата послідовність гену *COI* найчастіше використовується в якості інструменту при молекулярно-генетичних дослідженнях комах (Jung et al., 2011; Porter et al., 2014; Magoga et al., 2022).

Метою широкомасштабного ДНК-баркодингу є розробка всеохоплюючої бібліотеки референтних видоспецифічних послідовностей ДНК для всіх еукаріот – Barcode of Life Datasystem (BOLD). Найбільш поширений серед тварин ДНК-баркод (DNA-barcode) на основі гену *COI* мтДНК достатньо легко сиквенується, забезпечує більш як 97% видоспецифічності для таксонів різного рангу, а також визнаний інформативним маркером для ідентифікації криптичних видів (Iftikhar et al., 2016). Перевага у використанні локусів мтДНК для досліджень комах полягає у тому, що багато цільових фрагментів мітогеному можна легко ампліфікувати з використанням універсальних праймерів, створених на основі висококонсервативних мітохондріальних генів. Окрім того, продукти ампліфікації мітогеному комах можна успішно використовувати для генотипування за допомогою поліморфізму довжин

рестрикційних фрагментів (RFLP – restriction fragment length polymorphisms) (Behura, 2006).

Доцільність використання послідовностей мтДНК в якості молекулярних маркерів була продемонстрована при дослідженні метелика *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae), де для генів *CO1*, *CO2*, *ND1*, та *ND5* була продемонстрована варіабельність мітотипів в різних популяціях (Li et al., 2014). Ідентифікація криптичних видів на базі аналізу нуклеотидних послідовностей мтДНК була описана для паразитичних соєвих попелиць *Aphis glycines* (Homoptera: Aphididae) (Desneux et al., 2009). Успішним виявилось застосування *CO1* в комплексі з 16S рРНК і для метабаркодингу, в результаті якого вдалось ідентифікувати близько 243 таксономічних одиниць з подальшим їх групуванням в окремі кластери (Elbrecht et al., 2016).

Ділянки мтДНК широкого використовуються у дослідженнях медоносних бджіл (Oleksa et al., 2011; Tozkar, 2020; Abou-Shaara et al., 2021; Porrini et al., 2021; Utzeri et al., 2021). Неодноразово було продемонстровано, що послідовності мітогену є інформативними, коли постає питання щодо коректної ідентифікації їх видів/підвидів. Поряд з традиційною морфометрією, аналіз на основі мтДНК з використанням в якості молекулярного маркеру послідовності генів, що кодують судобиниці цитохром оксидази (*CO1*, *CO2*), дозволяє швидко та ефективно розрізнити основні еволюційні лінії *A. mellifera* (Cherevatov et al., 2019).

Проте, використання ділянок мітогену має і певні обмеження та недоліки. До ряду таких недоліків відносять деградацію ДНК гербаризованих/архівованих зразків, яка перешкоджає нормальній ампліфікації фрагментів довжиною більше, ніж 200 нп. Часто це пов'язано з молекулярним аналізом викопних решток. З іншого боку, за великого розміру досліджуваної вибірки, зокрема при метабаркодингу, існує проблема варіабельності окремих ділянок в місцях гібридизації праймерів, що стає причиною вимушеного підбору специфічних пар праймерних послідовностей для окремих таксонів. Суттєве обмеження в використанні становить також і материнське

успадкування мтДНК, яке не дозволяє в повній мірі проаналізувати внутрішньовидові та міжвидові філогенетичні взаємозв'язки різних груп комах.

Вагомою перешкодою в молекулярно-генетичних дослідженнях з використанням мітогеному є також існування генерованих ядром нефункціональних копій генів мтДНК (NUMT – nuclear copies of mitochondrial DNA). Такі копії були описані для багатьох видів (Kim et al., 2006; Behura et al., 2007; Gonzalez-Ittig & Gardenal, 2008). Випадкова ампліфікація фрагментів NUMT може стати справжньою проблемою в філогенетичних та систематичних дослідженнях, які базуються на вивченні особливостей мтДНК. Як наслідок, порівняння негомологічних послідовностей не дає змоги в повній мірі дослідити еволюційні взаємозв'язки між досліджуваними таксонами (Den Tex et al., 2010; Ozana et al., 2022)

1.3.2. Маркери ядерного геному. Рибосомні ДНК

Достовірне встановлення філогенетичних взаємозв'язків у таксонах різного рангу в межах класу Insecta часто видається неможливим, якщо спиратись лише на дані, отримані шляхом аналізу мтДНК. Зокрема, це стосується таких швидко еволюціонуючих груп комах як Hymenoptera, Strepsiptera, Phthiraptera, Hemiptera та Thysanoptera (Talavera & Vila, 2011). В той час, як порівняння послідовностей мтДНК може демонструвати один патерн взаємовідносин, аналіз ядерних маркерів часто призводить до інших (Nie et al., 2019). Цілком очевидною виглядає потреба в співставленні та поєднанні результатів, отриманих шляхом порівняння різних нуклеотидних послідовностей.

Ядерний геном порівняно з мітогеномом має набагато більші розміри та кодує значно ширший спектр білків. Серед маркерів ядерного геному еукаріот найбільшого поширення набули повторювані послідовності (мультигенні родини, мікро- та макросалетіти, транспозони, ретротранспозони та ін.) та деякі

гени (Borland & Kading, 2021). Особливого поширення набули мікросателіти. Ці прості повторювані послідовності присутні у геномах усіх еукаріот, демонструють високі рівні поліморфізму та слідуєть простим/звичним шляхом еволюції (Zhang & Hewitt, 2003).

Серед окремих генів інформативними маркерами можуть слугувати гени транскрипційного фактору *EF-1 α* (Simon et al., 2010; Wu et al., 2010), аргінінкінази *ArgK* (Jordal & Cognato, 2012; Dzurenko et al., 2021) та тріозофосфатізомерази *Tpi* (Acharya et al., 2021). Проте, переважна кількість робіт по дослідженню філогенії комах зосереджена на аналізі саме повторюваних послідовностей, серед яких значна частка припадає на гени рибосомних РНК (рДНК).

Перевага рибосомних генів пов'язана з технічною зручністю у використанні, оскільки присутність у геномі еукаріот в вигляді великої кількості копій дає змогу ефективно ампліфікувати такі локуси. З іншого боку вибір рДНК в якості молекулярного маркеру пов'язаний з більш швидким темпом їх еволюції порівняно з іншими ядерними генами (Alvarez & Hoy, 2002; Bakar et al., 2019; Kaur & Singh, 2020). Рибосомні ДНК являють собою зручний інструментарій в молекулярно-генетичних дослідженнях не лише комах, а й рослин (Garcia et al, 2017; Ishchenko et al, 2018; Tynkevich & Volkov, 2019; Ferher et al, 2021; Ishchenko et al, 2021; Vozarova et al, 2021).

Організовані рДНК тандемно, в кластери, складаючись з консервативних кодувальних ділянок та варіабельних міжгенних спейсерів. Досить проста будова притаманна генам 5S рРНК, локуси яких складаються з багаточисельних копій, високо консервативних кодувальних ділянок розміром ~120 нп, які розмежовані поліморфними міжгенними спейсерами (IGS) (Vierna et al., 2013; Patwardhan et al., 2014).

Більш складна будова характерна для локусів 35S рДНК, де одна повторювана одиниця містить кодувальні ділянки 18S, 5.8S та 28S, які розділені спейсерними ділянками – зовнішніми (external transcribed spacers, ETS) і

внутрішніми (internal transcribed spacers, ITS) транскрибованими та нетранскрибованими (non-transcribed spacer, NTS).

Локалізація та число копій тандемних кластерів 5S та 35S рДНК у еукаріот може відрізнятися. Зокрема відомо, що кількість копій може варіювати в залежності від типу клітин або віку особини (Ding et al., 2022). Наприклад, втрата копій внаслідок старіння була встановлена для собак (Johnson and Strehler, 1972), та клітин крові людини (Stults et al., 2008). Варіації в числах копій рДНК між різними штамми нематоди *Caenorhabditis elegans* були оцінені за допомогою повногеномного секвенування (Farslow et al., 2015). Для генів 35S рРНК число копій знаходилось в межах від 33 до 418, а для 5S рРНК – від 39 до 438. Окрім того, в ході аналізу рибосомних генів виду *C. elegans* було виявлено, що в геномі даної нематоди присутній лише один тип 5S рДНК з невеликою кількістю одонуклеотидних поліморфізмів в межах кодувальної ділянки. В той же час у геномі близькоспорідненого нематоді виду *C. briggsae* було показано присутність двох різних типів 5S рДНК; також виявилось, що ділянка гену може бути розташована в оберненій орієнтації (Stein et al., 2003).

Проте, не зважаючи на відмінності у розташуванні, молекулярна організація рДНК досить консервативна у різних організмів (Salim & Gerton, 2019). Як правило, послідовності 5S рДНК володіють досить низьким рівнем внутрішньогеномного поліморфізму завдяки їх гомогенізації, яка є результатом кросинговеру та генної конверсії у наборах тандемних повторюваних ділянок рДНК. Наслідком гомогенізації є концертний (узгоджений) характер еволюції рДНК (Eickbush & Eickbush, 2007). Тим не менш, були опубліковані дані стосовно внутрішньогеномного поліморфізму рДНК, який було виявлено у деяких організмів, головним чином в області міжгенного спейсера. Ці дані не знаходять пояснення в рамках концепції концертної еволюції. Тому для кращого розуміння еволюції 5S рДНК були запропоновані інші еволюційні гіпотези: «народження і смерті» та/або змішані моделі (Ubeda-Manzanaro et al., 2010; Perina et al., 2011; Vierna et al., 2011). Механізми гомогенізації повторів 5S рДНК можуть значно відрізнятися в межах різних таксономічних груп (Pinhal et

al., 2011; Vizoso et al., 2011; Vierna et al., 2013; Barman et al., 2016; Bueno et al., 2016; Ding et al., 2021).

Власне, висока подібність кодувальних ділянок та швидка еволюція спейсерних ділянок зробили рДНК зручним інструментом для вивчення філогенетики різних таксономічних груп комах. Докази філогенетичної інформативності окремих локусів 35S рДНК були продемонстровані в дослідженнях медоносних бджіл (Gillespie et al., 2006; Bakar et al., 2019), жуків родини Chrysomelidae (Coleoptera) (Nie et al., 2019), довгоносиків з родини Curculionidae (Coleoptera) (Kumar et al., 2018), паразитичних двокрилих з родини Tachinidae (Diptera) (Smith et al., 2006), різних родин метеликів (Rafter et al., 2022; Palting & Moore, 2022; Kergoat et al., 2021) та багатьох інших груп.

Комбіноване дослідження нуклеотидних послідовностей 28S рДНК, гену рибосомного білку RPS5 та мітохондріального гену *COI* було використане у філогенетичному аналізі для перевірки монофілії раніше запропонованих підтриб метеликів в межах триби Lithosiini (Erebidae: Arctininae) (Palting & Moore, 2022). Ще одним завданням роботи було з'ясування приналежності до підтриб північноамериканських родів Lithosiini, які зустрічаються на північ від Мексики. В результаті проведеної ревізії, вдалося синонімізувати трибу Eudesmiina до Cisthenina та з високою статистичною підтримкою довести монофілію триби Cisthenina, яка включає три неарктичні роди: *Gardinia* Kirby, *Bruceia* Neumögen та *Ptychoglène* Felder. Висновок про монофілію Cisthenina підтримується двома апоморфіями, виявленими у дорослих комах цієї триби.

Аналогічний експериментальний дизайн був використаний для молекулярної дискримінації двох морфологічно подібних криптичних видів метеликів, які розрізняють в межах комплексного виду - *Eueupithecía cisplatensis* Prout (Lepidoptera: Geometridae) (Rafter et al., 2022). В цій роботі автори поруч з 28S рДНК та *COI* використали ядерний ген білку CAD. Виявилось, що два криптичні види чітко відрізняються за послідовністю всіх трьох маркерів. Проте, гаплотипи ядерних генів в окремих випадках не чітко розподілялись по представниках цих видів, можливо, через рідкісні або давні

випадки гібридизації між ними або через неповне сортування ліній. Хоча такий результат ускладнює ідентифікацію криптичних видів, він несе додаткову інформацію, що може бути використана для їх подальших досліджень.

Ще одним прикладом застосування комбінованого набору даних ядерної та мітохондріальної ДНК (28S, 16S рДНК і *COI*) була реконструкція філогенії австралійських довгоносиків надродина *Curculionoidea*, включаючи аналіз часу еволюційної дивергенції основних ліній (Gunter et al., 2016). Автори дослідження зазначають, що отримані ними дані значною мірою співпадають із даними молекулярних філогеній з іншими наборами маркерів. Це дозволяє впевнено окреслити таксономічні групи високого порядку, підтвердити їх монофілетичне походження та прослідкувати філогенетичні зв'язки між ними. Проте, використання зазначеного набору маркерів не дозволило достовірно розділити таксони нижчого порядку в межах *Curculionoidea*, зокрема, підродина. Ймовірною причиною цього є низький рівень мінливості кодувальних ділянок 35S рДНК. Отже, для покращення роздільної здатності філогенетичних досліджень на внутрішньородинному рівні варто використовувати більш мінливі ділянки рДНК.

На противагу кодувальним ділянкам, висока еволюційна мінливість внутрішніх транскрибованих спейсерів (ITS1-2) 35S рДНК робить їх ефективними навіть для популяційного аналізу в межах окремих видів. Прикладом такого аналізу є дослідження генетичної варіації серед окремих особин довгоносиків *Odoiporus longicollis* з родини *Curculionidae*, зібраних із шести віддалених локацій на території Індії (Kumar et al., 2018). Результати показали, що локації не диференційовані, тобто, між ними існує потік генів. Автори дослідження підкреслюють важливість отриманої інформації для розробки стратегій боротьби з неконтрольованим розмноженням цього виду, який є небезпечним шкідником бананових плантацій, а також для управління його стійкістю до інсектицидів.

Використання ділянки ITS1 35S рДНК також дозволило детектувати явища гібридизації у паразитоїдних мух роду *Belvosia* (Diptera: Tachinidae), що

не вдалось показати із застосуванням для ДНК-баркодингу ділянки мітохондріального геному *COI* (Smith et al., 2006).

На противагу 35S рДНК, організація, поліморфізм та еволюція 5S рДНК у комах досліджена набагато гірше. Зокрема, для медоносної бджоли було проаналізовано повногеномний архів, в межах якого вдалось ідентифікувати два різних за довжинами варіанта IGS 5S рДНК (Vierna et al., 2013). FISH-гібридизація з видоспецифічними зондами для генів 5S рРНК, не дивлячись на оптимізовані протоколи експерименту, дозволила ідентифікувати хромосомні локуси 5S рДНК лише у декількох видів метеликів (Provaznikova et al., 2021). Отримані результати наводять на думку, що ймовірно специфічна геномна локалізація 5S рДНК у метеликів не дозволяє проводити успішне картування цієї ділянки. У зв'язку з цим було висунуто гіпотезу щодо нетандемної організації 5S рДНК у лускокрилих та/або присутності цих генів в межах кластеру у вигляді малої кількості копій. Останнє висунуте припущення вдалось підтвердити результатами, отриманими після проведення кількісних ПЛР (Provaznikova et al., 2021).

Хромосомна організація 5S рДНК була вперше описана й для твердокрилих (Cabral-de-Mello et al., 2010). Картування с використанням подвійної флуоресцентної гібридизації *in situ* показало, що гени 18S рРНК присутні на 3 та 4 хромосомі, в той час як 5S рДНК та гени гістонів колокалізуються на 2 хромосомній парі (Cabral-de-Mello et al., 2010).

ВИСНОВКИ З ОГЛЯДУ ЛІТЕРАТУРИ ТА ПОСТАНОВКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ЗАДАЧ

Аналіз наявної наукової літератури свідчить, що на сьогодні у філогенетиці комах існують чисельні відкриті питання, які частково висвітлені вище. Особливо важливим та актуальним видається використання молекулярних методів для коректної ідентифікація видів (баркодинг) та

реконструкції філогенетичних зв'язків для проблемних таксономічних груп. Для вирішення цих питань доцільно застосувувати мітохондріальних та ядерних молекулярних маркерів. Проте, можливість використання різних маркерів залежить від швидкості молекулярної еволюції та характеру мінливості відповідних ділянок геному. Зокрема, перспективним високо мінливим молекулярним маркером, придатним для дослідження таксонів низького рангу видається ядерна 5S рДНК, але на сьогодні характер мінливості, молекулярна організація та еволюція цієї ділянки геному у комах вивчені недостатньо. Тому, метою даної дисертаційної роботи було дослідити організацію та еволюцію 5S рДНК та можливість її використання в якості молекулярного маркеру у порівнянні з популярним мітохондріальним маркером CO1 для представників трьох рядів комах: Hymenoptera (Перетинчастокрилі), Lepidoptera (Лускокрилі) та Diptera (Двокрилі).

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали для дослідження

Матеріалом для дисертаційного дослідження були комахи в межах Перетинчастокрилих (рід *Apis*), Лускокрилих (підродини Drepaninae, Thyatirinae) та Двокрилих (підродини Dacinae, Труретинае, Тephritinae). Збір матеріалу проводився протягом 2017-2021 років. У роботі використовувались як свіжі особини, так і консервовані в спиртовому розчині. Назви, походження та скорочення назв всіх аналізованих нами комах наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Основні характеристики досліджуваного матеріалу

Видова назва	Скорочена назва	Походження	GenBank Acc. No.
Hymenoptera (<i>Apis</i>)			
<i>Apis mellifera carnica</i>	CarnGB	БД GenBank	GCA_013841245.1
	Gov	селекційний матеріал «Говерла», Закарпатська обл.	MZ328120 MZ328121 MZ328122
	Rakh	селекційний матеріал «Рахівська», Закарпатська обл.	MZ328123 MZ328124 MZ328125 MZ328126 MZ328127
	SI97	оригінальний матеріал Singer, Австрія	–
	SKL47	оригінальний матеріал Slkenar, Австрія	–
	Syn	селекційний матеріал «Синевир», Закарпатська обл.	–
	Troisek 1075	оригінальний матеріал Troisek, Австрія	–

	Vuchkivska	селекційний матеріал «Вучківська», Закарпатська обл.	–
<i>A. m. caucasica</i>	CauGB	БД GenBank	GCA_013841205.1
	Cau G2	Грузія	–
	Cau G3	Грузія	–
	Cau GX	Грузія	–
<i>A. m. intermissa</i>	IntGB	БД GenBank	
<i>A. m. ligustica</i>	LigGB	БД GenBank	GCA_019321825.1
	Lig1	Італія	–
	Lig2	Італія	–
<i>A. m. macedonica</i>	Mcd1 (Greece)	Афон, Греція	–
	Mcd6	Афон, Греція	–
<i>A. m. mellifera</i>	MelGB	БД GenBank	GCA_003314205.2
	Mel1	Миколаївська обл.	–
	Mellifera GB	БД GenBank	KJ396183
<i>A. mellifera ssp</i>	ApmGB1	БД GenBank	GCA_003254395.2
	ApmGB2	БД GenBank	GCA_000002195.1
	Chk5	Черкаська обл	–
	Egyp1	Синайський півострів, Єгипет	–
	IF4	Івано-Франківська обл.	–
	IF5	Івано-Франківська обл.	–
	Ital1	Центральна Італія	–
	Kyv1	Київська обл.	–
	Khm148 Khmelnyskiy	Хмельницька обл.	–
	Peremyslyany	Львівська обл.	–
	Selyatin	Чернівецька обл.	–
	Ust-Putyla	Чернівецька обл.	–
	Yarmolyntsi	Хмельницька обл.	–
<i>A. cerana</i>	CerGB1	БД GenBank	GCA_001442555.1

	CerGB2	БД GenBank	GCA_011100585.1
Lepidoptera (Drepanidae, Noctuidae)			
<i>Achlya flavicornis</i>	AcFlaGB	БД GenBank	GCA_947623365.1
<i>Apamea monoglypha</i>	ApMon	м. Чернівці	–
<i>Drepana arcuata</i>	DrArc	БД GenBank	GCA_016069955.1
<i>Drepana falcataria</i>	DrFal	БД GenBank	GCA_945859725.1
<i>Habrosyne pyritoides</i>	HaPyrGB	БД GenBank	GCA_907165245.1
	HaPyr1	м. Чернівці	–
<i>Ochropacha duplaris</i>	OcDupGB	БД GenBank	GCA_951361185.1
<i>Omphisa fuscidentalis</i>	OmFusGB	БД GenBank	ON869463.1
<i>Tetheella fluctuosa</i>	TeFluGB	БД GenBank	GCA_951216915.1
<i>Thyatira batis</i>	ThBatGB	БД GenBank	GCA_905147785.1
	ThBat1	м. Чернівці	–
<i>Watsonalla binaria</i>	WaBinGB	БД GenBank	GCA_929442735.1
Diptera (Tephritidae)			
<i>Anastrepha obliqua</i>	AnOblGB	БД GenBank	GCF_027943255.1
<i>Bactrocera dorsalis</i>	BaDorGB	БД GenBank	GCA_023373825.1
<i>Chaetostomella sp. n.</i>	Chaet1	м. Херсон	–
<i>Terellia winthemi</i>	TeWinGb	БД GenBank	MZ627991.1
<i>Terellia ruficauda</i>	TeRufGB	БД GenBank	OK065342.1
<i>Terellia serratulae</i>	TeSerGB	БД GenBank	KU884690.1
	TeSerGB2	БД GenBank	KU884689.1
<i>Terellia nigripalpis</i>	TeNigGB	БД GenBank	OP071062.1
<i>Terellia longicauda</i>	TeLonGB	БД GenBank	OP071054.1
<i>Terellia fuscicornis</i>	TeFusGB	БД GenBank	OP071049.1

<i>Terellia quadratula</i>	TeQuaGB	БД GenBank	OP071064.1
<i>Terellia colon</i>	TeColGB	БД GenBank	MZ633745.1
<i>Terellia plagiata</i>	TePlaGB	БД GenBank	MZ632037.1
<i>Terellia colon</i>	TeColGB	БД GenBank	GQ175806.1
<i>Terellia ruficauda</i>	TeRufGB	БД GenBank	GQ175811.1
<i>Terellia serratulae</i>	TeSerGB	БД GenBank	GQ175810.1
<i>Terellia tussilaginis</i>	TeTusGB	БД GenBank	GQ175808.1
<i>Terellia virens</i>	TeVirGB	БД GenBank	GQ175809.1
<i>Terellia florescentia</i>	Teflo1	Чернівецька обл.	–
<i>Terellia longicauda</i>	Telon1 Telon2	Київська обл.	–
<i>Terellia plagiata</i>	Tepla1	Чернівецька обл.	–
<i>Terellia pseudovirens</i>	Tepse1	–	–
<i>Terellia serratulae</i>	Teser1	Чернівецька обл.	–
<i>Terellia sp. n.</i>	Tespn1	м. Херсон	–
<i>Terellia winthemi</i>	Tewit1	Чернівецька обл.	–
<i>Tephritis variata</i>	Tevar1	–	–
<i>Urophora affinis</i>	UrAffGB	БД GenBank	JF867669.1
<i>Urophora cuspidata</i>	UrCusGB	БД GenBank	MZ626007.1
<i>Urophora jaceana</i>	UrJacGB	БД GenBank	MZ629523.1
<i>Urophora solstitialis</i>	UrSolGB	БД GenBank	MZ626048.1
<i>Urophora quadrifasciata</i>	UrQuaGB	БД GenBank	KR524237.1
<i>Urophora terebrans</i>	UrTerGB	БД GenBank	GQ175820.1
<i>Urophora congrua</i>	UrConGB	БД GenBank	GQ175819.1
<i>Urophora cuspidata</i>	UrCusGB	БД GenBank	GQ175818.1

<i>Urophora stylata</i>	UrStyGB	БД GenBank	GQ175817.1
<i>Urophora quadrifasciata</i>	UrQuaGB	БД GenBank	GQ175816.1
<i>Urophora sp. n.</i>	Urspn1	Туреччина	–
<i>Urophora dzieduszyckii</i>	Urodz1		–
<i>Urophora n. soltitialis</i>	Ursol1	м. Херсон	–
<i>Urophora n. terebrans</i>	Urter1	м. Херсон	–
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	ZeCucGB	БД GenBank	GCA_028554725.2

2.2. Методи досліджень

Екстракція ДНК з тіла комах

Для виділення загальної ДНК з тіла комах використовували свіжезловлений або консервований в 70% розчині етанолу матеріал. Крильця комах окремо відпрепарували та зберігали. Саму екстракцію ДНК проводили цетавлоновим методом із внесенням певних модифікацій (Schiebelhut et al., 2017).

Схема виділення ДНК включала наступні етапи:

1. Тіло комахи, від якого було відокремлено крильця, заморожували за допомогою рідкого азоту та швидко розтирали в ступці не допускаючи відтанення.
2. До частково гомогенізованого матеріалу додавали 1-2 мл лізис-буферу, до складу якого входять: 10% цетавлон, 100 мМ трис-НСІ (рН 8,0), 20 мМ ЕДТА, 1,5 М NaCl, 0,1% β-меркаптоетанол. В присутності лізис-буферу продовжували розтирання матеріалу.
3. Отриманий гомогенат переносили в центрифужні мікропробірки, після чого залишали на водяній бані при 65°C протягом 1-2 години для продовження лізису.

4. Після лізису розчин центрифугували 15 хв при 11-12 тис. г. Отриманий супернатант переносили в чисті центрифужні мікропробірки.
5. Депротейнізацію проводили за допомогою екстракції сумішшю хлороформ-ізоаміловий спирт (24:1). Обробку проводили тричі. Причому, першу екстракцію проводили рівним об'ємом суміші фенол + хлороформ-ізоаміловий спирт у співвідношенні 1:1. Подальші дві екстракції здійснювали з використанням лише рівного об'єму хлороформ-ізоамілового спирту.
6. До отриманого після депротейнізації супернатанту додавали 2 об'єми розчину для осадження (склад: 1% цетавлон, 0,015 М NaCl), після чого пробки залишали при кімнатній температурі на 1 год.
7. Для осадження комплексу ДНК-цетавлон пробірки центрифугували 10 хв. при 13 тис. г. Утворений осад розчиняли в 200 мкл 1,5 М NaCl.
8. Повторювали екстракцію рівним об'ємом суміші хлороформ-ізоаміловий спирт. Водну фазу переносили у чисту пробірку.
9. Для обезсолювання ДНК переосаджували додаванням 0,6 об'єму ізопропанолу з подальшим центрифугуванням 10 хв. при 13 тис. г.
10. Утворений осад промивали 70% етанолом, після чого підсушували при 37 °С та розчиняли у 100 мкл буферу TE (10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЕДТА).

Концентрацію отриманої ДНК вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop ND-1000.

Електрофорез ДНК в агарозному гелі

Нативність препаратів ДНК перевіряли шляхом електрофоретичного розділення в 1% агарозному гелі. Для проведення електрофорезу використовували 1×TBE буферну систему. Сам електрофорез складався з наступних етапів:

1. Готували агарозний гель потрібної концентрації. Для аналізу геномної/плазмідної ДНК використовували гель у концентрації 1-1,5 %, ПЛР-продуктів - 1,5-2 %.
2. Колбу з наважкою агарози та буфером TBE розігрівали в мікрохвильовій печі. Отриманий розчин охолоджували до 45-50°C та додавали етидій бромід до кінцевої концентрації 10 мкг/мл.
3. Збирали форму для гелю, заливали розчин агарози та вставляли гребінки.
4. Після застигання гелю переносили форму в камеру для проведення електрофорезу та заливали її буферним розчином 1×TBE. Після цього обережно витягували гребінки не пошкоджуючи лунки.
5. Наносили проби ДНК попередньо змішані з буфером для нанесення (1×TE, 50% гліцерин, 0,25% розчин бромфенолового синього) на гель, у лунки під буфер.
6. У вільну лунку наносили ДНК-маркер (GeneRuler™ DNA Ladder Mix #0331).
7. Електрофорез проводили при напруженості електричного поля 5 В/см. За проходженням електрофорезу спостерігали по тому, яку відстань пройшов лідуєчий барвник.
8. Після проведення електрофорезу гель обережно переносили на скло транслюмінатора та в ультрафіолетовому світлі розглядали та фотографували ДНК. Квантифікацію ДНК проводили використовуючи програмне забезпечення приладу GelDoc 2000 (BioRad, США).

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Для проведення ПЛР-ампліфікації використовували праймери, комплементарні до фрагментів цільових маркерних послідовностей. Послідовності праймерів наведені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Перелік використаних праймерів

Цільовий ген	Назва праймеру	Послідовність
<i>COI</i>	Lep-F1 Lep-R1	5`-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3` 5`-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA-3`
<i>COI-CO2</i>	RV1509 RV1510	5` - CCACGACGTTATTCAGACTATCCA – 3` 5` - CATATGATCAATATCATTGATGACCAA – 3`
5S рДНК	RV0803 RV0804 RV1406	5`-CATAGCGGCCGCGTGGTCAGTACTTGGATGGGTGA-3` 5`-CATTGCGGCCGCTTGCTTGACTTCGGTGATCGGA-3` 5`-CATGGCGGCCGCGTACGTAGCTTGACTTTGGTGATCG-3`

Розрахунок складу реакційних сумішей для ПЛР здійснювали згідно паспортних даних використовуваних полімераз. Усі маніпуляції по приготуванню сумішей проводили на льоду. ПЛР проводили на приладі PTC-100 (MJResearch, Inc., США). Приклад типової програми, яка використовувалась, наведена нижче:

1. Активація полімерази: 94°C, 4 хв.
2. Плавлення ДНК: 94°C, 45 с.
3. Гібридизація праймерів: 48°C, 1 хв.
4. Елонгація :72°C, 50 с.
5. Повернення до кроку №2: 4 рази
6. Плавлення ДНК: 94°C, 45 с.
7. Гібридизація праймерів: 52°C, 1 хв.
8. Елонгація: 72°C, 50 с.
9. Повернення до кроку №6: 30 разів
10. Кінцева елонгація: 72°C, 7 хв.
11. Охолодження: 4°C.

В залежності від цільової ділянки для аналізу та використання певної полімеразної суміші температура та час початкової активації ферменту, гібридизації праймерів та елонгації могли відрізнятись. Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації здійснювали в 2% агарозному гелі.

Очистка продуктів ампліфікації

1. До отриманих ампліфікатів додавали рівний об'єм суміші хлороформ-ізоамілового спирту, інтенсивно струшували та центрифугували протягом 5 хв при 13 тис. g. Повторювали два рази.

2. Супернатант переносили в чисту мікропробірку, додавали до нього 2 об'єми 96% етанолу та 1/10 об'єму 5M NaCl, після чого залишали суміш на ніч при -20°C осадження фрагментів ДНК.

3. Після цього суміш центрифугували протягом 10 хв. при 13 тис. g, після чого відбирали супернатант, утворений осад підсушували на термоблоці.

4. Осад розчиняли в 11 мкл бідистильованої води або TE.

Електрофоретичний аналіз очищених ПЛР-продуктів здійснювали в 2% агарозному гелі.

Розщеплення ДНК ендонуклеазами рестрикції

Реакційну суміш для розщеплення ПЛР-продуктів ендонуклеазами рестрикції містила наступні компоненти:

- ПЛР-продукт – 6 мкл
- Бідистильована вода – 2,6 мкл
- 10× реакційний буфер – 1 мкл
- Ендонуклеоза рестрикції (10 од./мкл) – 0,4 мкл

Загальний об'єм суміші складав 10 мкл

Приготування реакційних сумішей проводили на льоду. Суміш інкубували при температурі 37°C протягом 16 год. (час обробки окремими ендонуклеазами рестрикції змінювали згідно рекомендацій виробника). Реакцію зупиняли інкубацією суміші при температурі 65°C протягом 10 хв. або додаванням барвника для електрофорезу.

Аналіз продуктів рестрикції здійснювали методом електрофорезу у 2% агарозному гелі.

Лігування продуктів ампліфікації у плазмідний вектор

Продукти ПЛР 5S рДНК лігували у плазмідний вектор з використанням двох наборів для клонування: Cloning Jet (Thermo Fisher Scientific, USA) або pGEM®-T EasyVector System (Promega Corporation, USA).

Cloning Jet. Лігування з використанням цього набору здійснюється за тупими кінцями; вектор – pJet 1.2. Суміш для лігування загальним об'ємом 10мкл включала в себе:

- ПЛР- продукт – 0,5-1 мкл
- 2× реакційний буфер – 5 мкл
- фермент для утворення тупих кінців – 0,5 мкл
- бідистильована вода – до 9 мкл

Суміш інкубували 10 хв при 70°C. Потім додавали 0,5 мкл T₄ ДНК лігази та 0,5 мкл розчину вектора. Інкубували 1 год при 22 °C. Після цього проводили депротейнізацію суміші з хлороформ-ізоаміловим спиртом. Водяну фазу збирали центрифугуванням. Далі здійснювали трансформацію компетентних клітин *E. coli* рекомбінантним конструктором. Колонії-трансформанти отримували з використанням методу скринінгу за летальним геном, оскільки плазміда pJet1.2 містить ген, що є летальним для *E. coli*. Після успішного лігування вставки цей ген стає неактивним, тобто трансформанти, що містять вставку, можна ідентифікувати за здатністю до виживання на поживному середовищі. Наявність вставок очікуваного розміру перевірялась за допомогою ПЛР.

pGEM®-T Easy Vector System. Використання цього набору передбачає лігування за липкими кінцями. Вектор, який використовується у цій системі, має на обох 3'-кінцях неспарений нуклеотид T, що зменшує імовірність самолігування плазмід. Суміш для лігування містила:

- ПЛР- продукт – 0,5-1 мкл
- вектор pGEM – 1 мкл
- 2× реакційний буфер – 5 мкл
- T₄ ДНК лігаза – 1 мкл
- бідистильована вода – до 10 мкл

Суміш перемішували та інкубували на термоблоці при 22°C протягом години. Інактивацію ферменту здійснювали протягом 15 хв при 65°C. Очистку утворених продуктів лігування проводили як описано вище. Далі здійснювали трансформацію та подальшу селекцію колоній зі вставками. Наявність вставок потрібного розміру перевіряли шляхом ампліфікації.

Отримання компетентних клітин *Escherichia coli*

Для перенесення рекомбінантних плазмід в бактеріальні клітини застосовували метод електропорації. Перед проведенням трансформації готували компетентні клітини *E. coli* (лінія XL-BLUE) за наступним протоколом:

1. Проводили інокуляцію 200 мл середовища LB (0,1% бакто-пептон, 0,05% бакто-дріжджовий екстракт, 0,1% NaCl) 5 мл нічної кільтури *E. coli*. Оптична густина культури (довжина хвилі – 600 нм) після зараження становила 0,03-0,04.
2. Нарощування бактерій проводили за 37°C на качалці при 180-200 об/хв, протягом трьох годин. Після нарощування оптична густина культури становила 0,5-0,7.
3. Клітини збирали центрифугуванням при 10000 g протягом 15 хв. за температури 4°C.
4. Осад клітин ресуспендували у розчині 10% гліцерину за 4°C та збирали центрифугуванням при 1500 g протягом 10 хв.
5. Далі осад знову ресуспендували у 10% гліцерині і центрифугували з поступовим зменшенням об'єму.

6. Остаточного осад клітин ресуспендували у 1000 мкл 10% гліцерину за 4°C, фасували порціями по 50 мкл та зберігали за температури -70°C.

Трансформація компетентних клітин *E. coli* методом електропорації

1. Заморожені компетентні клітини розморожували на льоду, додавали до них 10 мкл розчину рекомбінантного конструкту, концентрація якого становила 2 нг/мкл.

2. Клітини перемішували, переносили в охолоджену кювету для електропорації і одразу ж проводили трансформацію на приладі *E. coli* Pulser (BioRad, США).

Електропорація проводилась у наступних умовах:

- напруга $U=1,8$ кВ;
- напруженість електричного поля 12,5 кВ/см;
- тривалість імпульсу 3,2-3,8 мс.

3. Після трансформації до бактеріальної суспензії додавали 500 мкл поживного середовища, після чого бактерії інкубували за 37°C, 45 хв.

4. Після інкубації суспензію коротко центрифугували та відбирали надосадову рідину так, щоб у мікропробірці залишилось близько 100 мкл.

5. Бактеріальний осад ресуспендували у залишку середовища та наносили на чашку Петрі з агаризованим середовищем LB із додаванням ампіциліну у концентрації 100 мг/л.

6. Чашки з бактеріями інкубували в термостаті протягом ночі за 37°C.

Виділення плазмідної ДНК

Виділення плазмідної ДНК з колоній *E. coli* здійснювалось методом лужного лізису, поетапна схема якого наведена нижче.

1. Пробірки з нічною культурою, отримані після нарощування в рідкому середовищі LB відібраних колоній з рекомбінантними плазмідами, центрифугували протягом 15-20 хв. при 3000 g.

2. Утворений осад ресуспендували у 100 мкл розчину S1 (склад: 50 мМ глюкоза, 25 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ ЕДТА) на вструшувачі. Отриману суспензію переносили у чисті мікропробірки.

3. До суспензії клітин додавали 200 мкл розчину S2 (1% SDS, 0,2М NaOH) та інкубували за кімнатної температури приблизно 3 хв.

4. Далі до суміші додавали 150 мкл розчину S3 (3М ацетат калію, 5М оцтова кислота, рН = 5,0) та інкубували на льоду 10 хв. до утворення білої маси.

5. Пробу центрифугували протягом 10 хв. при 13 тис. г.

6. Супернатант обережно відбирали у чисту мікропробірку та додавали до нього 1000 мкл 96% етанолу. Розчин залишали на ніч в морозильній камері за -20°C.

7. Осад плазмідної ДНК збирали центрифугуванням протягом 10 хв. при 13 тис. г.

8. Відбирали супернатант та підсушували осад на термоблоці за 37°C.

9. Отриманий осад розчиняли у 50 мкл бідистильованої води.

10. До отриманого розчину додавали 50 мкл 5М ацетату амонію та перемішували, обережно перевертаючи мікропробірку.

11. Центрифугували 5-10 хв. при 13 тис. г.

12. Відбирали супернатант, додавали до нього 100 мкл суміші хлороформ-ізоаміловий спирт, струшували та центрифугували протягом 10 хв. при 13 тис. г. Цю обробку проводили двічі.

13. Відбирали супернатант та додавали 0,6 об'єму ізопропанолу. Отриманий розчин залишали в морозильнику за -20°C на ніч.

14. Плазмідну ДНК збирали центрифугуванням протягом 10 хв при 13 тис. г, а отриманий осад промивали 80% етанолом.

15. Підсушений осад розчиняли у 20 мкл буферу TE.

Сиквенування та біоінформатичний аналіз послідовностей

ПЛР-продукти сиквенувались на фірмах GATCBiotech та LGS Genomics за методом Сенгера. Отримані первинні послідовності порівнювались та

аналізувалися за допомогою програми Chromas та пакету комп'ютерних програм Lasergene. Пошук гомологічних послідовностей та анотованих геномів в GenBank здійснювали методом BLAST.

Аналіз анотованих геномів з бази даних GenBank

Пошук повторів 5S рДНК в межах зібраних геномів на рівні хромосом/скефолдів в базі даних GenBank проводили методом BLAST. Для пошукового запиту використовували повну послідовність CDS 5S рДНК з сиквенованих нами клонів для відповідних таксономічних груп. Хромосоми або скефолди, в яких були ідентифіковані послідовності 5SpДНК завантажувались на локальний комп'ютер. Після чого кожна збірка (асемблінг) аналізувалися окремо. Повтори 5S рДНК шукали, використовуючи алгоритм Smith–Waterman імплементований в програмі UGENE. Ідентифіковані послідовності 5S рДНК копіювали в програму SnapGene Viewer, де анотували і зберігали у форматах FASTA та GenBank.

Вирівнювання та філогенетичний аналіз

Нуклеотидні послідовності вирівнювали з використанням методів E-INS-I та G-INS-i на онлайн-сервері MAFFT alignment (Kato et al., 2019). Параметри обирались відповідно до специфіки аналізованих послідовностей. Для побудови ML-філодендрограм використовували онлайн сервіс IQ-Tree (<http://www.iqtree.org/>). Алгоритм побудови дерева – maximum likelihood. Модель заміщення нуклеотидів визначалась вбудованим інструментом на сервері IQ-Tree. Візуалізацію дендрограм здійснювали в онлайн утиліті iTOL (<https://itol.embl.de/>).

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Використання гену *CO2* та 5S рДНК для оцінки генетичного поліморфізму медоносної бджоли *Apis mellifera* L.

Медоносна бджола (*Apis mellifera* L.) належить до поліморфних видів з великою кількістю підвидів, поширених в Європі, Азії та Африці (Ruttner, 1988; Garnery et al., 1992). Ці підвиди еволюційно виникли в результаті адаптації до місцевих еколого-географічних факторів. Зокрема, у зв'язку зі значним різноманіттям природних умов, Україна вважається територією природного розповсюдження трьох підвидів *A. mellifera*: *A. m. mellifera*, *A. m. carnica* та *A. m. macedonica*, на генетичній основі яких сформувались три аборигенні породи: Темна європейська, Карпатська та Українська степова (Ruttner, 1988; Cherevatov et al., 2019). Коректна ідентифікація цих підвидів/порід має важливе значення для стабільного бджільництва і збереження аборигенної медоносної бджоли в Україні (Neumann & Carreck, 2010).

Внаслідок господарської діяльності людини, природні ареали розповсюдження *A. mellifera* зазнали негативних змін (Van der Zee et al., 2009; Brodschneider, 2016; Федоряк та ін., 2018). Морфометричні дослідження, які були попередньо проведені у нашій лабораторії, показали, що на сьогодні на українських пасіках переважно зустрічаються гібридні форми бджіл, які не відповідають стандартам жодної породи (Cherevatov et al., 2014; Cherevatov et al., 2016). Оскільки морфологічні ознаки бджіл у колоніях гібридного походження сильно варіюють, визначення генетичного складу локальних популяцій медоносної бджоли не може бути здійснено із застосуванням лише морфометричних методів та потребує використання молекулярних маркерів (Achou et al., 2015; Pentek-Zakar et al., 2015). Особливо актуальним є застосування молекулярних маркерів для ідентифікації генетичного матеріалу Карпатської та Української степової порід, які є найбільш розповсюдженими в Україні (Ruttner, 1988; Cherevatov et al., 2019; Григорчук та ін., 2020). У цьому розділі ми вирішили оцінити можливість застосування мітохондріальних генів *CO1-CO2* та ядерної 5S рДНК для ідентифікації підвидів/порід *A. mellifera*.

3.1.1. Використання поліморфізм гену *CO2* для ідентифікації підвидів/порід медоносної бджоли

Аналіз нуклеотидної послідовності ділянки гену *CO2* використовували для оцінки генетичного поліморфізму українських порід *A. m. mellifera*. Зразки робочих бджіл, отримані з трьох областей – Чернівецької, Львівської та Хмельницької порівнювали з референтними зразками для відомих порід бджоли медоносної. У якості референсів для підвиду *A. m. carnica* використовували зразок популярної західноєвропейської лінії Troisek 1075, а також, зразок лінії Карпатської породи – Vuchkivska. Для підвиду *A. m. macedonica* в якості еталону був взятий зразок з Греції (Greece), яка є природним ареалом для цього підвиду. Окрім того, ми використали для аналізу послідовність гена *CO2* з зібраного мітогеному для підвиду *A. m. mellifera*, наявного у базі даних GenBank (номер доступу в базі даних наведений у табл. 2.1).

Праймери, які використовувались для ампліфікації наведено у таблиці 2.2. Отримані ПЛР-продукти сиквенували, а нуклеотидні послідовності порівнювали з референтними послідовностями (рис. 3.1.1).

В результаті порівняння спейсерної ділянки *CO2* досліджуваних зразків був виявлений відносно високий рівень гомології між ними та з послідовністю, взятої для порівняння з бази даних GenBank. Поруч із цим, в деяких ділянках присутній одонуклеотидний поліморфізм (single nucleotide polymorphism, SNP), який зумовлює розподіл досліджуваних зразків на дві групи.

У бджіл з Чернівецької та Львівської областей так як і у референтних зразків ліній Карпатської породи Vuchkivska та австрійської Troisek 1075 ділянки *CO2* виявились ідентичними. Водночас, відносно у еволюційно віддаленої групи, до якої належать зразок темної європейської бджоли та інші порівнювані зразки, була знайдена специфічна транзиція T → C (SNP №2 – див. рис. 3.1.1).

бджоли, краще пристосованими до змін клімату, спостерігається в наш час і в інших європейських країнах (Parejo et al., 2016).

На загал проведений нами аналіз ділянки *CO2* показує, що ідентифіковані в межах цього гену специфічні SNP дозволяють ідентифікувати аборигенні українські породи *A. mellifera*. У Чернівецькій області, на території гірської частини нами виявлено бджіл, які по материнській лінії походять від Української степової та від Карпатської порід. Співіснування на одній території гірських та рівнинних порід бджіл, ймовірно пов'язане з їх антропогенною інтродукцією.

У попередніх дослідженнях нашої лабораторії було використано порівняння нуклеотидної послідовності іншого мітохондріального гена *CO1* для оцінки розповсюдження в Україні різних підвидів/порід *A. mellifera*. Були виявлені специфічні SNP для порід бджоли медоносної поширених в Україні: Темної європейської, Карпатської та Української степової. Аналіз отриманих даних показав, що сучасне розповсюдження цих порід не співпадає з межами традиційного районування, причиною чого може бути популярна в Україні практика завозу генетичного матеріалу бджоли медоносної з різних регіонів, наслідком чого є неконтрольована гібридизація, яка становить загрозу для збереження аборигенних порід *A. mellifera* в Україні (Череватов та ін., 2020). На можливість застосування генів *CO1* та *CO2* для ідентифікації різних підвидів медоносної бджоли вказують і інші дослідники (Alburaki et al., 2013).

На загал, наявні на сьогодні дані свідчать, що гени *CO1* та *CO2* можуть бути використані для ідентифікації видів/порід *A. mellifera*, зокрема – українських аборигенних порід. Проте, недоліком є те, що успадкування цих молекулярних маркерів відбувається тільки по материнській лінії, що обмежує їх використання для встановлення походження гібридних форм. Для вирішення цього питання необхідно застосування молекулярних маркерів ядерного геному.

3.1.2. Організація 5S рДНК у видів роду *Apis*

3.1.2.1. Клонування повторів 5S рДНК та біоінформатичний скринінг геномів у GenBank

На першому етапі дослідження для отримання послідовностей 5S рДНК медоносної бджоли було використано клонування та сиквенування. Аналіз отриманих послідовностей показав, що всі досліджені клони містять рекомбінантну вставку, на обох кінцях якої присутні фрагменти CDS включно з використаними для ампліфікації праймерами.

Крім того, було здійснено біоінформатичний аналіз наявних в GenBank дев'яти анотованих геномів *A. mellifera* та двох геномів її найближчого родича – бджоли воскової, *A. cerana*. Загалом вдалось ідентифікувати 238 послідовностей IGS 5S рДНК (табл. 3.1.1 та 3.1.2). Порівняння всіх ідентифікованих послідовностей IGS показало, що у геномах видів роду *Apis* присутні IGS двох типів, короткі S (short) та довгі L (long). Розміри IGS S-типу варіюють в межах 234-254 нп (табл. 3.1.1), а L-типу – 706-714 нп (табл. 3.1.2). Ці результати свідчать про низький рівень внутрішньогеномного поліморфізму за довжиною в межах IGS S- та L-типів.

Таблиця 3.1.1.

Характеристика IGS S-типу 5S рДНК *Apis mellifera* та *A. cerana*

Підвид	Назва зразка	Походження зразка	Назва риботипу	Структурний варіант	IGS	
					Довжина, нп	Вміст GC-пар, %
<i>A. m. carnica</i>	Goverla	Закарпатська обл.	Gov3-3 ³¹	A2a	237	22,8
			Gov3-4 ³⁴	B	247	21,5
			Gov3-5 ¹	A1a1	252	21,0
	Rakhivska	Закарпатська обл.	Rakh3-1	A1a1	252	21,4
			Rakh3-2	A1d	249	22,5

			Rakh3-3	A1b	251	21,5
			Rakh3-4 ¹⁵	A1d	253	22,1
			Rakh3-5 ⁵	A1b	253	22,5
	Singer 97	Австрія	SI97.3-1	A1d	250	22,0
			SI97.3-5	A2a	238	22,7
	Sklenar	Австрія	SKL47.2-2 ³	A1a1	251	21,1
			SKL47.2-3	B	244	21,7
			SKL47.2-4	A1f	250	22,0
	Synevyr	Закарпатська обл.	Syn15.1-1	A1j	237	21,9
	GCA_013841 245.1	Genbank	CarnGB-1 ²²	A1f	251	21,9
			CarnGB-2 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CarnGB-3 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CarnGB-4 ³	A1a	251	21,1
			CarnGB-5	A1a	251	20,7
			CarnGB-6 ²⁰	A1f	248	21,4
			CarnGB-7 ¹	A1a1	252	21
			CarnGB-8 ²¹	A1f	251	21,5
			CarnGB-9 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CarnGB-10 ²⁶	A2a	237	22,8
			CarnGB-11 ¹⁰	A1c	247	22,3
			CarnGB-12 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CarnGB-13 ²⁶	A2a	237	22,8
			CarnGB-14 ¹⁰	A1c	247	22,3
			CarnGB-15 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CarnGB-16	A1c	246	22,8
			CarnGB-17	A1d	251	22,7
CarnGB-18			A2a	241	24,9	
CarnGB-19 ³²			A2a	237	22,4	
CarnGB-20 ³¹			A2a	237	22,8	
CarnGB-21			B	244	21,3	
CarnGB-22			A1h	234	19,2	
CarnGB-23 ²³			A1j	237	21,5	
CarnGB-24 ³⁰			A1a2	251	22,3	
CarnGB-25 ¹⁸			A1f	250	21,6	
CarnGB-26 ¹⁶			A1d	246	21,1	
<i>A. m. caucasica</i>	Caucasica G2	Грузія	Cau2-3	A1j	237	21,9
			Cau2-5	B	244	21,7
			Cau2-7	A1i	237	21,1
			Cau2-8	A1g	251	21,1
			Cau2-10	A1a1	252	21,0
	Caucasica G3	Грузія	Cau3-1	A1a1	252	21,0
			Cau3-4	A1g	246	21,1
			Cau3-5	A1h	237	21,1
			Cau3-9	A1a1	254	21,6
			Cau3-10	A1h	240	20,8
	Caucasica GX	Грузія	CauX-1	A1i	237	21,9

			CauX-5	A1h	234	19,2
			CauX-8	A1i	237	21,5
			CauX-9	A1g	246	20,7
			CauX-10	A1i	237	21,1
	GCA_013841 205.1	Genbank	CauGB-1 ³³	A1h	236	19,9
			CauGB-2 ⁹	A1c	248	21,8
			CauGB-3 ²⁷	B	244	21,7
			CauGB-4 ²⁷	B	244	21,7
			CauGB-5 ²⁸	B	245	22
			CauGB-6 ²³	A1j	237	21,5
			CauGB-7 ³⁰	A1a2	251	22,3
			CauGB-8 ³²	A2a	237	22,4
			CauGB-9 ¹³	A1d	250	22,4
			CauGB-10	A1f	250	22
			CauGB-11 ¹⁰	A1c	247	22,3
			CauGB-12 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CauGB-13 ²⁶	A2a	237	22,8
			CauGB-14 ¹⁰	A1c	247	22,3
			CauGB-15 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CauGB-16 ²⁶	A2a	237	22,8
			CauGB-17 ¹⁰	A1c	247	22,3
			CauGB-18 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CauGB-19	A1a1	251	20,7
			CauGB-20	A1f	250	22
			CauGB-21 ²⁶	A2a	237	22,8
			CauGB-22 ¹⁰	A1c	247	22,3
			CauGB-23	A1f	250	21,2
			CauGB-24 ⁴	A1a1	252	20,6
			CauGB-25 ⁸	A1c	249	22,5
			CauGB-26	A1f	251	21,1
			CauGB-27 ¹	A1a1	252	21
			CauGB-28 ²⁰	A1f	248	21,4
			CauGB-29 ²	A1a1	252	21,4
			CauGB-30 ¹⁹	A1f	248	21,8
			CauGB-31 ¹	A1a1	252	21
			CauGB-32 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CauGB-33 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CauGB-34	A1f	250	22
			CauGB-35 ¹⁹	A1f	248	21,8
			CauGB-36 ³	A1a1	251	21,1
			CauGB-37 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CauGB-38 ¹⁷	A1f	250	21,6
			CauGB-39 ¹⁶	A1d	246	21,1
			CauGB-40 ²²	A1f	251	21,9
<i>A. m. intermissa</i>	GCA_000819 425.1	Genbank	IntGB-2	A1b	250	20,8
<i>A. m.</i>	Ligustica II	Італія	Lig1-1	A1h	239	20,1

<i>ligustica</i>			Lig1-2	A1d	250	22,4
	Ligustica I2	Італія	Lig2-1 ⁵	A1b	253	22,5
			Lig2-2	A1d	253	22,3
			LigGB-1 ⁶	A1b	250	22,8
	GCA_019321 825.1	Genbank	LigGB-2 ¹⁵	A1d	253	22,1
			LigGB-3 ⁶	A1b	250	22,8
			LigGB-4 ¹⁵	A1d	253	22,1
			LigGB-5 ¹⁵	A1d	253	22,1
			LigGB-6 ¹⁵	A1d	253	22,1
			LigGB-7 ⁵	A1d	253	22,5
			LigGB-8 ¹⁵	A1d	253	22,1
			LigGB-9 ¹⁵	A1d	253	22,1
			LigGB-10 ⁵	A1d	253	22,5
			LigGB-11 ¹⁵	A1d	253	22,1
			LigGB-12 ¹⁵	A1d	253	22,1
			LigGB-13 ¹⁷	A1f	250	21,6
			LigGB-14 ²⁶	A2a	237	22,8
			LigGB-15 ¹⁰	A1c	247	22,3
			LigGB-16 ¹⁷	A1f	250	21,6
			LigGB-17 ¹⁰	A1c	247	22,3
			LigGB-18 ¹⁷	A1f	250	21,6
			LigGB-19 ¹⁰	A1c	247	22,3
			LigGB-20 ¹⁷	A1f	250	21,6
			LigGB-21 ³¹	A2a	237	22,8
			LigGB-22 ¹⁴	A1d	250	22
			LigGB-23 ¹³	A1d	250	22,4
			LigGB-24 ³²	A2a	237	22,4
			LigGB-25 ³¹	A2a	237	22,8
			LigGB-26 ¹⁴	A1d	250	22
			LigGB-27	A1d	252	23
			LigGB-28 ³²	A2a	237	22,4
			LigGB-29 ³¹	A2a	237	22,8
			LigGB-30	A1d	250	22
			LigGB-31	A1d	250	22
			LigGB-32 ³²	A2a	237	22,7
			LigGB-33 ³¹	A2a	237	22,8
			LigGB-34	A1d	247	21,9
			LigGB-35	A1g	249	21,3
			LigGB-36 ³²	A2a	237	22,4
			LigGB-37 ³¹	A2a	237	22,8
			LigGB-38 ¹⁴	A1d	250	22
			LigGB-39	A1d	250	22,8
			LigGB-40 ³²	A2a	237	22,4
			LigGB-41 ³¹	A2a	236	22,9
	LigGB-42	A1d	250	22		
LigGB-43 ³²	A2a	237	22,4			
LigGB-44 ³⁰	A1a2	251	22,3			

			LigGB-45	A1i	237	21,9
			LigGB-46 ²³	A1j	237	21,5
			LigGB-47 ²⁸	B	245	22
			LigGB-48 ²⁷	B	244	21,7
			LigGB-49 ²⁷	B	244	21,7
			LigGB-50 ⁹	A1c	248	21,8
			LigGB-51 ³³	A1h	236	19,9
<i>A. m. macedonica</i>	Macedonica 1	Греція	Mcd1-3	A1c	245	21,2
			Mcd1-4	A2a	237	23,2
			Mcd1-5 ¹⁰	A1c	247	22,3
	Macedonica 6	Греція	Mcd6-2	A1g	243	20,6
			Mcd6-3	A1i	237	21,9
			Mcd6-6	A1g	237	21,9
<i>A. m. mellifera</i>	Mellifera	Миколаївська обл.	Mel1-10 ³⁴	B	247	21,5
	GCA_003314 205.2	Genbank	Mel1-11 ³¹	A2a	237	22,8
			MelGB-1	A2b	237	21,5
			MelGB-2 ¹²	A1d	250	22,4
			MelGB-3	A2a	236	22,9
			MelGB-4	A2a	237	22,8
			MelGB-5	A2b	237	21,9
			MelGB-7 ¹¹	A1c	247	21,9
			MelGB-8	A1c	247	21,5
			MelGB-9 ²⁵	A2b	237	20,7
			MelGB-10 ¹²	A1d	250	22,4
			MelGB-11	A0	236	22
			MelGB-12	A1c	243	21,8
			MelGB-13	A2b	237	21,5
			MelGB-14	A1d	250	22,8
			MelGB-15	A0	237	21,9
			MelGB-16	A1c	239	21,8
			MelGB-17 ²⁵	A2b	237	20,7
			MelGB-18 ¹¹	A1c	247	21,9
			MelGB-24	A1d	253	21,7
MelGB-27	B	248	21,8			
MelGB-28	C	247	18,6			
<i>A. mellifera ssp</i>	Cherkasy 5	Черкаська обл.	Chk5-1	A1a1	252	21,0
			Chk5-2	A1d	253	21,7
	Egypt 1	Синайський півострів, Єгипет	Egyp1-1	A1c	250	23,2
			Egyp1-3	A1f	247	22,7
			Egyp1-6	A1c	247	22,3
	Ivano-Frankivsk 4	Івано-Франківська обл.	IF4-2	A1d	253	22,9
			IF4-3 ¹⁵	A1d	253	22,1
	Ivano-Frankivsk 5	Івано-Франківська обл.	IF5-1 ⁵	A1b	253	22,5
			IF5-3 ¹⁸	A1f	250	21,6
	Italy 1	Центральна Італія	Ital1-6	A1i	237	21,5
			Ital1-9	A1g	244	21,3
Kyiv 11	Київська обл.	Kyv1-4	A0	236	22,0	

			Kyv1-7	A1a1	252	21,4
Khmelnysky 148	Хмельни- цька обл.		Khm148-1 ²⁷	B	244	21,7
			Khm148-3	A1j	241	21,6
			Khm148-4	A1d	250	22,0
			Khm148-5 ¹⁷	A1f	250	21,6
			Khm148-6 ³⁰	A1a2	251	22,3
			Khm148-7	A1a2	252	21,0
GCA_003254 395.2	Genbank		ApmGB1-1 ²³	A1j	237	21,5
			ApmGB1-2 ³⁰	A1a2	251	22,3
			ApmGB1-3	C	243	18,5
			ApmGB1-4 ¹⁷	A1f	250	21,6
			ApmGB1-5 ²⁶	A2a	237	22,8
			ApmGB1-6 ¹⁰	A1c	247	22,3
			ApmGB1-7 ¹⁷	A1f	250	21,6
			ApmGB1-8 ⁴	A1a1	252	20,6
			ApmGB1-9 ⁸	A1c	249	22,5
			ApmGB1-10 ²¹	A1f	251	21,5
			ApmGB1-11 ¹	A1a1	252	21
			ApmGB1-12 ²⁰	A1f	248	21,4
			ApmGB1-13 ²	A1a1	252	21,4
			ApmGB1-14 ¹⁹	A1f	248	21,8
			ApmGB1-15 ¹	A1a1	252	21
			ApmGB1-16 ¹⁷	A1f	250	21,6
			ApmGB1-17	A1f	249	21,7
			ApmGB1-18	A1f	250	22
			ApmGB1-19 ¹⁸	A1f	250	21,6
			ApmGB1-20	A1h	236	19,5
			ApmGB1-21 ⁹	A1c	248	21,8
			ApmGB1-22 ²⁷	B	244	21,7
			ApmGB1-23 ²⁷	B	244	21,7
			ApmGB1-24 ²⁸	B	245	22
GCA_000002 195.1	Genbank		ApmGB2-1 ²⁸	B	245	22
			ApmGB2-2	B	245	21,6
			ApmGB2-3	A1d	253	21,7
			ApmGB2-4	A1c	252	22,6
			ApmGB2-5	A1f	248	20,6
			ApmGB2-6 ¹⁷	A1f	250	21,6
			ApmGB2-7	A1a1	252	20,6
			ApmGB2-8 ²¹	A1f	251	21,5
			ApmGB2-9 ⁷	A1c	248	21,4
			ApmGB2-10 ²⁴	A1j	237	21,1
			ApmGB2-11 ⁷	A1c	248	21,4
			ApmGB2-12	A1c	245	22
			ApmGB2-13	A1c	243	22,6
			ApmGB2-14	A1b	248	19,8
			ApmGB2-15 ⁴	A1a1	252	20,6
			ApmGB2-16 ²⁴	A1j	237	21,1

			ApmGB2-17 ¹	A1a1	252	21
			ApmGB2-18 ¹⁹	A1f	248	21,8
			ApmGB2-19	A1a1	251	20,7
			ApmGB2-20	A1g	248	21
			ApmGB2-21 ¹⁵	A1d	253	22
			ApmGB2-22	A1i	237	21,5
			ApmGB2-23 ²⁴	A1j	237	21,1
			ApmGB2-24	A1j	235	22
			ApmGB2-25	A1i	237	22,1
			ApmGB2-26 ⁷	A1c	248	21,4
			ApmGB2-27 ⁵	A1b	253	22,5
			ApmGB2-28 ¹⁵	A1d	253	22,1
			ApmGB2-29 ¹⁵	A1d	253	22,1
			ApmGB2-30 ¹⁵	A1d	253	22,1
			ApmGB2-31	A1j	237	21,1
			ApmGB2-32	A1a2	251	22,3
			ApmGB2-33 ²²	A1f	251	21,9
			ApmGB2-34 ¹⁸	A1f	250	21,6
<i>A. cerana</i>	GCA_001442 555.1	Genbank	CerGB1-1	CR	252	24,6
			CerGB1-3	CR	252	24,6
	GCA_011100 585.1	Genbank	CerGB2-5	CR	252	24,2
			CerGB2-6	CR	252	24,2
			CerGB2-7	CR	252	25,0

Примітка. Однаковими індексами позначено ідентичні риботики. IGS 5S рДНК взяті з використаних геномів згадані з позначкою GB.

Таблиця 3.1.2.

Характеристика IGS L-типу 5S рДНК *Apis mellifera* та *A. cerana*

Підвид	GenBank Acc. No.	Назва риботики	IGS	
			Довжина, нп	Вміст GC-пар, %
<i>A. m. carnica</i>	GCA_013841245.1	CarnGB-1L	706	28,2
		CarnGB-2L ³	711	27,6
<i>A. m. caucasica</i>	GCA_013841205.1	CauGB-1L	714	28,6
<i>A. m. ligustica</i>	GCA_019321825.1	LigGB-1L	710	28,3
		LigGB-2L	710	28,3
		LigGB-3L	714	28,6
		LigGB-4L	714	28,4

<i>A. m. mellifera</i>	GCA_003314205.2	MelGB-1L	706	28,2
		MelGB-2L ³	711	27,6
<i>A. mellifera ssp</i>	GCA_003254395.2	ApmGB1-1L ¹	711	28,1
		ApmGB1-2L	709	28,1
		ApmGB1-3L	709	28,2
		ApmGB1-4L	709	28,2
		ApmGB1-5L ²	710	28,2
		ApmGB1-6L	709	28,1
		ApmGB1-7L	710	28,2
		ApmGB1-8L	709	28,9
		ApmGB1-9L	711	28,1
	GCA_000002195.1	ApmGB2-1L ²	710	28,2
		ApmGB2-2L ¹	711	28,1
		ApmGB2-3L	710	27,9
		ApmGB2-4L	706	28,3
	<i>A. cerana</i>	GCA_011100585.1	CerGB2-1L ⁴	708
CerGB2-3L			708	29,4
CerGB2-4L			707	29,4
CerGB2-5L			708	29,1
CerGB2-6L			708	28,9
CerGB2-7L			707	29
CerGB2-8L ⁴			708	29,2
CerGB2-9L ⁴			708	29,2
CerGB2-10L ⁵			708	29,1
CerGB2-11L ⁴			708	29,2
CerGB2-12L ⁵			708	29,1
CerGB2-13L ⁴			708	29,2
CerGB2-14			708	29,4
CerGB2-15L ⁴			708	29,2
CerGB2-16L ⁴	708	29,2		
CerGB2-17L ⁴	708	29,2		

Примітка. Однаковими індексами позначено ідентичні риботики. IGS 5S рДНК взяті з використаних геномів згадані з позначкою GB.

3.1.2.2. Хромосомна локалізація 5S рДНК у геномах видів роду *Apis*

Наявність у медоносної бджоли двох кластерів 5S рДНК, які відрізняються за послідовностями IGS згадується в роботі Vierna et al. (2013). Аналіз 5 анотованих геномів *A. mellifera* показав, що основний кластер 5S рДНК знаходиться на хромосомі 3. Для двох геномів, які зібрані лише на рівні скефолдів/контігів (*A. m. caucasica* – GCA_013841205.1; *A. m. ssp* – GCA_000002195.1) через недостатній рівень збірки локалізацію 5S рДНК встановити не вдалось. У геномі *A. cerana* основний кластер був виявлений на хромосомі 8. Цей кластер 5S рДНК у обох досліджених видів містить лише послідовності IGS S-типу.

Крім основного, було виявлено додатковий кластер 5S рДНК, який у *A. mellifera* розташований на хромосомі 12, а у *A. cerana* - на хромосомі 13. У обох досліджених видів додатковий кластер містить лише послідовності IGS L-типу. На відміну від основного кластеру, в якому зосереджено близько 80% повторів 5S рДНК, додатковий містить значно меншу кількість повторів.

Наші результати дозволяють припустити, що наявність двох кластерів 5S рДНК може бути притаманною для всіх представників роду *Apis*. Підтвердження чи спростування цієї гіпотези вимагає аналізу більшої кількості секвенсованих геномів.

3.1.2.3. Молекулярна організація IGS S-типу

Порівняння всіх наявних послідовностей IGS показало, що не дивлячись на низький рівень внутрішньогеномного поліморфізму за довжиною, нуклеотидні послідовності IGS S-типу демонструють різницю за рахунок численних інделів (делецій/інсерцій) та замін окремих нуклеотидів (single nucleotide polymorphism, SNP). На загал, серед 260 проаналізованих риботипів відмінними виявились 135. Відсотки подібності між риботипами IGS S-типу у *A. mellifera* склали 69,3-99,6%, тоді як для *A. cerana* цей показник виявився вищим - 97-99,6%. Проте, слід зазначити, що високий рівень подібності IGS у

A. cerana може бути пов'язаний з тим, що для цього виду проаналізовано лише два геноми. Порівняння послідовностей *A. mellifera* та *A. cerana* показує, що рівень подібності IGS цих видів становить 67-73,7%.

На основі отриманих нами риботипів була побудова ML-дендрограма, яка відображає подібність між ними (рис. 3.1.2). Встановлено, що послідовності IGS *A. mellifera* групуються у три основні клади А, В і С, які мають високу статистичну підтримку.

Переважає більшість риботипів *A. mellifera* належить до клади А, в межах якої присутні дві субклади, А1 та А2. Однак, три риботиби – а саме *Kyv1-4*, *MelGB-11* та *MelGB-15* – не належать до жодної з цих двох субклад, утворюючи базальну групу А0.

У складі субклад А1 та А2 можна виділити термінальні групи, А1а-А1j та А2а-А2b, які об'єднують високоподібні між собою риботиби (табл. 3.1.3). Термінальну групу А1а для зручності було поділено на дві сестринські – А1а1 та А1а2. Рівень подібності риботипів, які належать до однієї термінальної групи здебільше перевищує 90%. Виключення становить термінальна група А1d, у якій виявлено мінімальний рівень подібності 86,3%. Такий порівняно низький рівень подібності зумовлений присутністю в межах цієї групи риботипу *CarnGB-26*, нуклеотидна послідовність якого містить декілька специфічних мутацій. Подібна ситуація спостерігається також в межах клади В, де порівняно низьке значення подібності 89,2% зумовлено наявністю дивергованого риботипу *MelGB-27*.

Отримані дані дозволяють стверджувати, що IGS S-типу у *A. mellifera* представлена 15 структурними варіантами, які відповідають переліченим вище термінальним групам. Ці структурні варіанти належать до трьох структурних класів А, В і С, перший з яких включає три підкласи, А0, А1 та А2. Ще один структурний клас С утворюють риботиби *MelGB-28* та *ArmGB1-3* (рис. 3.1.2).

Таблиця 3.1.3.

Рівень подібності IGS-риботипів в межах термінальних груп

Термінальна група	Рівень подібності, %
A0	98,8-99,6
A1a1	97,2-99,6
A1a2	92,1-98
A1b	90,2-98,8
A1c	98,4-99,6
A1d	86,3-99,6
A1f	90-99,6
A1g	93,7-98,8
A1h	95,2-99,6
A1i	96,6-99,6
A1j	90,5-99,6
A2a	91,4-99,6
A2b	98,4-99,6
B	89,2-99,6

Отримані дані дозволяють стверджувати, що IGS S-типу у *A. mellifera* представлена 15 структурними варіантами, які відповідають переліченим вище термінальним групам. Ці структурні варіанти належать до трьох структурних класів А, В і С, перший з яких включає три підкласи, А0, А1 та А2. Ще один структурний клас С утворюють риботипи MeIGB-28 та ArmGB1-3 (рис. 3.1.2).

Порівняння наборів риботипів, які було виявлено при аналізі повногеномних архівів з Genbank, котрі представляють різні підвиди *A. mellifera* показало, що для кожного геному/підвиду характерний власний набір риботипів (табл. 3.1.1). Отже, набори риботипів IGS S-типу можна використовувати як молекулярний маркер для ідентифікації підвидів/порід медоносної бджоли.

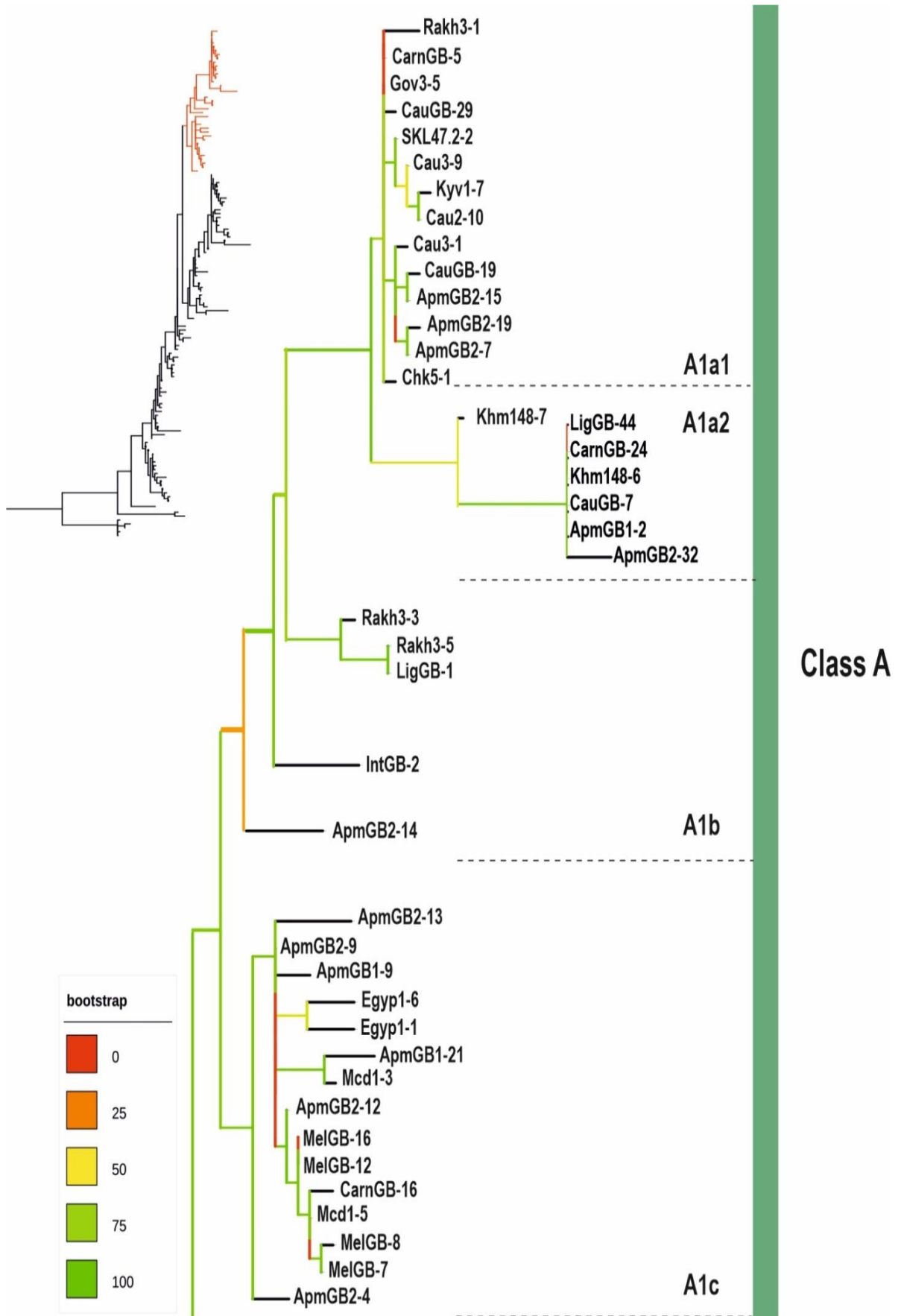


Рисунок 3.1.2 (початок)

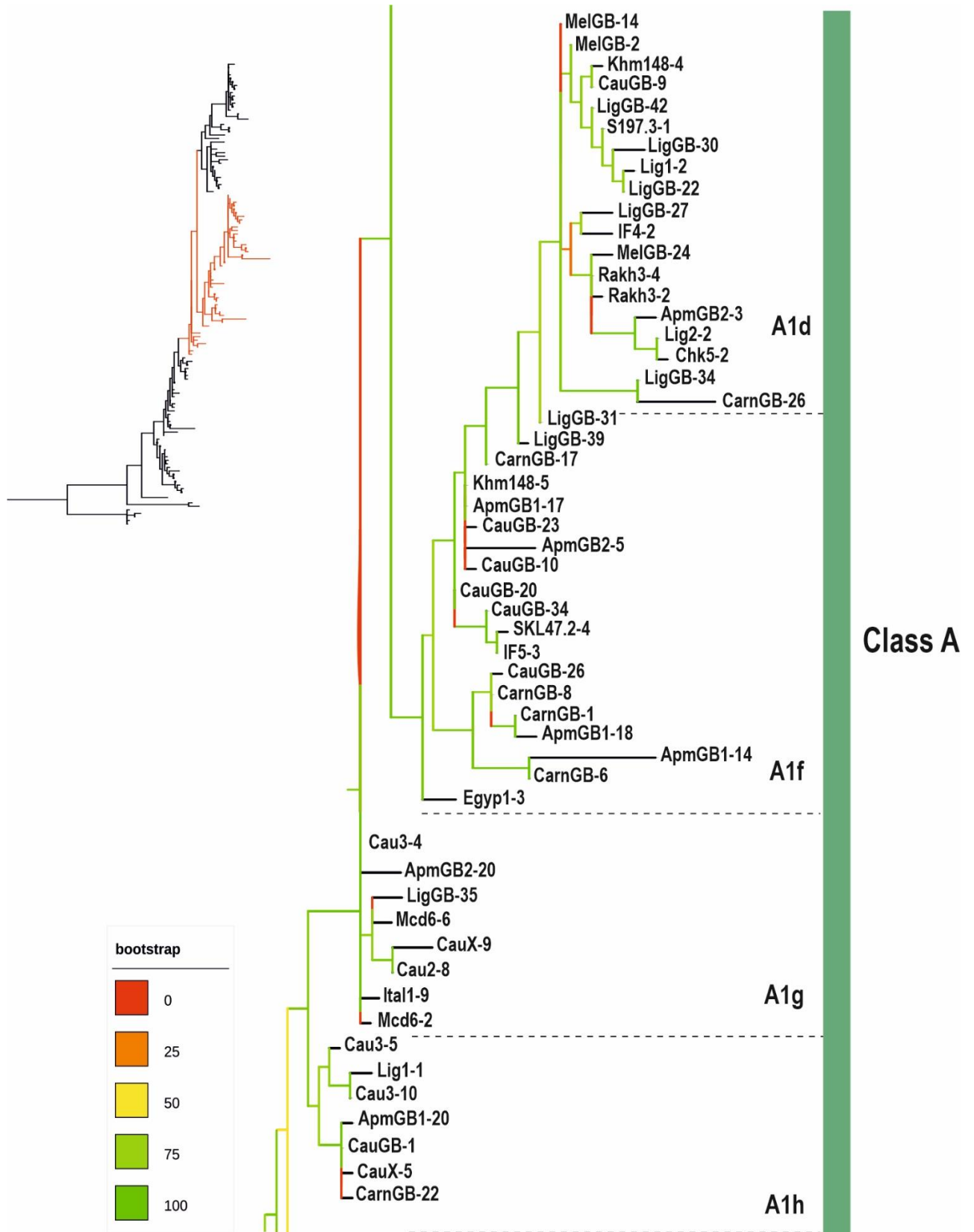


Рисунок 3.1.2 (продовження)

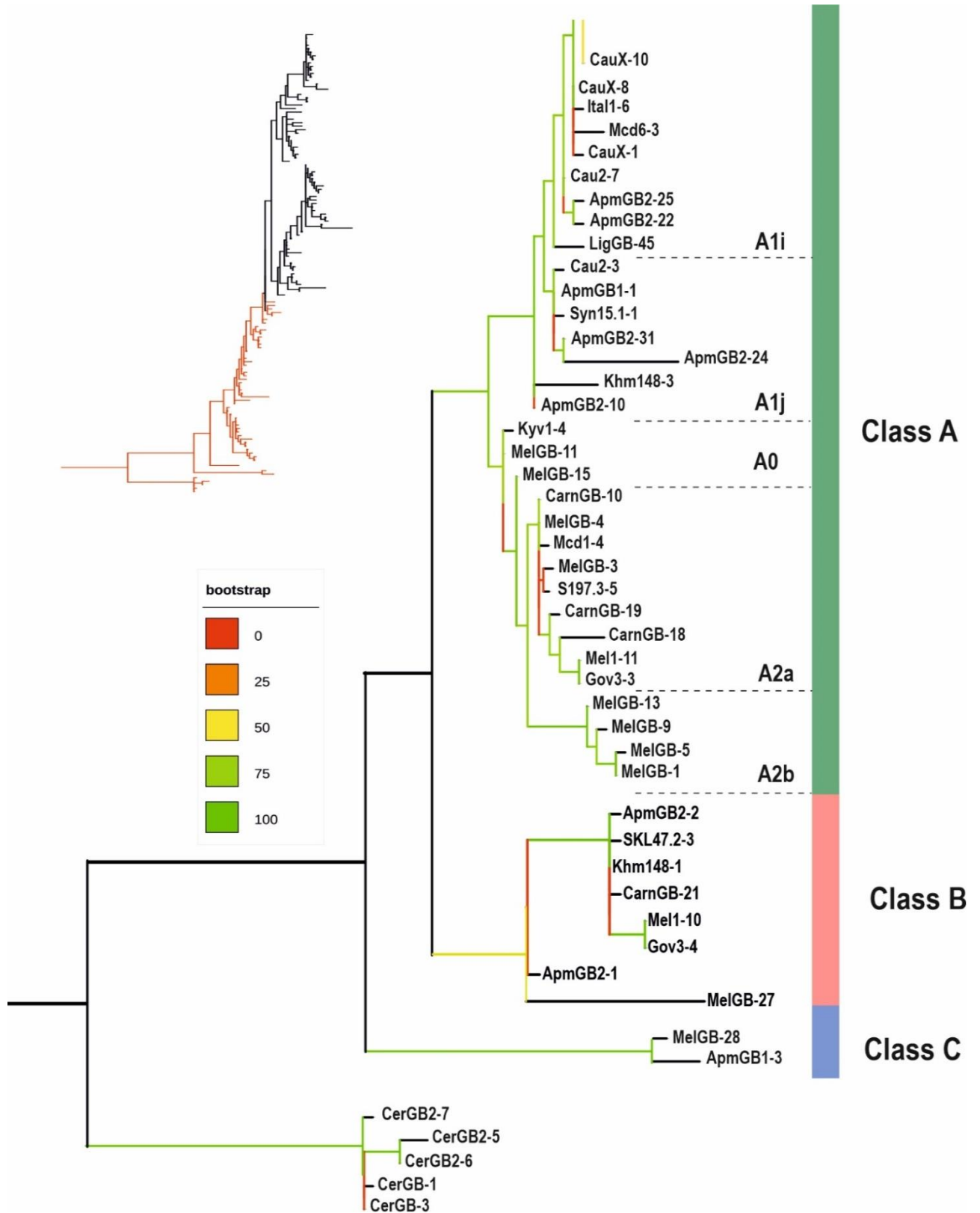


Рисунок 3.1.2 (закінчення). ML-філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК методом максимальної правдоподібності з використанням GTR моделі заміщення. Колір клад на дендрограмі відповідає значенням aLRTChi2 статистичної підтримки (див. легенду). Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 3.1.1.

Для оцінки різниці між найбільш дивергованими IGS S-типу з різних термінальних груп було обрано репрезентативні послідовності та порівняно між собою. Встановлено, що різниця між ними переважно пов'язана з SNP та короткими інделами (рис. 3.1.3). Окрім того, в центральній частині IGS *A. cerana* була виявлена інсерція, яка виникла як результат дуплікації сусідньої послідовності. На основі вирівнювання обраних для аналізу 27 риботипів було також розраховані відсотки подібності між ними (табл. 3.1.4). Найменший рівень подібності серед обраних послідовностей різних термінальних груп демонструють риботипи CerGB-1 / MelGB-9 та CerGB-1 / Lig1-1 – 68,3%, а найвищий – ArpGB1-1 / Syn15.1-1 - 99,6%.

З літератури відомо, що в межах кодувальної ділянки 5S рДНК у еукаріотичних організмів знаходяться внутрішні елементи промотора РНК-полімерази III, присутність яких необхідна для ініціації транскрипції. До таких елементів відносять А-box, ІЕ (intermediate element) та С-box (Pieler et al, 1987; Tyler, 1987; Sharp & Garcia 1988; Layat et al, 2013). У комах набір цих елементів може дещо відрізнитись. Зокрема, для представників різних таксономічних груп комах були описані такі елементи як А-box, В-box та С-box (Vierna et al., 2013).

Окрім внутрішніх елементів промотора РНК-полімерази III відомо також про існування і зовнішніх. До таких елементів належить консервативна ТАТА-подібна послідовність, яку було знайдено у позиції від -30 до -24 нп вище старту транскрипції у шовкопряда *Bombyx mori* (Morton & Sprague, 1984), *Drosophila melanogaster* (Sharp & Garcia, 1988), двох видів *Caenorhabditis* (Nelson et al, 1998), кількох видів моллюсків (Vizoso et al, 2011) і риб (Martins & Galetti, 2001), а також у рослин (Layat et al, 2012; Simon et al, 2018) і грибів (Tyler, 1987). Однак, 5S рДНК метелика *Melitaea trivia* (родина Nymphalidae) суттєво відрізняється за послідовністю IGS від *Bombyx mori*. Зокрема, у положенні від -25 до -20 нп ТАТА-подібну послідовність ТААТАТ знайдено лише у довгого варіанту IGS, тоді як у короткого варіанту IGS у цій позиції знаходиться мотив TAGAGT (Cherevatov and Volkov, 2011). У метеликів, які

належать до родини Lycaenidae у IGS AT-багаті мотиви були відсутні (Cherevatov & Volkov, 2010; Cherevatov et al., 2012).

З огляду на наведене вище, постало питання про присутність потенційних зовнішніх елементів промотору у ділянці IGS, яка передує CDS у видів роду *Apis*. У переважної більшості IGS S-типу у положенні від -30 до -26 нп перед початком кодувальної ділянки було знайдено ТАТА-подібний мотив ТАТТТ (рис. 3.1.3). Таке розташування цього мотиву та його консервативність можуть вказувати на ймовірну роль у регуляції транскрипції 5S рДНК, проте для остаточного прояснення цього питання необхідні додаткові дослідження. На загал наявні дані свідчать, що зовнішні елементи промотору 5S рДНК можуть істотно відрізнятись як у різних групах тварин, так і у комах, зокрема.

Варто також зазначити, що у більшості послідовностей IGS у положенні від -23 до -15 нп присутній пурин-багатий мотив AGAGAGAGA (рис. 3.1.3). Роль цього мотиву наразі невідома і потребує подальшого прояснення. Окрім цього, на 5' кінці IGS безпосередньо після CDS виявлено oligo-dT мотив, який імовірно виконує роль термінатора роботи РНК-полімерази III (Layat et al, 2012; Vierna et al, 2013). Розмір цього мотиву у різних риботипах хоч і відрізняється, проте послідовність зберігається консервативною (рис. 3.1.3)

Таблиця 3.1.4. Рівень подібності (%) IGS S-типу 5S рДНК *A. mellifera* та *A. cerana*

Рибо №	Khml4 0-7	Cau3 -9	Gov3 -5	Khml 148-6	IntG B-2	Rakh 3-4	Rakh 3-5	CauX -1	Mcd6 -3	Syn1 5.1-1	Apml GB1-	Lig1- 1	Cau3 -10	Kyv1 -4	MelG B-3	S197. 3-5	MelG B-5	MelG B-9	Mcd1 -5	CauX GB- 16	CauX -9	Mcd6 -6	Egyp 1-3	SLK 47.2- 4	Gov3 -4	Khml 148-1	CerG B-1	
№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1	100	96.2	97.4	94.3	92.1	90.6	90.2	83	82.3	83.8	84.2	85.3	85.7	83.8	83.4	84.2	81.9	82.6	90.2	89.1	86.8	88.3	88.7	90.2	82.6	80.8	70.2	
2		100	98.5	92.1	92.1	91.3	90.6	84.2	83.4	84.9	85.3	86	86.4	84.9	84.5	85.7	83	83.8	91.3	90.2	89.8	91.3	90.2	90.9	83.4	81.9	70.9	
3			100	92.5	93.6	92.1	92.1	84.5	83.8	85.3	85.7	86.8	87.2	85.3	84.9	85.7	83.4	84.2	91.7	90.6	88.3	89.8	90.2	91.7	84.2	82.3	71.3	
4				100	90.6	89.1	88.7	84.9	84.2	85.7	86	85.3	85.7	85.7	86	87.2	84.5	85.3	91.3	90.2	87.2	88.7	90.6	87.9	81.1	81.1	70.6	
5					100	92.8	93.6	86	85.3	86.8	87.2	87.5	88.7	86	86.4	87.2	84.9	85.7	91.7	90.6	88.7	90.9	92.5	94	82.6	80.8	71.3	
6						100	97	87.2	86.4	87.9	88.3	89.4	89.8	86.4	86.8	87.5	85.3	86	91.3	90.2	90.2	91.3	92.1	93.6	82.3	80.4	69.4	
7							100	85.7	84.9	85.7	86	87.2	88.3	85.7	85.3	86	83.8	84.5	89.8	88.7	87.9	89.8	90.2	91.7	81.1	79.2	70.6	
8								100	98.5	97.7	98.1	94.7	95.8	96.2	95.1	94	90.9	91.7	87.9	86.8	86.8	88.3	89.1	87.5	80.8	83	71.7	
9									100	97	97.4	94	95.1	95.5	94.3	93.2	90.2	90.9	87.2	86	86	88.3	88.3	86.8	80	82.3	70.6	
10										100	99.6	94	95.1	96.2	95.8	94.7	91.7	92.5	88.7	87.5	86	87.5	89.4	87.5	80.4	82.6	71.7	
11											100	94.3	95.5	96.6	96.2	95.1	92.1	92.8	89.1	87.9	86.4	87.9	89.8	87.9	80.8	83	72.1	
12												100	98.9	94	92.8	93.6	92.1	92.8	88.3	87.2	89.4	89.4	89.4	89.1	82.6	81.5	68.3	
13													100	93.6	92.5	93.2	91.7	92.5	87.9	86.8	88.3	90.6	90.6	90.2	82.3	81.1	69.1	
14														100	98.9	97.7	94.7	95.5	91.7	90.6	86	86	87.5	85.7	83.8	86	72.1	
15															100	98.9	95.1	95.8	92.1	90.9	85.3	85.3	87.5	85.7	83.4	85.7	71.3	
16																100	95.1	95.8	92.1	90.9	86.4	86.4	88.7	86.4	83.8	84.5	70.2	
17																	100	98.5	91.7	90.6	83.8	84.5	86	84.2	81.1	82.6	67.5	
18																		100	92.5	91.3	84.5	85.3	86.8	84.9	82.6	84.2	68.3	
19																			100	98.9	91.3	92.1	92.8	90.9	85.7	86.4	72.5	
20																				100	90.2	90.9	91.7	89.8	84.5	85.3	71.3	
21																					100	94.3	91.3	90.2	82.3	80.8	69.1	
22																						100	93.6	92.5	82.3	80.8	69.4	
23																							100	94.7	82.6	81.9	70.9	
24																								100	82.6	80.8	70.2	
25																									100	97.7	69.8	
26																										100	71.3	
27																												100

Примітка: Наведено рівень подібності між послідовностями IGS, які представляють різні термінальні групи (див. рис. 3.1.1).

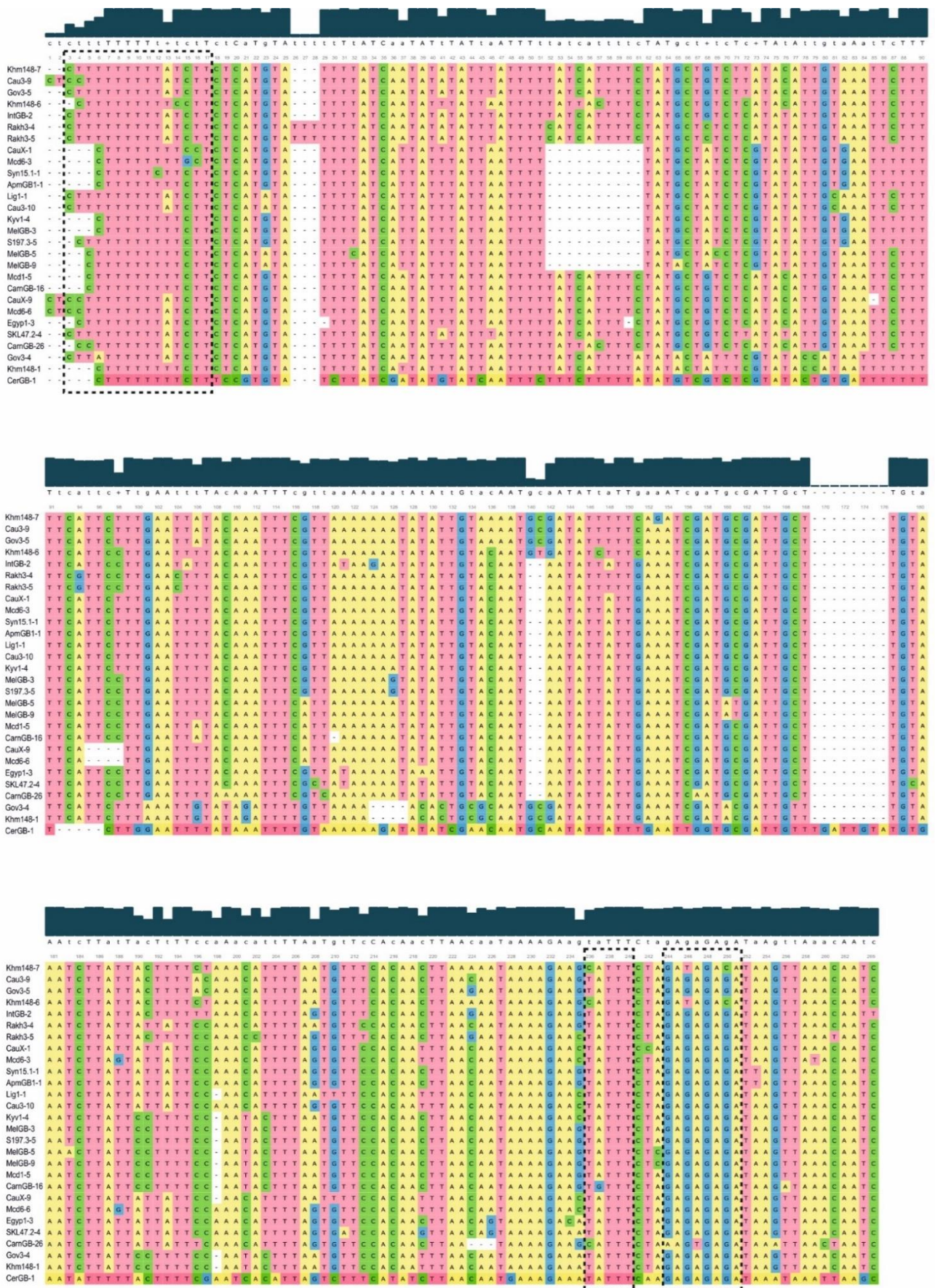


Рисунок 3.1.3. Вирівнювання IGS S-типу *A. mellifera* та *A. cerana*. Пунктиром виділено потенційні зовнішні елементи промотора та oligo-dT послідовність термінатора. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у **табл. 3.1.1**

3.1.2.4. Молекулярна організація IGS L-типу

Біоінформатичний аналіз 5 геномів *A. mellifera* та 1 геному *A. cerana* дозволив нам виявити 38 риботипів IGS L-типу, серед яких відмінними виявились лише 27 (таблиця 3.1.2). Вирівнювання цих риботипів показало низький рівень генетичного поліморфізму, порівняно з IGS S-типу (рис. 3.1.3). Видається що в межах виду *A. mellifera* присутні лише декілька структурних варіантів довгих IGS, які відрізняються між собою за наявністю незначної кількості інделів та SNP. Найменший відсоток подібності риботипів IGS L-типу в межах виду *A. mellifera* становить 96,9%, а між *A. mellifera* та *A. cerana* – 83,6%.

Порівняльний аналіз риботипів L-типу та S-типу показав, що рівні їх подібності знаходяться в межах 18,2-22,9%.

Пошук ймовірних зовнішніх елементів промотору РНК-полімерази III показав, що 3' кінець IGS у риботипах L- та S-типу не містить однакових мотивів. Це може бути вказівкою на те, що транскрипція риботипів L- та S-типу відбувається по різному, наприклад, на різних стадіях онтогенезу, як це було свого часу показано для двох варіантів 5S рДНК у геномі *Xenopus* (Korn, 1982).

Єдиним гомологічним мотивом, який присутній у IGS L- та S-типу є oligo-dT мотив, який слугує термінатором транскрипції РНК-полімерази III. Цікаво, що у *A. mellifera* в IGS L-типу цей мотив має розмір 22-23 нп, а в IGS S-типу – 9-14 нп. Вочевидь, це збільшення розміру термінатора транскрипції є результатом тандемної дуплікації. У *A. cerana* розмір oligo-dT мотиву S-типу становить 9 нп, а L-типу – 12-13 нп (рис. 3.1.5).

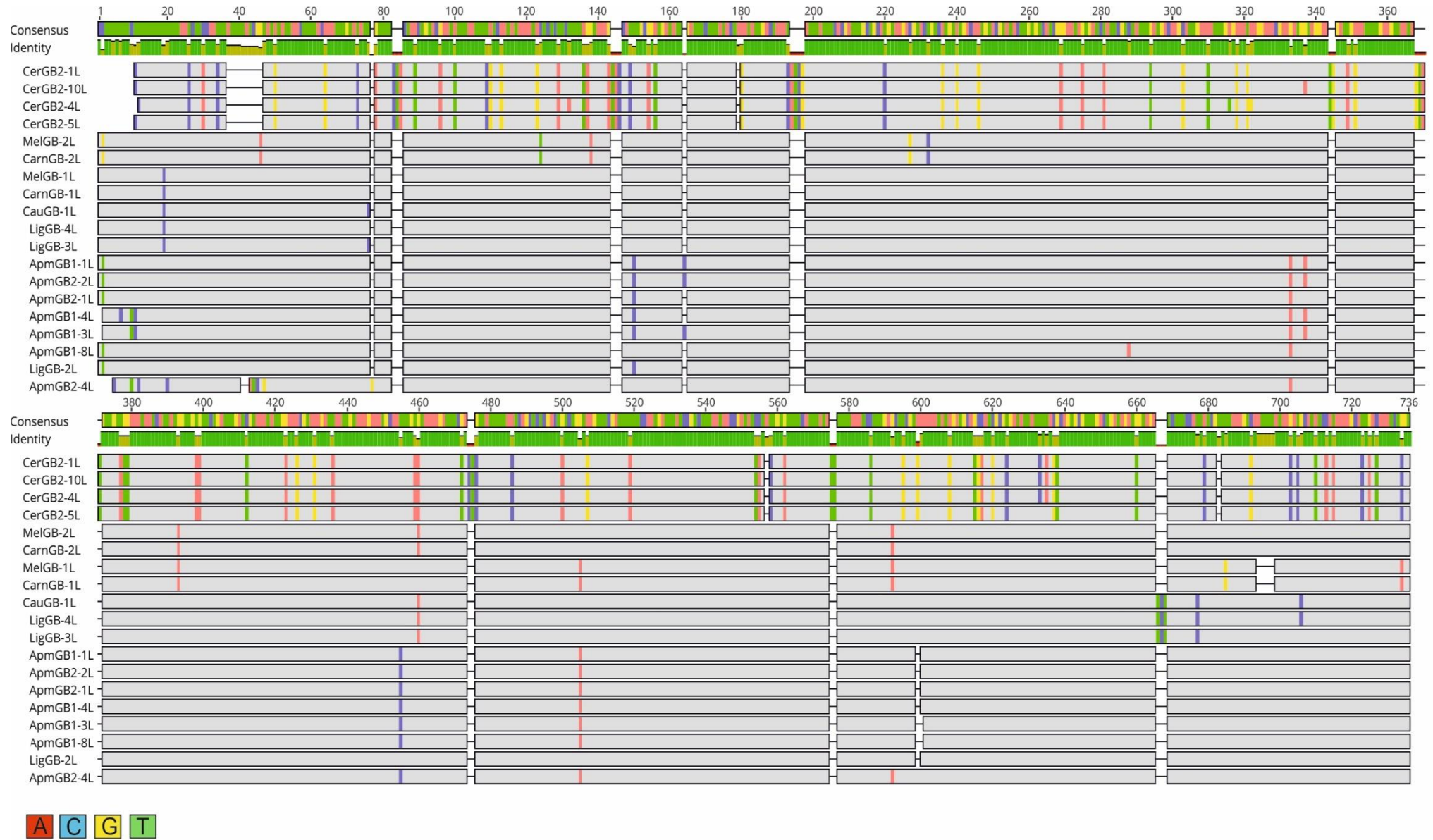


Рисунок 3.1.4. Вирівнювання IGS L-типу 5S рДНК *A. mellifera* та *A. cerana*. Характеристики використаних для порівняння послідовностей наведено у табл. 3.1.2.

Majority	XXXXXXXXXXXXTTTTTTTTTTTTTAATCTTCC
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> 10 20 30 </div>
CarnGB-1L	CCTTTTTTTCPTTTTTTTCPTTTAATCTTCC
ApmGB2-2L	CTTTTTTTCPTTTTTTTTTTTTTAATCTTCC
ApmGB1-3L	'CTTTTTTTCPTTTTTTTTTTTTTAATCTTCC
ApmGB1-4L	'CTTTTCTTTCTTTTTTTTTTTTTAATCTTCC
LigGB-2L	CTTTTTTTCPTTTTTTTTTTTTTAATCTTCC
ApmGB1-8L	CTTTTTTTCPTTTTTTTTTTTTTAATCTTCC
MelGB-2L	CGTTTTTTCPTTTTTTTTTTTTTAATCTTCC
ApmGB2-4L	''''CTTTTTTCTTTTTTCTTTAATCTTCC
CerGB2-1L	''''''''''CTTTTTTTTTTTAACCCTTAC
CerGB2-14L	''''''''''CTTTTTTTTTTTAACCCTTAC
Cau3-9	''''''''''CTCCTTTTTTTATCTTCT
Khm148-6	''''''''''CTTTTTTTTTCTTCT
Mcd6-3	''''''''''CTTTTTTTGCTCT
Lig1-1	''''''''''CTTTTTTTTATCTTCT
Cau3-10	''''''''''CTTTTTTTTATCTTCT
Kah1-4	''''''''''CTTTTTTTTCTTCT
S197.3-5	''''''''''CTTTTTTTTTTCTTCT
MelGB-5	''''''''''CTTTTTTTTTTCTTCT

Рисунок 3.1.5. Порівняння oligo-dT мотиву IGS L-типу та S-типу 5S рДНК *A. mellifera* та *A. cerana*.

3.1.2.5. Поліморфізм IGS S-типу у різних підвидів *A. mellifera*

Постає питання: наскільки сильно підвиди/породи медоносної бджоли відрізняються між собою за набором структурних варіантів IGS S-типу? Аналіз отриманих даних (табл. 3.1.5, рис. 3.1.6) свідчить, що риботипи, які належать до структурних класів A0 та A2 (особливо варіант A2b) знайдені в першу чергу у *A. m. mellifera*, а структурний клас B – у *A. m. carnica*, хоча в геномах цих двох підвидів присутні і риботипи, які відповідають класу A1. Отже, складається враження, що різниця між підвидами/породами медоносної бджоли полягає не у наявності специфічних 5S-риботипів, а скоріше у кількісному співвідношенні різних риботипів в геномі.

Для перевірки цієї гіпотези ми вирішили оцінити поліморфізм послідовностей IGS на рівні геному із використанням методу CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence). Проведений нами біоінформатичний аналіз дозволив ідентифікувати ендонуклеази рестрикції (рестриктази), AseI, DraI та SspI, при обробці якими ПЛР-ампліфікатів IGS мають утворюватися набори фрагментів, специфічні для різних риботипів (табл. 3.1.5). Після цього було отримано такі ПЛР-ампліфікати для 36 зразків ДНК *A. mellifera* та проведено їх обробку рестриктазами. Отримані продукти розщеплення аналізували за допомогою гель-електрофорезу (частина результатів наведена на рис. 3.1.6). Аналіз отриманих електрофореграм свідчить, що майже для всіх зразків (за виключенням Mkl24) обробка рестриктазами AseI, DraI та SspI призводить до утворення однакових наборів фрагментів, довжини яких відповідають очікуванню (табл. 3.1.5). Проте, між досліджуваними зразками спостерігається суттєва різниця у інтенсивності забарвлення окремих смуг. Напр., при застосуванні рестриктази SspI у всіх зразків наявні смуги довжиною 188-205 та 392 нп, але у зразків Lig2, Cau3, Cau2 та Ital1 (рис. 3.1.6: В, треки № 2, 14, 15, 18) майже повністю відсутні смуги, які відповідають фрагментам довжиною 84-105 та 283-290 нп. Це свідчить, що в геномах цих чотирьох зразків на відміну від решти відсутні риботипи A1c, A1e, A1f, A1g, та B. Водночас риботипи A0, A1a, A1b, A1d, A1h, A1i, A1j, A2a та A2b видаються наявними у всіх досліджених зразках. Що стосується зразка Mkl24, який репрезентує підвид *A. m. mellifera*, то отримані для нього набори фрагментів помітно відрізняються від всіх інших зразків, що добре узгоджується з існуючими уявленнями про еволюційну віддаленість цього підвиду від *A. m. carnica*, *A. m. caucasica* та *A. m. macedonica*.

Отримані результати повністю підтримують нашу гіпотезу про те, що геноми різних підвидів/порід медоносної бджоли, а в деяких випадках – і представників різних популяцій в межах одного підвиду можуть відрізнитись за відносним вмістом певних риботипів у 5S рДНК. Ця різниця може бути

використана для молекулярної ідентифікації (баркодингу) підвидів/порід *A. mellifera* та моніторингу їх поширення на певних територіях.

Порівняння наборів фрагментів ядерної 5S рДНК, отриманих для еталонних зразків та для популяцій медоносної бджоли з різних регіонів України свідчить, що існуючий генофонд гібридних форм був успадкований від *A. m. carnica*, *A. m. caucasica* та *A. m. macedonica*, тоді як генетичний матеріал *A. m. mellifera* майже відсутній.

Таблиця 3.1.5

Довжини ПЛР-фрагментів (нп) 5S рДНК *Apis mellifera* після обробки рестриктазами

Структурний варіант	Без обробки рестриктазою	Після обробки рестриктазою		
		AseI	DraI	SspI
A0	376	100, 276	376	188, 188
A1a	392	392	392	392
A1b	394	394	394	189, 205
A1c	388	102, 286	388	96, 104, 188
A1d	391	391	391	189, 202
A1e	388	104, 284	167, 221	98, 104, 186
A1f	391	391	391	84, 105, 202
A1g	387	104, 283	387	98, 100, 189
A1h	379	102, 277	379	189, 190
A1i	378	101, 277	378	189, 189
A1j	378	101, 277	378	189, 189
A2a	381	103, 278	381	190, 191
A2b	379	103, 276	379	188, 191
B	388	104, 284	160, 228	98, 290; або 105, 283

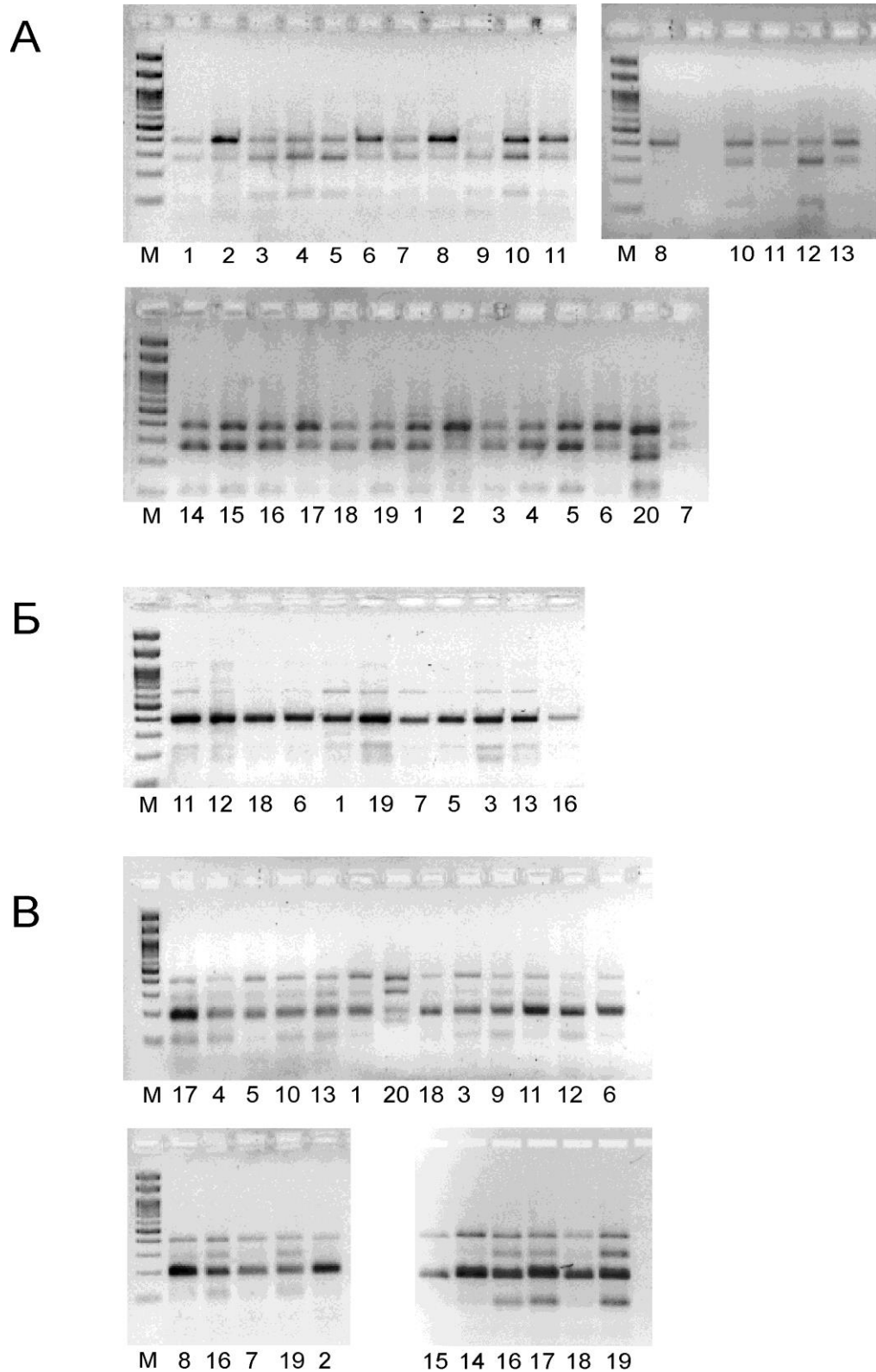


Рисунок 3.1.6. Електрофоретичний аналіз фрагментів ДНК, отриманих внаслідок обробки ПЛР-ампліфікатів IGS ендонуклеазами рестрикції *AseI* (А), *DraI* (Б) та *SspI* (В). Зразки ДНК: 1 - Khm18.1, 2 - Lig2, 3 - Kyv11, 4 - Gov3, 5 – Pol1, 6 - IF5, 7 - Chk5, 8 - Rakh3, 9 - Mcd6, 10 - SI97.3, 11 - IF4, 12 - Mcd1, 13 - Khm148, 14 - Cau3, 15 - Cau2, 16 - SKL47.2, 17 - Egrp1, 18 - Ital1, 19 - Syn15.1, 20 - Mkl24.

3.1.2.6. Організація та поліморфізм кодувальних ділянок 5S рДНК медоносних бджіл

Як вже було раніше згадано, на відміну від варіабельного IGS ділянки, що кодують 5S рРНК (CDS) є еволюційно консервативними, оскільки вони є функціонально важливими елементами геному еукаріот (Nembelen et al., 2021; Volkov et al., 2022).

Пошук повних послідовностей CDS проводили біоінформатичним скринінгом в межах кластерів 5S рДНК. Для цього використовували відомі послідовності 5S рДНК описані в літературі, а також фрагменти, отримані нами при клонуванні IGS 5S рДНК.

Вирівнювання отриманих CDS показало, що рівень подібності між окремими послідовностями знаходиться в межах 93,9-99,2%. Знайдені відмінності зумовлені SNP та короткими (1-4 нп) інделами (рис. 3.1.7).



Рисунок 3.1.7. Вирівнювання CDS 5S рДНК *A. mellifera* та *A. cerana*. Пунктиром позначені внутрішні елементи промотору РНК-полімерази III.

Ініціація транскрипції 5S рДНК у всіх еукаріотичних організмів забезпечується взаємодією факторів ініціації транскрипції РНК-полімерази III з внутрішніми елементами промотору, які відомі як Box A, Box B (або IC-елемент) та Box C (Gillespie et al., 2006; Vierna et al., 2013). Результат аналізу кодувальних ділянок виявив вищезгадані мотиви в більшості отриманих нами послідовностей 5S рДНК. Так, Box A (CAAGCT) був виявлений в положенні 53-58 нп, Box B (TTAGTA) – 76-81 нп, а Box C (GGGTGA) – 93-98 нп (рис. 3.1.7). Це може свідчити, що ідентифіковані нами послідовності дійсно являють собою функціонуючі CDS 5S рДНК. Проте, звертають на себе увагу специфічні мутації в межах внутрішніх елементів промотору. Зокрема, в межах боксу C для двох послідовностей *A. mellifera* (ArmGB1-4, ArmGB2-4) було ідентифіковано однонуклеотидну делецію, а для *A. m. mellifera* (MelGB-1) – точкову мутацію. Окрім того, в межах боксу B було виявлено специфічну дуплікацію фрагменту TAG у трьох послідовностях – ArmGB2-2, CarnGB-2 та CauGB-8. І хоча дуплікований фрагмент не порушує консервативну послідовність елементу промотору, проте змінює відстань до сусіднього боксу C, що може негативно впливати на взаємодію між CDS та факторами ініціації транскрипції. Як наслідок, функціональність такої CDS буде порушена, що призведе до її перетворення у псевдоген.

Також нами було розраховано потенційні вторинні структури для обраних гіпотетичних транскриптів 5S рРНК *A. mellifera* та *A. cerana* (рис. 3.1.8). Для побудови прогнозованих структур були обрані консенсусні послідовності для трьох репрезентативних геномів (з приміткою «cons») та послідовності, які відрізняються від консенсусних SNP та інделами. Гіпотетичні транскрипти консенсусних послідовностей утворюють типові тридоменні структури (Barciszewska et al., 2001) та за сукупністю рис організації відповідають таким, що характерні для багатоклітинних тварин (Vierna et al., 2013).

Аналіз показав, що більшість SNP в CDS не впливають на формування вторинних структур. Проте, присутність додаткового тиміну в послідовності

ArmGB1-6 може суттєво змінити прогнозовану канонічну структуру 5S рРНК. Водночас нуклеотидна заміна, присутня в CauGB-6 впливає лише на структуру домену α . Також численні мутації (ArmGB2-24) та олігонуклеотидні інерції (ArmGB2-2) призводять до значних перебудов вторинної структури 5S рРНК.

На загал нами встановлено, що гіпотетичні транскрипти більшості CDS 5S рДНК в геномах бджіл здатні формувати вторинні структури, що наближені до канонічної для тварин, проте деякі CDS можуть являти собою псевдогени.

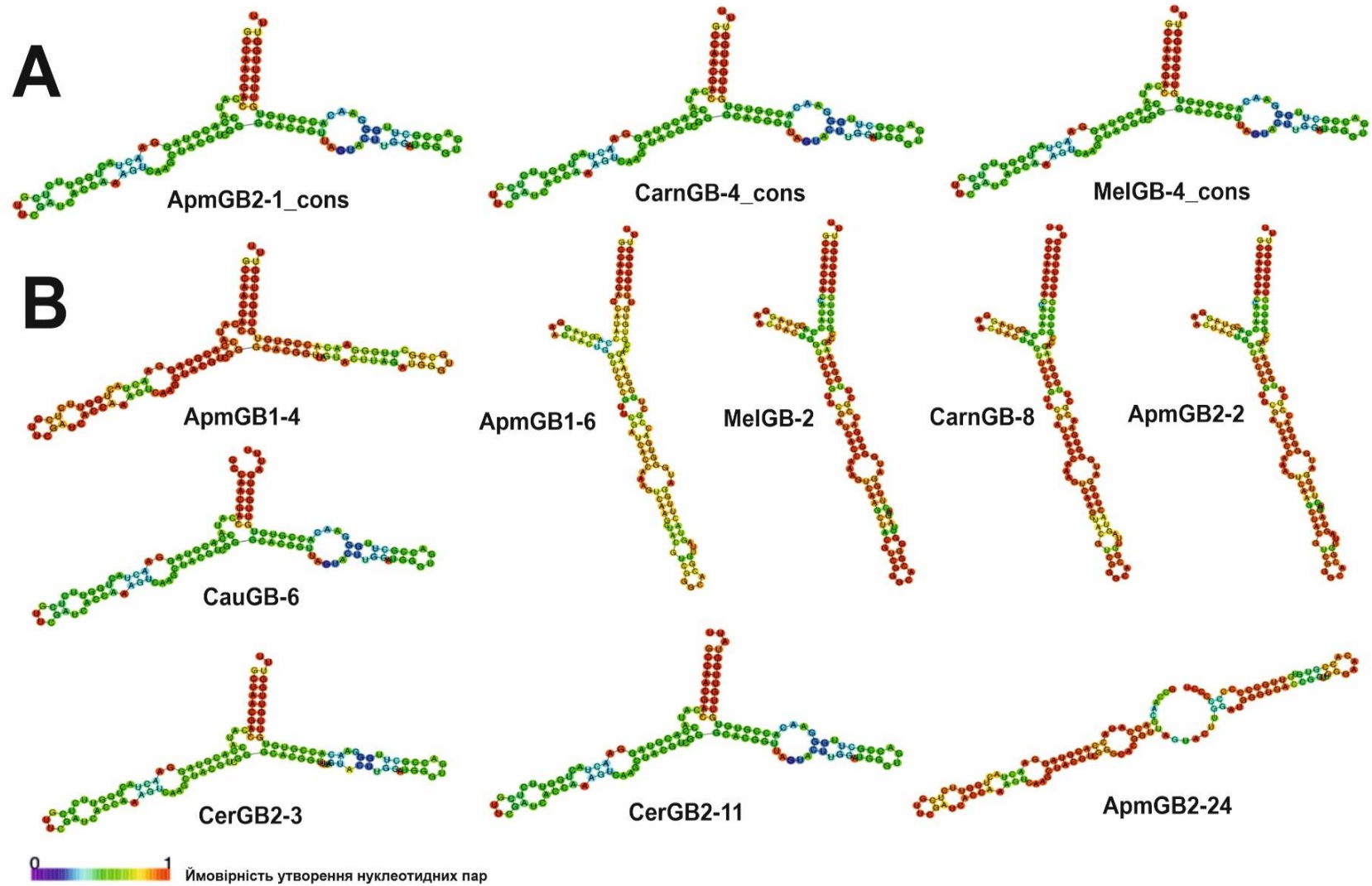


Рисунок 3.1.8. Прогнозовані вторинні структури кодувальних ділянок 5S рДНК *A. mellifera* та *A. cerana*. А – консенсусні CDS, В – з мутаціями.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.1

Результат аналізу ділянок *CO1* та *CO2* показав присутність в мітогеномах досліджуваних бджіл специфічних SNP, характерних для того чи іншого підвиду. Отримані результати свідчать, що гени *CO1* та *CO2* можуть бути використані для ідентифікації видів/порід медоносної бджоли, зокрема – українських аборигенних порід.

У геномах видів роду *Apis* встановлено наявність двох кластерів 5S рДНК, які розташовані на двох різних хромосомах і містять IGS двох типів. Короткі варіанти IGS (S-тип) локалізовані у основному хромосомному кластері і представлені щонайменше трьома структурними класами IGS, кожен з яких охоплює низку структурних варіантів, що відрізняються за набором специфічних поліморфізмів. Підвиди *A. mellifera* різняться за набором структурних варіантів IGS S-типу, які присутні у їх геномах, що дозволяє використовувати ці набори як молекулярні маркери для ідентифікації підвидів/порід. Довгі варіанти (L-тип) містяться у додатковому хромосомному кластері. Вони є менш мінливими і представлені лише декількома високо подібними варіантами. IGS S- та L-типу суттєво відрізняються між собою.

Аналіз CDS виявив присутність як високо консервативних варіантів, так і суттєво змінених. Побудова прогнозованих вторинних структур рРНК показала, що присутність незначної кількості замін в CDS не завжди призводить до змін вторинної структури. Це явище пов'язане з дією стабілізуючого добору, спрямованого на збереження функціональної CDS. Тим не менш, деякі CDS можуть являти собою псевдогени.

Частина результатів, представлених в розділі 3.1. описана в таких публікаціях: Рошка та Череватов, 2020; Roshka et al., 2021; Рошка та ін., 2022

3.2. ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ПОЛІМОРФІЗМ МАРКЕРНИХ ГЕНІВ мтДНК та 5S рДНК ЛУСКОКРИЛИХ

Вивчення біорізноманіття Лускокрилих (Lepidoptera), як вже згадувалось в огляді літератури, ускладнено тим, що багато представників цього ряду належать до надрізноманітних груп, які містять велику кількість морфологічно високо подібних видів (Luis-Martínez et al., 2020). Коректна ідентифікація видової приналежності таких форм вимагає детальних досліджень з використанням не тільки морфометричних показників, але й молекулярних маркерів.

Практичний інтерес до ідентифікації видів Лускокрилих з використанням молекулярного баркодингу пов'язаний із тим, що численні представники цього ряду є шкідниками сільського господарства (Garbatti Factor et al., 2022; Van den Berg & Plessis, 2022; Trajković & Žikić, 2023). До надзвичайно великого спектру метеликів-шкідників, що становлять небезпеку для важливих культур, належать зокрема і деякі представники родини Drepanidae, яких було обрано в якості матеріалу для дослідження. Завданням цього розділу роботи було сиквенування та аналіз послідовностей мітохондріального гена *COI* та IGS ядерної 5S рДНК у видів родини Drepanidae та оцінка можливості використання цих ділянок як молекулярних маркерів.

3.2.1. Поліморфізм за послідовністю *COI* мтДНК метеликів родини Drepanidae

Протягом останніх десятиліть використання генів мтДНК набуло широкого розповсюдження в вивченні систематики Лускокрилих. Аналіз нуклеотидних послідовностей *COI* наразі успішно використовують при описі нових видів, а також в популяційних та екологічних дослідженнях метеликів (Erlandson et al., 2019; Liao et al., 2019). Технічна зручність в використанні та

Вирівнювання нуклеотидних послідовностей гена *COI* показало наявність чисельних SNP, характерних для того чи іншого виду (рис. 3.2.1). В цілому, рівень подібності послідовностей гена *COI* при порівнянні різних видів знаходиться в межах від 85.5 до 99,4 % (табл. 3.2.1).

Неочікувано, в геномі *Drepana arcuata*, який зібраний на рівні скефолдів, було виявлено три різних варіанта *COI*, серед яких два ідентичні, а третій відрізняється чотирма SNP. Така картина може бути наслідком присутності у ядерному геномі нефункціональних копій мітохондріальних генів, які могли в процесі еволюції зазнати мутацій. Подібні випадки вже неодноразово описувались для мтДНК (Nazkani-Covo et al., 2010; Baeza & Fuentes, 2013; Ozana et al., 2022).

Рівень подібності послідовностей гена *COI*, наявних у GenBank та експериментально отриманих нами становить 98% для *Thyatira batis* та 99,4% для *Habrosyne pyritoides*. Це свідчить, що використання цього молекулярного маркера дозволяє виявляти генетичну різницю між популяціями метеликів в межах одного виду.

На основі вирівнювання послідовностей *COI* була побудована дендрограма, яке відображає філогенетичні взаємозв'язки між представниками родини Drepanidae (рис. 3.2.2). Дві основні клади на дереві репрезентують підродини в межах родини – Thyatirinae та Drepaninae, в межах яких з достатньою статистичною підтримкою були розташовані проаналізовані нами види.

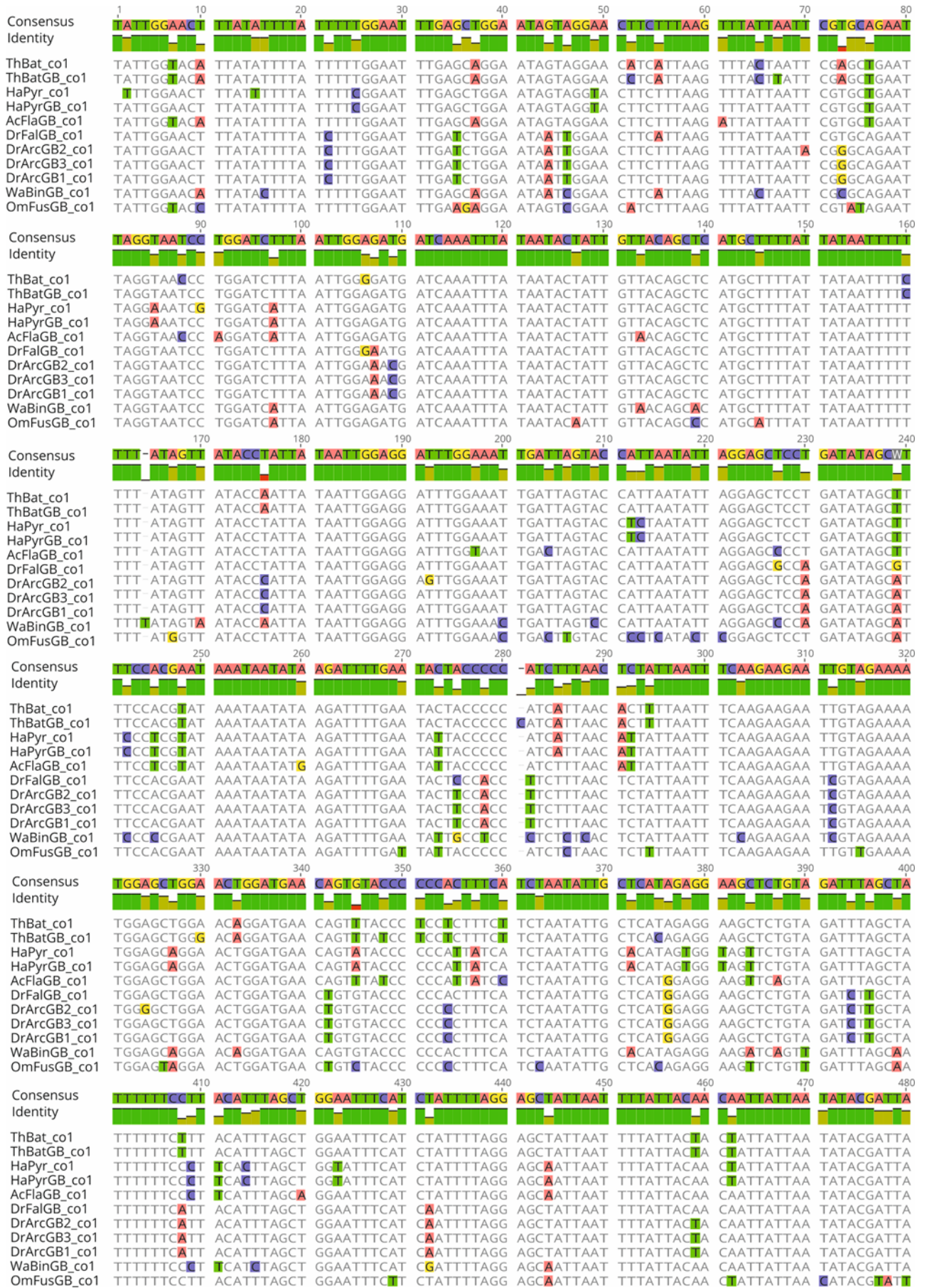


Рисунок 3.2.1 (початок)



Рисунок 3.2.1 (закінчення). Вирівнювання ділянки гену *COI* для окремих метеликів родини Drepanidae. Різними кольорами виділені однуклеотидні поліморфізми.

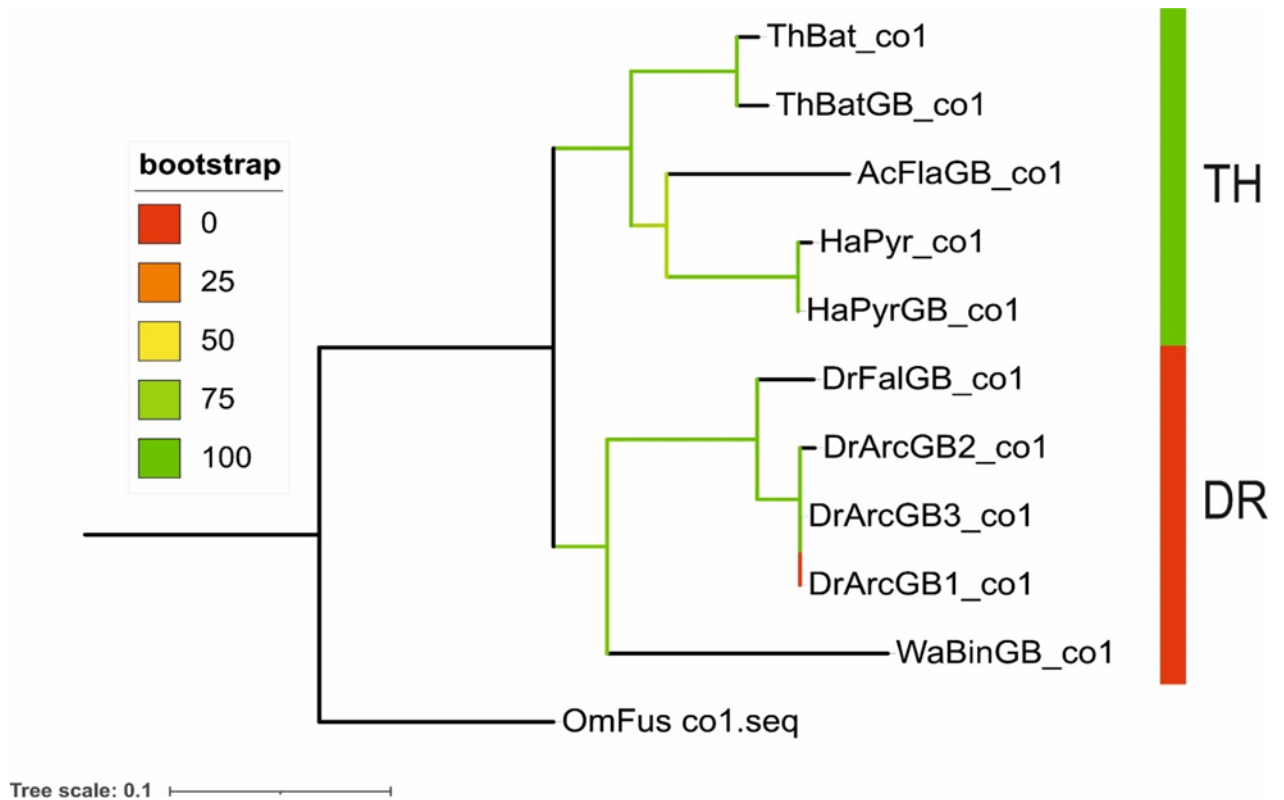


Рисунок 3.2.2. ML-філодендрограма побудована на основі вирівнювання послідовностей *COI*. Аббревіатурами TH та DR вказані відповідні підродини – Thyatirinae та Drepaninae. Послідовність виду *Omphisa fuscidentalis* (Crambidae) використана в якості зовнішньої групи.

3.2.2. Клонування повторів 5S рДНК метеликів та біоінформатичний скринінг геномів у Genbank

У попередньому розділі було проаналізовано організацію 5S рДНК у видів роду *Apis*, які належать до ряду Перетинчастокрилих (Hymenoptera). На наступному етапі дисертаційного дослідження було поставлено завдання з'ясувати наскільки організація 5S рДНК відрізняється у представників інших рядів комах, зокрема у Лускокрилих (Lepidoptera).

Було вирішено проаналізувати особливості молекулярної організації та розташування 5S рДНК у різних представників родини Drepanidae. В результаті клонування 5S рДНК було отримано вісім послідовностей IGS для двох видів підродини Thyatirinae: три клони для *Habrosyne pyritoides* та п'ять – для *Thyatira batis* (табл. 3.2.2). Всі отримані клони містили на 5' та 3' кінцях фрагменти кодувальної ділянки включно із використаними для ПЛР праймерами. Порівняльний аналіз показав, що довжини IGS метеликів родини Drepanidae коливаються в дуже широких межах. Найменша за розміром послідовність IGS була отримана для *T. batis*: 72 нп, а найбільша - для *H. pyritoides*: 618 нп.

Таблиця 3.2.2

Характеристики IGS 5S рДНК представників родини Drepanidae

Вид	Походження зразка	Назва риботипу	Хромосомна локалізація	IGS	
				Довжина, нп	Вміст GC, %
Підродина Thyatirinae					
<i>Achlya flavicornis</i>	GCA_947623365.1	AcFlaGB8-1	8	140	25
		AcFlaGB14-1	14	141	31,2
		AcFlaGB14-2		129	30,2
		AcFlaGB14-3 ³		128	26,6
		AcFlaGB14-4 ¹		135	31,1
		AcFlaGB14-5 ¹		135	31,1
		AcFlaGB14-6 ³		128	26,6
		AcFlaGB14-7		141	31,2
		AcFlaGB14-8 ²		140	28,6
		AcFlaGB14-9 ²		140	28,6
		AcFlaGB14-10		129	31,8
		AcFlaGB14-11		130	27,7
		AcFlaGB14-13		130	26,9
		AcFlaGB14-14		130	23,1
		AcFlaGB14-15		139	27,3
		AcFlaGB14-16		130	28,5
		AcFlaGB14-17		135	25,9
		AcFlaGB14-18		134	24,6
		AcFlaGB14-19 ⁵		142	29,6
		AcFlaGB14-20 ⁴		142	28,9
		AcFlaGB14-21 ⁵		142	29,6
		AcFlaGB14-22 ⁴		142	28,9
		AcFlaGB14-23 ⁴		142	28,9
		AcFlaGB14-24 ⁵		142	29,6
		AcFlaGB14-25		140	27,9
		AcFlaGB14-26 ⁴		142	28,9
		AcFlaGB14-27 ⁵		142	29,6
		AcFlaGB14-28 ⁶		129	32,6
		AcFlaGB14-29 ⁴		142	28,9
		AcFlaGB14-30 ⁵		142	29,6
		AcFlaGB14-31 ⁶		129	32,6
		AcFlaGB14-32		142	28,2
		AcFlaGB14-33		129	31,8
		AcFlaGB14-34 ⁷		129	30,2
		AcFlaGB14-35	130	30	
		AcFlaGB14-36	129	31	
		AcFlaGB14-37	129	31	
		AcFlaGB14-38 ⁷	129	30,2	
		AcFlaGB14-39	129	32,6	
		AcFlaGB14-40 ⁷	129	30,2	
		AcFlaGB14-41	130	31,5	
		AcFlaGB14-42	129	28,7	
		AcFlaGB14-43	130	29,2	
		AcFlaGB14-44 ⁷	129	30,2	

		AcFlaGB14-45		129	28,7
		AcFlaGB14-46		129	32,6
		AcFlaGB14-47		129	29,5
		AcFlaGB14-48		130	27,7
		AcFlaGB14-50		128	30,5
<i>Habrosyne pyritoides</i>	м. Чернівці, Україна	HaPyr1-2	-	618	36,4
		HaPyr1-4		77	24,7
		HaPyr1-8		94	28,7
	GCA_907165245.1	HaPyrGB17-1	17	438	34,2
		HaPyrGB17-2		1008	30,9
		HaPyrGB17-3		768	32,8
		HaPyrGB17-5		880	30,8
		HaPyrGB17-4		892	33,6
		HaPyrGB17-6		1114	32,4
		HaPyrGB17-7		416	31,7
		HaPyrGB29-1	29	852	34
		HaPyrGB29-2		445	29,9
	HaPyrGB29-3	974		33,6	
<i>Ochropacha duplaris</i>	GCA_951361185.1	OcDupGB16-1 ¹³	16	111	31,5
		OcDupGB16-2		120	35,8
		OcDupGB16-3 ¹²		111	32,4
		OcDupGB16-4 ¹³		111	31,5
		OcDupGB16-5 ¹²		111	32,4
		OcDupGB16-6 ¹²		111	32,4
		OcDupGB16-7 ¹²		111	32,4
		OcDupGB16-8		111	33,3
		OcDupGB16-10 ¹⁴		111	34,2
		OcDupGB16-12 ¹³		111	31,5
		OcDupGB16-11 ¹²		111	32,4
		OcDupGB16-13 ¹³		111	31,5
		OcDupGB16-15 ¹⁴		111	34,2
		OcDupGB16-16 ¹²		111	32,4
		OcDupGB16-17 ¹³		111	31,5
		OcDupGB16-18 ¹³		111	31,5
		OcDupGB16-19 ¹⁴		111	34,2
		OcDupGB16-20		111	30,6
		OcDupGB16-21 ¹³		111	31,5
		OcDupGB16-22 ¹³		111	31,5
		OcDupGB16-23 ¹⁵		116	32,8
		OcDupGB16-24 ¹⁵		116	32,8
		OcDupGB16-25 ¹⁵		116	32,8
		OcDupGB16-26 ¹⁷		115	33,9
		OcDupGB16-27		116	32,8
		OcDupGB16-28 ¹⁶		116	31,9
		OcDupGB16-29 ¹⁶		116	31,9
		OcDupGB16-30 ¹⁶		116	31,9
		OcDupGB16-31 ¹⁶		116	31,9
		OcDupGB16-32		115	34,8
		OcDupGB16-33		116	33,6
		OcDupGB16-34 ¹⁶		116	31,9
		OcDupGB16-35		121	33,1
OcDupGB16-36 ¹⁷	115	33,9			
OcDupGB16-37 ¹⁶	116	31,9			
OcDupGB16-38 ¹⁷	115	33,9			
OcDupGB16-39 ¹⁵	116	32,8			

		OcDupGB16-40		502	37
		OcDupGB16-41		502	36,8
		OcDupGB17-1	17	78	37,2
		OcDupGB17-3		78	35,9
		OcDupGB17-4		78	37,2
<i>Tetheella fluctuosa</i>	GCA_951216915.1	TeFluGB15-1	15	125	24,8
		TeFluGB15-2		124	29
		TeFluGB15-3		124	29
		TeFluGB15-4		125	25,6
		TeFluGB15-5 ¹⁹		124	25,8
		TeFluGB15-6 ¹⁸		124	29,8
		TeFluGB15-7		124	26,6
		TeFluGB15-8		123	27,6
		TeFluGB15-9 ¹⁸		124	29,8
		TeFluGB15-10		124	31,4
		TeFluGB15-11		123	28,5
		TeFluGB15-12 ²⁰		124	28,2
		TeFluGB15-13		124	27,4
		TeFluGB15-14		123	27,6
		TeFluGB15-15		140	25,7
		TeFluGB15-16		1486	37,5
		TeFluGB15-17		759	35,3
		TeFluGB15-18		125	28,8
		TeFluGB15-20		124	29
		TeFluGB15-21 ¹⁹		124	25,8
TeFluGB15-22	127	31,5			
TeFluGB15-X	124	27,4			
TeFluGB15-X2 ²⁰	124	28,2			
<i>Thyatira batis</i>	м. Чернівці, Україна	ThBat1-1	-	72	34,7
		ThBat1-4		117	22,2
		ThBat1-5		122	31,1
		ThBat1-6		119	26,9
		ThBat1-8		72	33,3
	GCA_905147785.1	ThBatGB17-1	17	118	31,4
		ThBatGB17-2		116	25,9
		ThBatGB17-3		119	31,1
		ThBatGB17-4		122	24,6
		ThBatGB17-5 ²¹		122	30,3
		ThBatGB17-6		117	27,3
		ThBatGB17-7		122	31,1
		ThBatGB17-9 ²⁰		121	23,1
		ThBatGB17-10 ²⁰		121	23,1
		ThBatGB17-11		117	23,9
		ThBatGB17-12 ²¹		122	30,3
		ThBatGB17-13		117	32,5
		ThBatGB17-14		126	26,2
		ThBatGB17-15		119	26,9
		ThBatGB17-16		120	29,2
ThBatGB17-17	118	28,8			
ThBatGB19-1	19	324	26,2		
ThBatGB19-2		546	30,2		
ThBatGB19-3		324	25,9		
Підродина Drepaninae					
<i>Drepana arcuata</i>	GCA_016069955.1	DrArcGB2sc-1 ⁹	-	109	31,2
		DrArcGB2sc-2 ⁹		109	31,2

		DrArcGB2sc-3		92	31,5
		DrArcGB2sc-5		109	30,3
		DrArcGB2sc-6		411	37,2
		DrArcGB2sc-7		92	30,4
		DrArcGB2sc-8 ⁸		92	32,6
		DrArcGB2sc-9		105	29,5
		DrArcGB2sc-10 ⁸		92	32,6
		DrArcGB3sc-1		182	22
		DrArcGB3sc-2		181	24,3
		DrArcGB9sc-1		110	21,8
<i>Drepana falcataria</i>	GCA_945859725.1	DrFalGB7-1 ¹⁰	7	683	35,7
		DrFalGB7-2		1553	34,6
		DrFalGB7-3		344	29,9
		DrFalGB7-4 ¹⁰		683	35,7
		DrFalGB8-1	8	169	26
		DrFalGB8-2		163	24,5
		DrFalGB14-1	14	111	20,7
		DrFalGB16-1	16	92	32,6
		DrFalGB16-1		1155	42,1
		DrFalGB16-3		106	30,2
		DrFalGB16-4		92	29,3
		DrFalGB16-5		732	36,7
		DrFalGB16-7		113	31,9
		DrFalGB16-8		1231	37,2
		DrFalGB16-9		1500	36,9
		DrFalGB16-10		323	36,8
		DrFalGB16-11		1436	36,3
		DrFalGB16-12		111	25,2
		DrFalGB16-13		110	27,3
		DrFalGB16-14		111	26,1
		DrFalGB16-15		106	27,4
		DrFalGB16-16		106	25,5
		DrFalGB16-17		65	33,8
		DrFalGB16-18 ¹¹	109	28,4	
		DrFalGB16-19	106	26,4	
		DrFalGB16-20 ¹¹	109	28,4	
		DrFalGB18-1	18	183	24,6
<i>Watsonalla binaria</i>	GCA_929442735.1	WaBinGB3-1	3	319	27
		WaBinGB3-2		314	27,1
		WaBinGB3-3		315	28,9
		WaBinGB3-4		319	27,3
		WaBinGB7-1	7	213	31
		WaBinGB7-2		190	31
		WaBinGB7-3		902	34,9
		WaBinGB7-4		190	31,6
		WaBinGB7-5		557	32,7
		WaBinGB7-6		799	35,2
		WaBinGB7-7		189	30,7
		WaBinGB7-8	924	34	
		WaBinGB7-9	213	30,5	
		WaBinGB12-1	12	159	32,1
		WaBinGB15-1	15	132	28
		WaBinGB15-2		147	32
		WaBinGB15-3		147	29,2
WaBinGB15-4 ²³	133	29,3			

		WaBinGB15-5 ²³		133	29,3
		WaBinGB15-6		125	32
		WaBinGB15-7		131	29
		WaBinGB15-8		737	32,6
		WaBinGB15-9		144	33,3
		WaBinGB15-10 ²²		143	30,8
		WaBinGB15-11		979	38,9
		WaBinGB15-12		147	27,9
		WaBinGB15-13		599	32
		WaBinGB15-15		147	28,6
		WaBinGB15-17		1585	39,3
		WaBinGB15-16 ²²		143	30,8
		WaBinGB15-18		143	31,5
		WaBinGB15-19		136	32,3
		WaBinGB15-20		638	31,5
		WaBinGB15-21		136	33,8
		WaBinGB15-22		158	27,8
		WaBinGB18-1	18	156	30,1
		WaBinGB18-2		142	28,2
		WaBinGB18-3		141	29,1
Родина Noctuidae					
<i>Aranea monoglypha</i>	м. Чернівці, Україна	ArMon1-1	-	150	24,7
		ArMon1-2		193	23,3
		ArMon1-3		294	31,6
		ArMon1-4		247	32
		ArMon1-5		271	32,1
		ArMon1-6		211	27
		ArMon1-7		253	31,2
		ArMon1-8		194	23,7
		ArMon1-9		203	27,6
		ArMon1-11		151	25,2

Примітка: ідентичні послідовності позначені однаковими індексами.

Окрім того, для порівняння нами було клоновано ділянку IGS нічного метелика-шкідника мрамурівки польової великої, *Aranea monoglypha*, яка належить до родини Noctuidae. На загал вдалось отримати 10 послідовностей IGS довжиною від 150 до 254 нп (табл. 3.2.2). Всі ці послідовності мають різний розмір, що свідчить про високий рівень внутрішньогеномного поліморфізму цієї ділянки.

Нами також було проведено скринінг геномів восьми видів родини Drepanidae, які наявні у базі даних GenBank. Це дозволило виявити ще 188 риботипів IGS, довжина яких змінюється у дуже широких межах – від 65 нп у *Drepana falcataria* до 1585 нп у *Watsonalla binaria* (табл. 3.2.2). При цьому в

усіх досліджених видів в межах геномів знайдено по декілька риботипів, які відрізняються за довжиною. Вміст GC пар у IGS досліджених видів становить від 20,7 до 38,9% при середньому значенні 29,8%, тобто є досить низьким.

Для подальшого аналізу послідовності IGS було умовно розділено на дві групи: короткі, довжиною до 300 нп, та довгі, від 301 нп. Виявилось, що серед 206 досліджених риботипів 162 є короткими, а – 44 довгими. При цьому довгі IGS знайдено не у всіх досліджених видів. Отже, для метеликів короткі IGS можна вважати типовими, а довгі – скоріше виключенням.

Раніше у нашій лабораторії було досліджено організацію 5S рДНК для видів метеликів, які представляють родини *Nymphalidae*, *Lycaenidae* та *Sphingidae* (Cherevatov & Volkov, 2010; Cherevatov & Volkov, 2011; Cherevatov et al., 2012). Поліморфізм аналізованих послідовностей виявився високим навіть у окремих індивідуумів. Довжини IGS коливались від коротких, розміром 60 нп, до довгих – 959 нп.

В цілому наявні на сьогодні дані свідчать про високий рівень внутрішньовидового поліморфізму за довжиною IGS у всіх досліджених родинях лускокрилих.

3.2.2.1. Хромосомна локалізація 5S рДНК у геномах метеликів родини *Drepanidae*

Скринінг бази даних GenBank дозволив виявити сім анотованих геномів, зібраних на рівні хромосом. Це дало змогу встановити кількість і хромосомну локалізацію кластерів 5S рДНК в межах кожного геному та визначити кількість повторів у кожному кластері (табл. 3.2.3). Виявлено, що у більшості проаналізованих видів підродина *Thyatirinae* кластери 5S рДНК знаходяться на двох хромосомах, за виключенням *Tetheella fluctuosa*, у якого наявний лише один кластер. На противагу цьому, у двох досліджених представників підродина *Drepaninae*, *Drepana falcataria* та *Watsonalla binaria*, знайдено по п'ять кластерів 5S рДНК. Можна висунути припущення, що додаткові мінорні

кластери у видів підродина Drepaninae виникли вже після її дивергенції від підродина Thyatirinae.

Таблиця 3.2.3

Хромосомна локалізація та кількість повторів у кластерах 5S рДНК метеликів родини Drepanidae

Вид	Номер хромосоми	Кількість повторів
Підродина Thyatirinae		
<i>Achlya flavicornis</i>	8	1
	14	48
<i>Habrosyne pyritoides</i>	17	7
	29	3
<i>Ochropacha duplaris</i>	16	39
	17	3
<i>Tetheella fluctuosa</i>	15	23
<i>Thyatira batis</i>	17	16
	19	3
Підродина Drepaninae		
<i>Drepana falcataria</i>	7	4
	8	2
	14	1
	16	19
	18	1
<i>Watsonalla binaria</i>	3	4
	7	9
	12	1
	15	21
	18	3

Примітка: Жирним шрифтом позначено основний кластер 5S рДНК.

Як видно з таблиці 3.2.3, у кожного виду наявний основний кластер, де зосереджена переважна кількість тандемно організованих повторів 5S рДНК.

Проте, у видів підродина *Drepaninae* частка повторів представлена у вигляді одиничних копій, які видаються випадково «розкиданими» по різних хромосомах геному, включно із статевою хромосомою *Z* у *Habrosyne pyritoides* (табл. 3.2.2). У доступній нам літературі згадки про такий варіант геномної організації 5S рДНК відсутні. Отже, нами вперше виявлена диспергована організації 5S рДНК у еукаріотичних організмів, хоча у деяких попередніх роботах є окремі вказівки на таку можливість (Provaznikova et al. 2021). Зокрема, в роботі Provaznikova et al. (2021) при спробах ідентифікувати кластери 5S рДНК на хромосомах метеликів народин *Herpialoidea*, *Tischerioidea*, *Tineoidea*, *Gracillarioidea*, *Yponomeutoidea*, *Tortricoidea*, *Cossoidea*, *Papilionoidea*, *Gelechioidea*, *Pyraloidea*, *Noctuoidea*, *Geometroidea*, *Bombycoidea* шляхом FISH-гібридизації спостерігався великий відсоток негативних результатів, що на думку авторів могло бути пов'язано із відсутністю тандемної кластерної організації 5S рДНК. На підтвердження цієї гіпотези автори також наводять результати Саузерн-блоттингу. Проведений нами біоінформатичний скринінг хромосом однозначно доводять можливість диспергової організації 5S рДНК і наводять на думку, що така організація у різних таксономічних групах Лускокрилих.

3.2.2.2. Молекулярна організація та поліморфізм IGS 5S рДНК представників родини *Drepanidae*

На основі вирівнювання всіх отриманих послідовностей IGS 5S рДНК представників родини *Drepanidae* нами була побудована неукорінена ML-філодендрограма (рис. 3.2.3). На отриманому дереві переважна більшість риботипів розподіляються між двома великими кладами, які мають високу статистичну підтримку та відповідають двом досліджуваним підродинам, *Drepaninae* та *Thyatirinae*. В межах кожної підродина риботипи з одного і того ж геному збираються разом, утворюючи монофілетичні або поліфілетичні групи.

Рівень подібності риботипів в межах цих груп знаходиться в межах від 17,9 до 99,1 %.

Виключенням із загальної картини є деякі риботипи видів *O. duplaris* та *T. batis*, які групуються з риботипами інших видів. Особливо неочікуваною є положення на дендрограмі клонів, отриманих нами для зразка *T. batis* з Чернівців, які групуються разом із риботипами видів роду *Drepana* з іншої підродини. Зауважимо, що останній результат не може бути помилкою при визначенні зразка *T. batis* з Чернівців, оскільки видова приналежність цього зразка підтверджується сиквенуванням гена *COI* (рис. 3.2.2). Ще один риботип, ThBatGB19-1 настільки відрізняється від всіх решта, що не групуються із жодним іншим, а утворює окрему гілку на дендрограмі. Всі ці результати свідчать про надзвичайний поліморфізм IGS *T. batis*.

На загал, аналіз отриманої дендрограми свідчить, що в геномах метеликів родини Drepanidae одночасно присутні як архаїчні предкові, так і похідні від них еволюційно молоді риботипи IGS. Тобто, концертна еволюція IGS відбувається неефективно. Така картина узгоджується із еволюційною моделлю «народження та смерті» (birth and death).

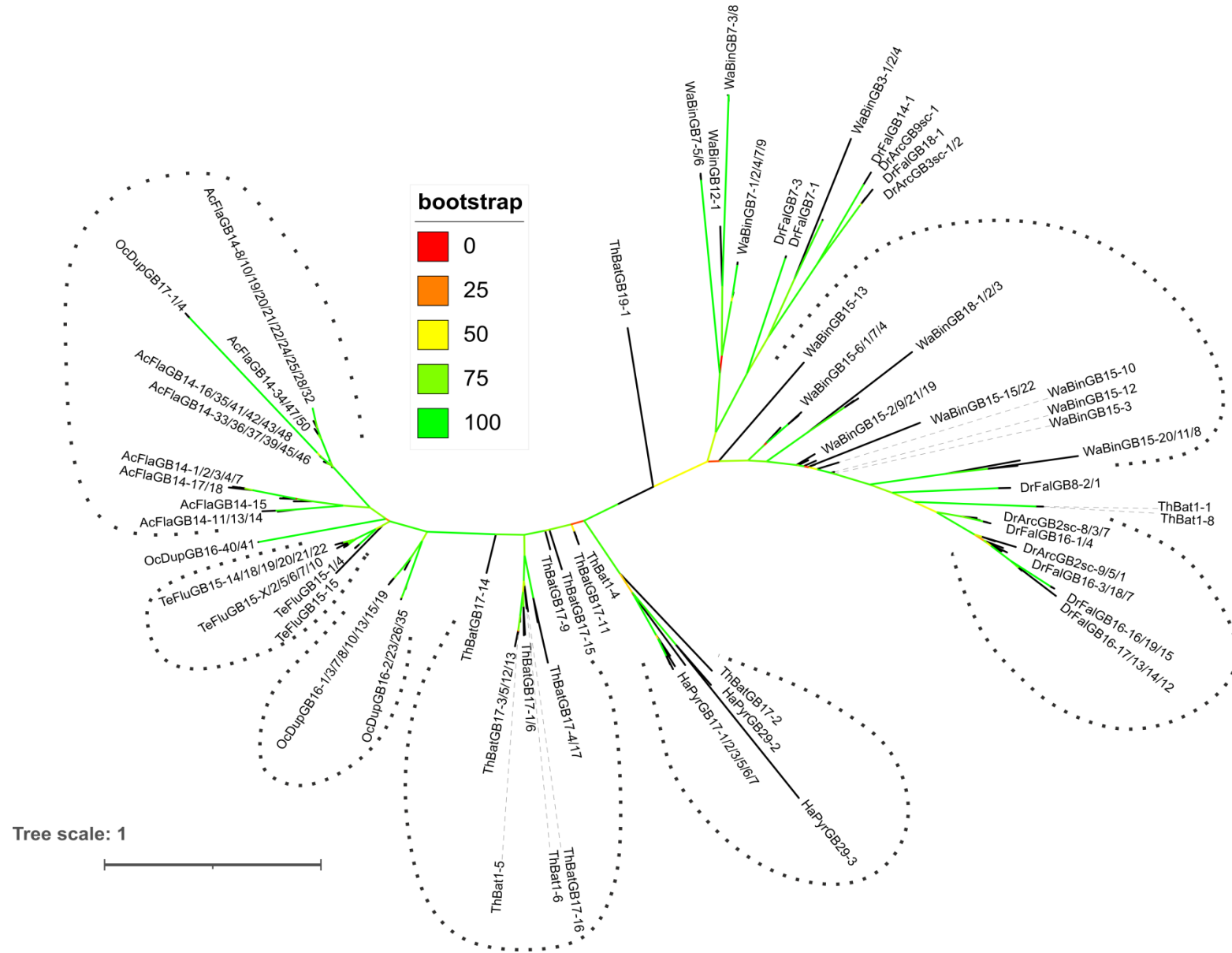


Рисунок 3.2.3. Неукорінена ML-філодендрограма, побудована для на основі MAFFT-вирівнювання IGS 5S рДНК представників родини Drepanidae.

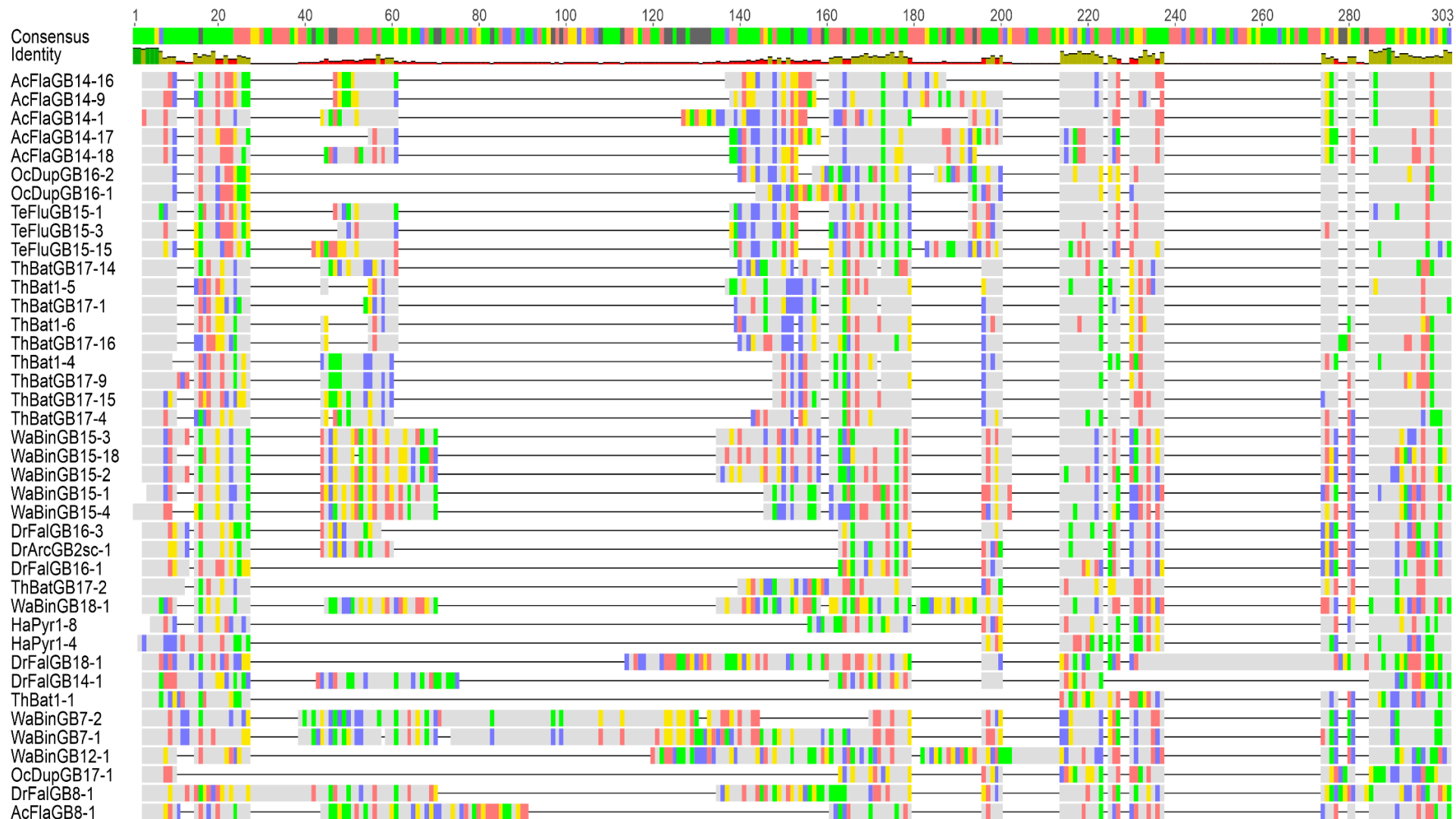


Рисунок 3.2.4. Порівняння на основі MAFFT-вирівнювання обраних риботипів короткого варіанту IGS 5S рДНК представників родини Drepanidae. Легенда: А – червоний колір, Т – зелений, G – жовтий, С – синій.

Для того, щоб отримати уявлення про характер молекулярної еволюції коротких варіантів IGS представників родини Drepanidae, ми побудували вирівнювання для риботипів, які репрезентують різні групи, присутні на дендрограмі (рис. 3.2.4). Порівняння обраних риботипів свідчить, що вони різняться чисельними інделами та SNP у різних частинах IGS.

Аналіз послідовностей 44 довгих варіантів IGS показав, що рівень подібності між риботипами з геномів різних видів є дуже низьким – від 21,4 до 36%. Такий результат свідчить, що довгі варіанти IGS у геномах різних видів не мають спільного походження, а виникали незалежно у геномі кожного виду.

Рівень подібності IGS в межах одного геному коливався у дуже широких межах – від 21,8 до 100%. Високий рівень подібності риботипів з одного геному говорить про те, що вони виникли як результат дуплікації однієї предкової послідовності із подальшим накопиченням мутацій в ході еволюції.

Цікаво, що серед довгих варіантів IGS в геномі метелика *H. pyritoides* нами було виявлено риботип HaPyr1-2, в межах якого знаходиться неповний фрагмент CDS (рис. 3.2.5). Походження цього риботипу вочевидь пов'язане з інсерцією фрагменту CDS у IGS. У інших досліджених видів випадків інсерції фрагментів CDS в IGS виявлено не було. Видається, що утворення такого специфічного риботипу є рідкісною подією у молекулярній еволюції 5S рДНК лускокрилих.

Аналіз послідовностей коротких та довгих варіантів IGS на наявність потенційних зовнішніх елементів промотору РНК-полімерази III виявив консервативний АТ-багатий мотив на 3' кінці IGS, тобто безпосередньо перед CDS (рис. 3.2.6). Раніше в межах досліджень лабораторією нашої кафедри були описані подібні елементи для денних метеликів. Зокрема, для виду *Melitaea trivia* (Nymphalidae) було описано мотиви ТААТАТ/ТАGAGТ в положенні від -25 нп до -20 нп (Cherevatov & Volkov, 2011). Аналіз послідовностей IGS 5S рДНК представників родини Drepanidae та метелика *A. monoglypha* показав відсутність саме в цьому положенні АТ-багатої ділянки. Проте, схожий мотив був нами виявлений у положенні від -20 нп до -14 нп перед початком CDS.

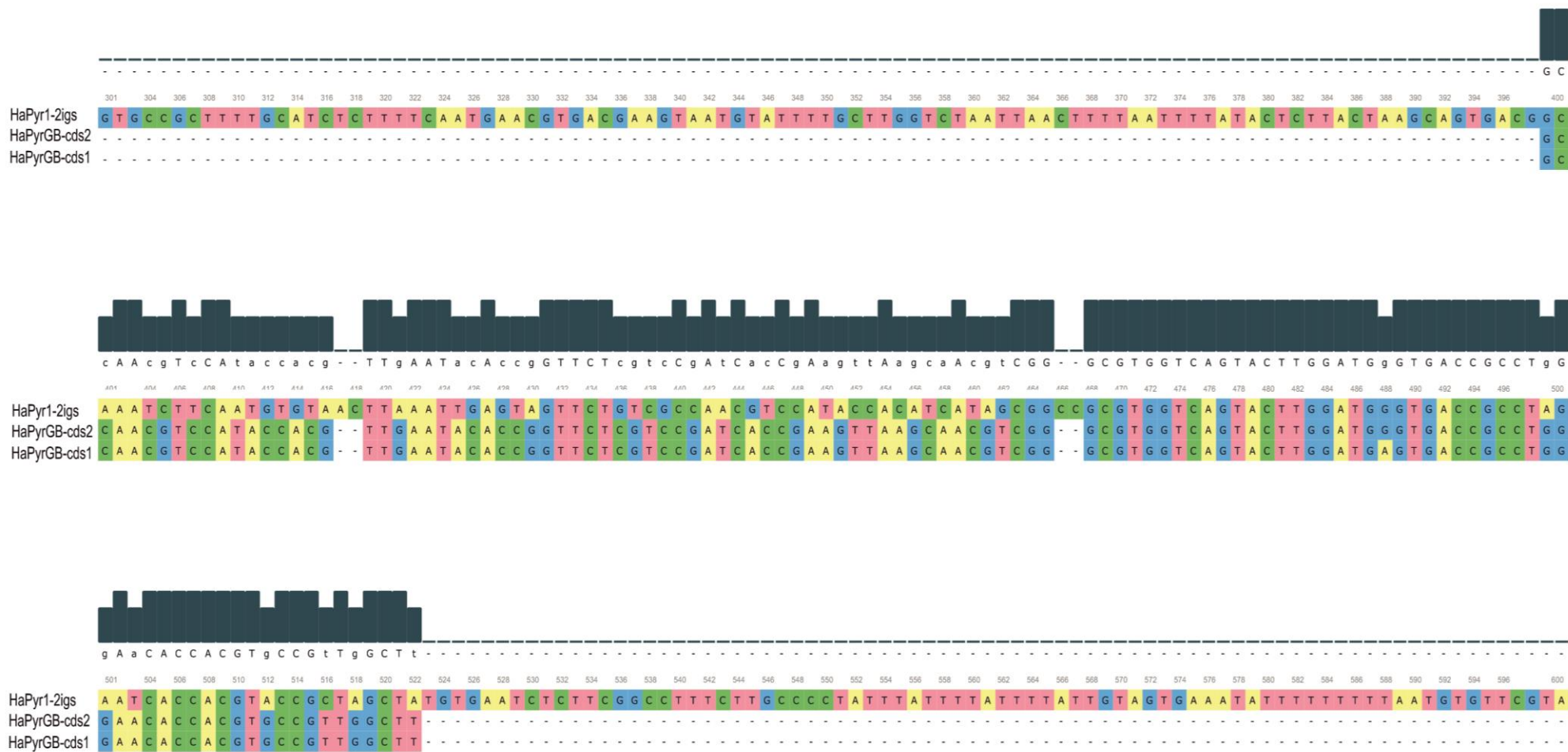


Рисунок 3.2.5. Вирівнювання риботипу HaPyr1-2 5S рДНК *H. pyritoides* та кодувальної ділянки.

На 5' кінці IGS, тобто після CDS (рис. 3.2.6) у всіх досліджених видів було знайдено oligo-T мотиви, які являють собою послідовності термінатора транскрипції РНК-полімерази III.

Majority	XXXXXXXXTTTGCTTTTT	CGGATTTTGAAGGTA	AAAA	XXXXXXXXXXXXXXXX	TTGAGTTGAGCAGTC
	10	330	340	350	360
HaPyr1-4igs	'''''' TCTTGCCCCTAT	TTTAATGTGTTTCGT	AATA'	''''''''''''''''''''	TTGAGCACTTTAGTC
HaPyr1-8igs	'''''''' TGCATCTCT	TTCAATGTGTAAC	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTGGGTAGTTCTGTC
ApMon1-3igs	'''''''' TTTGCATTTTT	TAGATATTAATGA	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTCGACACGACGAAT
ThBat1-4igs	'''''''' TTTGCTTTACA	ATAATTTTGAATGT	AATA'	''''''''''''''''''''	TTGAGTTGAGTAGTC
ApMon1-4igs	'''''''' TTTGCATTTTT	ATGATATTGAACGT	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTCGACCTAGCATTC
ThBat1-5igs	'''''''' TTTGCTTTTAC	GGAAACTTGTAGGT	AGAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGTTGAGCAGTC
ThBatGB17-7igs	'''''''' TTTGCTTTTAC	GGAAACTTGTAGGT	AGAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGTTGAGCAGTC
ThBatGB17-5igs	'''''''' TTTGCTTTTAC	GGAATCTTGTAGGT	AGAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGTTGAGCAGTC
ThBat1-6igs	'''''''' TTTGCTTTTAT	GGAGTTTTGTAGTT	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGTTGGATAGTC
ThBatGB17-4igs	'''''''' TTTGCATTCTC	TGAATTTTGAAGAC	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGTTGCGTTTTTC
AcFlaGB14-10igs	'''''''' TTTGCAACCTC	TGGCTTTAGGTGGT	ATAA'	''''''''''''''''''''	TTAAGTTATGAAGTC
AcFlaGB14-8igs	'''''''' TTTGCAACCTT	TGA' ' CTAGGTGGT	ATAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGTTGTGAAGTC
AcFlaGB14-9igs	'''''''' TTTGCAACCTT	TGA' ' CTAGGTGGT	ATAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGTTGTGAAGTC
OcDupGB16-10igs	'''''''' TTTGCACCCAT	CGGATTTTGTAGGT	AAAA'	''''''''''''''''''''	TCGAGTTGTTTTGTC
OcDupGB16-7igs	'''''''' TTTGCTTCTAT	CGGATTTTGTAGGT	AAAA'	''''''''''''''''''''	TCGAGTTGTTTTGTC
OcDupGB16-1igs	'''''''' TTTGCTTCTAT	CGGATTTTGTAGGT	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGTTGTATAGTC
TeFluGB15-8igs	'''''''' TTTGCATTG' T	TAGATTTTGTAGGT	ACAA'	''''''''''''''''''''	TTTAGTTGTACAGTC
TeFluGB15-7igs	'''''''' TTTGCATTGTT	TAGATTTTGTAGGT	ACAA'	''''''''''''''''''''	TTTAGTTGTATAGTC
TeFluGB15-2igs	'''''''' TTTGCATTGTT	TAGATTTTGAAGGT	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGTTGTACAGTC
ApMon1-1igs	'''''''' TTTGCGTTTTA	TTTATACTGAACGT	TAAA'	''''''''''''''''''''	TTCGACTTACCATTTC
ApMon1-11igs	'''''''' TTTGCGTTTTA	TTTATATTGAACGT	TAA'	''''''''''''''''''''	TTCGACTCAGCATTTC
ApMon1-5igs	'''''''' TTTGAGTTTTT	TTGATATTGAACGA	ATAA'	''''''''''''''''''''	TTCGACCTACCATAC
ThBatGB17-2igs	'''''''' TTTGCTTTTTT	TAAAATTTGGAAGA	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTTAGTTAAGCAGTC
ThBat1-8igs	'' TTTGTTTCGCATTTTA	AATGATCTGACGACA	AATT'	''''''''''''''''''''	TCCAGTCACGCATTTC
ThBat1-1igs	'' TTTGTTTCGCATTTTA	AATGATCTGTCGACA	AGT'	''''''''''''''''''''	TCCAGTCACGCATTTC
ApMon1-7igs	'''''''' TTTGCATTTTT	GATGTTATACAGAGTT	GATAGGATT	CGACTATTTGAGCACT	GCTCTT
ApMon1-2igs	'''''''' TTTGCTTTTTT	CCCATACAGACTT	TAA'	''''''''''''''''''''	TTCGACTTAGCTATC
ApMon1-8igs	'''''''' TTTGCTTTTTT	CCCATACATACTT	TAA'	''''''''''''''''''''	TTCGACTTAGCTATC
ApMon1-9igs	'''''''' TTTGCTTTTTT	CCCATAGAGATT	GATAA'	''''''''''''''''''''	TTGCTGTAGCTATC
ApMon1-6igs	'''''''' TTTTATTCATT	CCCATAGAGATT	GATAA'	''''''''''''''''''''	TTGCTGTAGCTATC
DrArcGB2sc-1igs	'' TTTGCTGGTTCTTTT	CGGAATCTCGCAAC	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTCAGAATCACTCTC
DrArcGB2sc-2igs	'' TTTGCTGGTTCTTTT	CGGAATCTCGCAAC	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTCAGAATCACTGTC
DrFalGB16-7igs	'' TTTGCTAGTACTTTT	CGGAATCTCGCTACA	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGGCTGTCTACT
DrArcGB2sc-5igs	'' TTTGCTAGTCTTTT	CGGAATCCAGCTACA	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTAAGCTATGCGTTC
DrFalGB16-13igs	TTTTTGGCTAGTCTTTT	CTACATATATCAAC	CAAA'	''''''''''''''''''''	TTGAGAAATGCTGTT
DrFalGB16-4igs	'' TTTGCTAGTTTTATT	CGGAATCGCTCTACA	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTTATTTAAGCTATC
WaBinGB15-10igs	'''''''' TTTGCCATTTA	CTGAATGTGAGCAC	AAAA'	''''''''''''''''''''	TTAGTCGGAGCATGC
WaBinGB15-2igs	'''''''' TTTGCCATTTA	ATGAATCTGAGCAC	AAAA'	''''''''''''''''''''	TCCGGTAGAGCGTTC
WaBinGB15-9igs	'''''''' TTTGCCATTTA	CTGAATTGAAGCAC	ATAA'	''''''''''''''''''''	TTGGGCAGAGCATTC

Рисунок 3.2.6. Порівняння потенційних зовнішніх елементів промотору РНК-полімерази III. З лівого боку наведений oligo-T мотив, з правого –AT-багата ділянка.

3.2.2.3. Організація та поліморфізм кодувальної ділянки 5S рДНК метеликів

Перші дослідження кодувальної послідовності гену 5S рРНК у метеликів були здійснені для шовкопряда – *Bombyx mori* L (Troutt et al., 1982; Morton & Sprague, 1984). Проте, з часом дослідження 5S рДНК метеликів практично припинились з огляду на появу більш універсальних маркерних послідовностей, зокрема мтДНК, які дозволяли швидше та ефективніше встановлювати філогенетичні взаємозв'язки між різними групами/таксонами лускокрилих. Таким чином інформація стосовно генів 5S рРНК метеликів представлена обмеженою кількістю досліджень, частина з яких була опублікована ще у минулому столітті.

Пошук гомологічних послідовностей до CDS 5S рДНК проводили в зібраних та анотованих геномах для восьми представників родини Drepanidae, використовуючи послідовності CDS описані в літературі та фрагменти кодувальних ділянок сиквенованих нами.

Вирівнювання отриманих з GenBank CDS показало присутність чисельних точкових нуклеотидних замін, більша частина яких є унікальними (рис. 3.2.7). Також, унікальними є всі 11 інделів, присутні на вирівнюванні. Незначна частина SNP є специфічною для послідовностей окремих видів, зокрема, такими є дві транзиції, G→A та C→T у більшості послідовностей *W. binaria* (WaBin). Ще менший відсоток замін є спільним для декількох видів. Наприклад, транзиція в положенні 125 нп вирівнювання є спільною для наступних видів: *D. falcataria*, *T. fluctuosa*, *W. binaria* та *T. batis*.

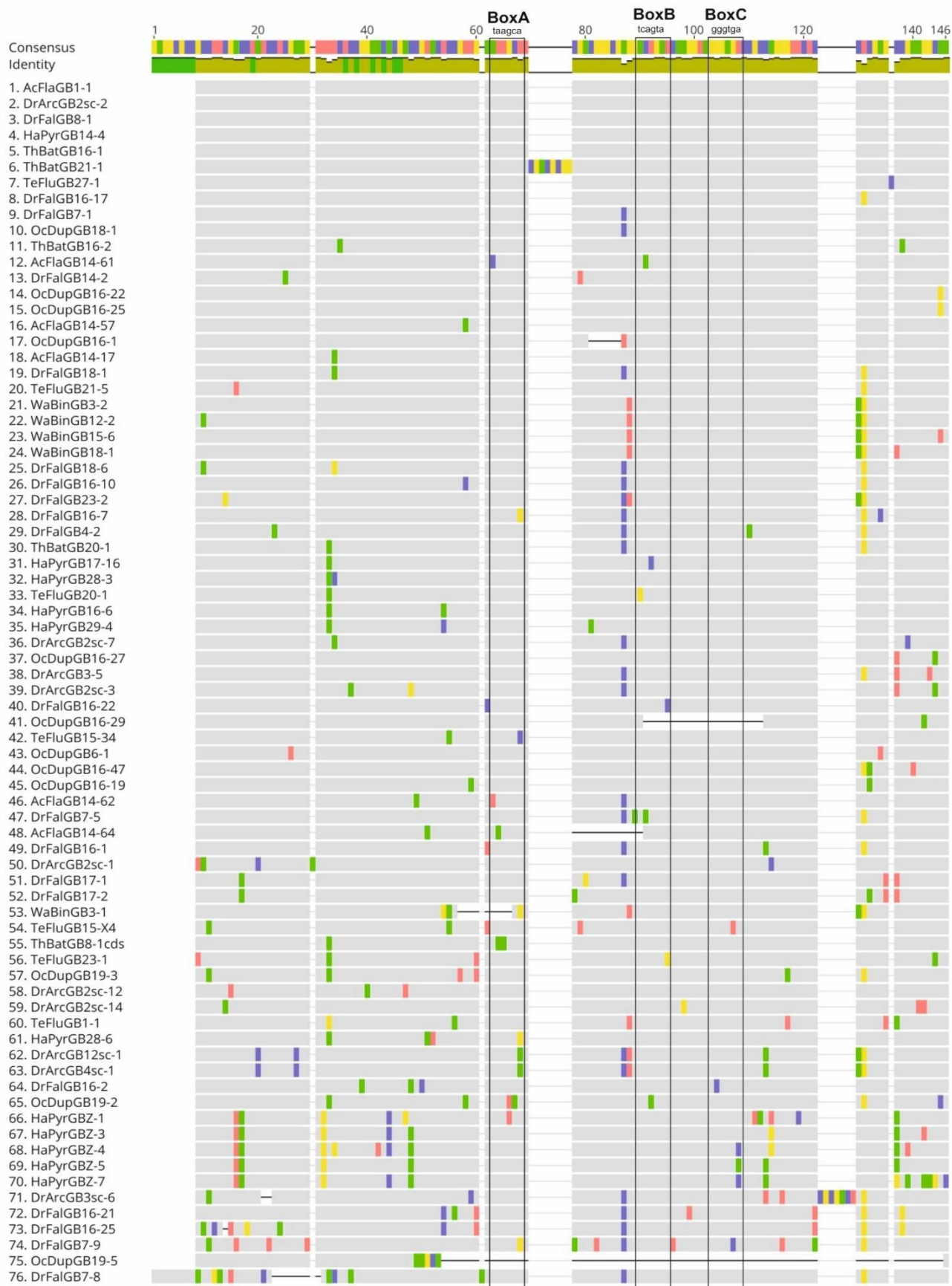


Рисунок 3.2.7. Вирівнювання кодувальних ділянок 5S рДНК метеликів родини Degeraniidae. Внутрішні елементи промотору позначені рамкою. Легенда: А – червоний колір, Т – зелений, G – жовтий, С – синій.

Особливу ситуацію являють собою CDS, ідентифіковані нами на статевій Z-хромосомі виду *H. pyritoides*. Для них характерна наявність численних замін, спільних для всіх послідовностей на Z-хромосомі, які відрізняють ці CDS від інших CDS в геномі цього виду.

Значний поліморфізм CDS 5S рДНК вказує на зменшення ролі концертної еволюції, що ймовірно, є наслідком диспергованої організації цих послідовностей в геномах метеликів.

Пошук внутрішніх елементів промотору РНК-полімерази III дозволив виявити ділянки Box A, Box B та Box C, присутність та функціональна роль яких була описана для тутового шовкопряда (Vierna et al., 2013). В більшості проаналізованих CDS ці три елементи не містять більше однієї нуклеотидної заміни та не порушені інделами, що може свідчити про функціональність відповідних генів 5S рРНК (рис. 3.2.7). Проте, деякі послідовності зазнали значних перебудов у внутрішніх елементах промотора. Зважаючи на важливу роль, яку виконують вищезгадані елементи у ініціації транскрипції РНК-полімеразою III, присутність мутацій в межах цих мотивів може вказувати на потенційну втрату такими CDS їх функції та перетворення у псевдогени.

Для того, щоб оцінити можливий вплив виявлених SNP та інделів на функціональність кодувальних ділянок, ми розраховали прогнозовані вторинні структури для гіпотетичних транскриптів 5S рРНК (рис. 3.2.8). Аналіз побудованих структур показує, що послідовності, ідентичні із консенсусними для відповідних видів (рис. 3.2.8 А), утворюють типові для багатоклітинних тварин тридоменні вторинні структури (Barciszewska et al., 2001). На противагу цьому, для структур на основі послідовностей CDS із значною кількістю мутацій характерні значні відхилення (рис. 3.2.8 В). Зокрема, для CDS ThBatGB21-1, яка містить специфічну інсерцію, прогнозована вторинна структура виявилась відмінною від канонічної, що свідчить про її ймовірну нефункціональність. Потенційними псевдогенами видаються і кодувальні ділянки, знайдені нами на статевій Z-хромосомі виду *H. pyritoides*. Ймовірно

вторинні структури, розраховані для них, виявились суттєво відмінними від консенсусних. В той же час, послідовність NaPutGBZ-4 зі статевої Z-хромосоми виду *H. pyritoides*, хоча і містить 11 нуклеотидних замін по відношенню до консенсусу, утворює структуру, що нагадує канонічну, хоча її стабільність може бути зниженою.

На загал можна стверджувати, що присутність олігонуклеотидних інделів та/або великої кількості SNP у CDS 5S рДНК метеликів може призводити до їх перетворення псевдогени.

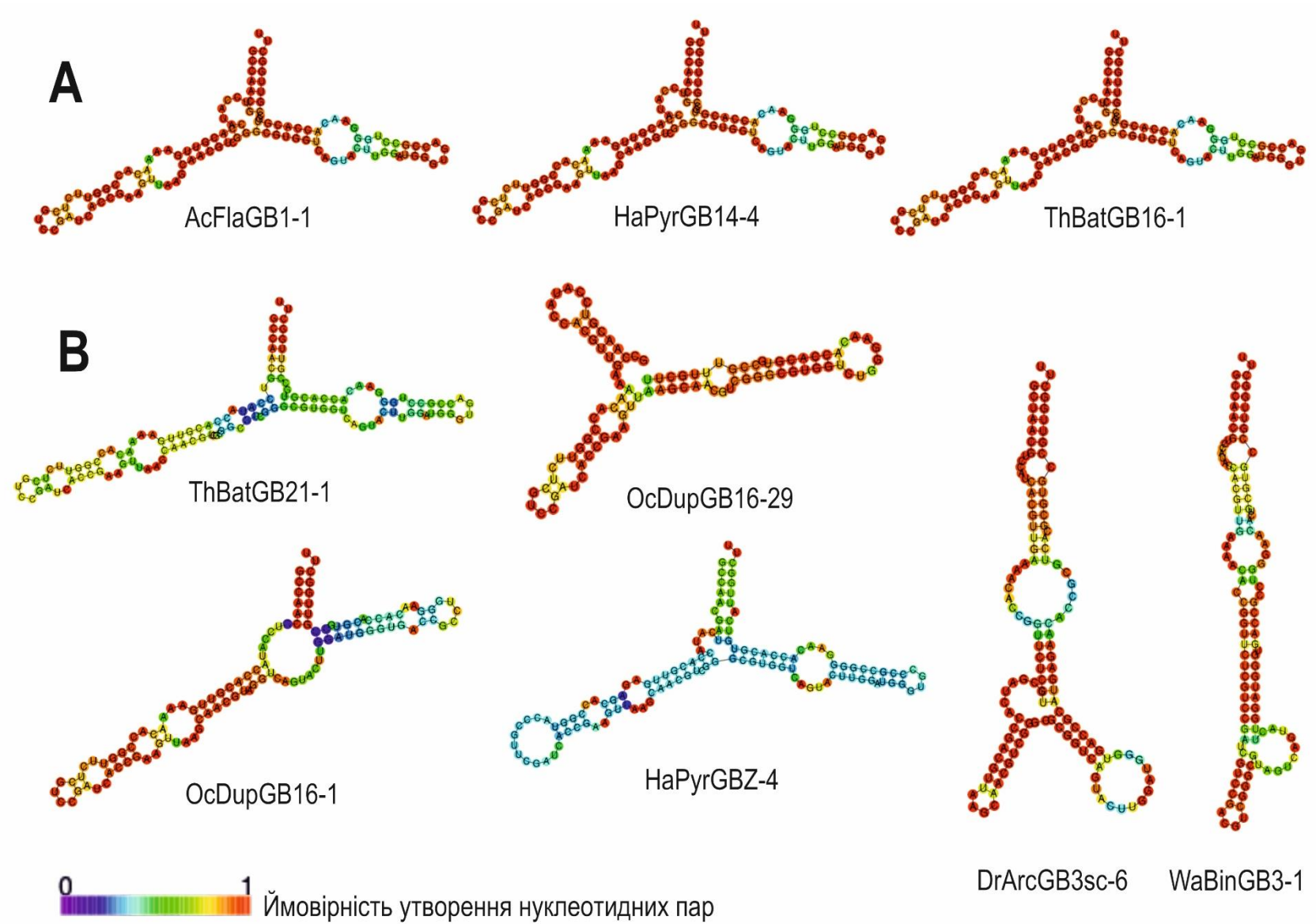


Рисунок 3.2.8. Прогнозовані вторинні структури для кодувальних ділянок 5S рДНК. А – канонічні структури; В – структури, побудовані для послідовностей, що частково відрізняються від консенсусної

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.2.

У досліджених представників ряду Лускокрилих аналіз послідовності гена CO1 дозволяє встановлювати видову приналежність та з'ясувати їх філогенетичне положення. В окремих випадках використання цього молекулярного маркеру дозволяє виявляти генетичну різницю між популяціями в межах одного виду.

Аналіз 5S рДНК виявив суттєвий внутрішньогеномний поліморфізм цієї ділянки у метеликів. Для досліджуваних видів ідентифіковано різні риботипи, які умовно було поділено на довгі та короткі. В геномах метеликів родини Drepanidae кластери 5S рДНК знаходяться на кількох хромосомах та містять як архаїчні предкові, так і похідні від них еволюційно молоді риботипи. Аналіз CDS показав, що в геномі метеликів присутні не тільки функціональні повтори 5S рДНК, але й ймовірні псевдогени.

У досліджених видів Лускокрилих поліморфізм за послідовністю CO1 мтДНК є суттєво нижчим порівняно з генами 5S рРНК, що свідчить про різний темп еволюції цих ділянок.

Частина описаних результатів висвітлені у двох статтях: Рошка та ін, 2020; Рошка, 2023.

3.3. Молекулярна організація та поліморфізм генів *CO1-CO2* мтДНК та 5S рДНК деяких представників родини Tephritidae (Diptera)

Плодові двокрилі мушки з родини Tephritidae (або Осетницеві) є економічно важливими складниками еко- та агросистем. В той час як деякі види є небезпечними шкідниками олійних, плодових та овочевих культур, інші, навпаки, є корисними (Yee et al., 2014; Badii et al., 2015; Vargas et al., 2015; Wakie et al., 2019; Biancheri et al., 2022). Також особливу загрозу мушки-тефритіди становлять у зв'язку з високим рівнем інвазивності, що може призводити до зникнення конкуруючих видів (Duysck et al., 2004; Clarke & Measham, 2022). З іншого боку, деяких представників родини Tephritidae використовують в якості «біологічних агентів» в боротьбі з бур'янами, оскільки вони володіють високою кормовою специфічністю до певного виду рослин і тому вважаються класичними агентами «біологічної боротьби» зі шкідливими рослинами (Turner, 2020).

Практична важливість та недостатня вивченість спонукали нас обрати мушок-тефритід для дослідження. Завданням цього розділу дисертації було охарактеризувати мітохондріальні гени *CO1* та *CO2* та ядерну 5S рДНК у представників родини Tephritidae, порівняти їх між собою та зробити висновки щодо можливого їх використання як маркерів в оцінці генетичного різноманіття мушок-тефритід.

3.3.1. Поліморфізм генів *CO* мтДНК у представників родини Tephritidae

Першим кроком нашого дослідження видів родини Tephritidae було проаналізувати послідовності генів *CO1*, *CO2* та міжгенного спейсера, який їх розмежовує (*CO1-2*). Для цього проводили ампліфікацію обраних ділянок для 14 видів підродина Tephritinae, серед яких вісім репрезентують трибу Terellini, чотири – Muoritini, та один – трибу Tephritini. Повні назви аналізованих видів та їх походження наведені у таблиці 2.1.

Електрофоретичний аналіз отриманих продуктів ампліфікації ділянок *CO1* та *CO1-2* показав присутність у гелі фрагментів розмірами 600-700 нп, що в основному відповідало очікуваним довжинам, оскільки схожі розміри ділянки *CO1* вже були описані у попередньому розділі для Лускокрилих. Очищені ПЛР-продукти сиквенували, а отримані первинні нуклеотидні послідовності піддавали біоінформатичному аналізу. Крім того, було проведено скринінг окремих послідовностей мтДНК та анотованих геномів, наявних у базі даних GenBank та виявлено гомологічні ділянки для 19 близькоспоріднених видів родини Tephritidae, назви яких наведено у таблиці 2.1.

Наступним кроком був аналіз нуклеотидних послідовностей гену *CO1* мушок-тефритід з нашої колекції та близькоспоріднених представників, наявних в GenBank. Порівняльний аналіз показав присутність численних SNP та інделів, специфічних для представників різних триб (рис. 3.3.1).

Аналіз послідовностей в межах окремих родів показав, що відсотки подібності *CO1* для представників триби Terellini становлять 75,8-99,7%. Для послідовностей *CO1* представників триби Muoritini цей показник коливається в межах 88,3-98,8%. Порівняння послідовностей *CO1* для видів із різних родів показало, що найменший відсоток подібності між представниками двох триб становить 70,3%, а найбільший – 88,9%. Водночас, порівняння послідовностей *CO1* представників різних підродин показало, що найбільший відсоток подібності між ними складає 86,4%, а найменший – 69,1%.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
Consensus Identity	AGGATCTCC	TCCCTCTGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCTGTTAATA	ATATAGTAAT	AGTCTCTGCT	
UrAffGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
UrCusGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
UrJacGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
UrSolGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Urmsp	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
UrSol	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Urter	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
UrQuaGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Urodz	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Teflo	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TeWinGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Tewit	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TeRufGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TeSerGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TeSerGB2	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TeLonGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Telon2	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Telon	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Teser	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TeNigGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TeFusGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TeTriGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TeQuaGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Tepse	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Chaet	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TePlaGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Tepla	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
TeColGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
Tevar	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
BaDorGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	
ZeCucGB	TGGATCTCC	TCCTCCAGCA	GGATCAAAAA	ATGATGTATT	TAAATTTTCGA	TCA GTTAATA	ATATAGTAAT	GGCTCTGCT	

Рисунок 3.3.1 (початок)

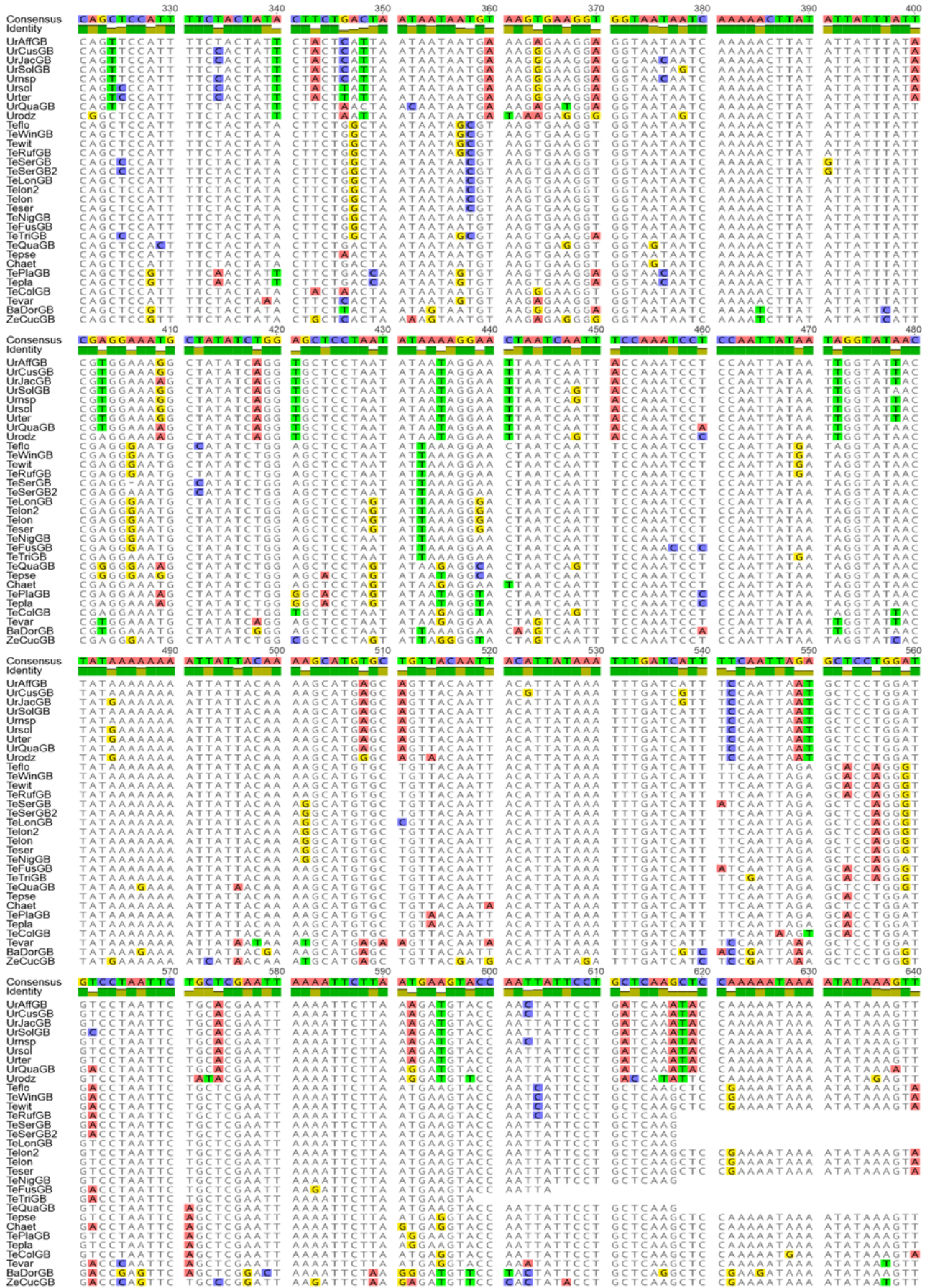


Рисунок 3.3.1 (закінчення). Вирівнювання ділянки гену *COI* для представників родини Tephritidae. Різними кольорами виділені одонуклеотидні поліморфізми

За результатами вирівнювання експериментально отриманих та ідентифікованих у GenBank послідовностей було побудовано ML-філодендрограму, яка відображає філогенетичні взаємозв'язки між видами в межах родини Tephritidae (рис. 3.3.2). Дві основні клади на дендрограмі репрезентують дві підродини – Dacinae та Tephritinae. В межах підродини Tephritinae аналізовані нами зразки з високою статистичною підтримкою групуються в три окремі клади відповідно до триб, які вони репрезентують – Terellini та Myopitini. Окрему гілку формує вид *Tephritis variata* який представляє трибу Tephritini.

Звертає на себе увагу, що послідовність *CO1 Terellia serratulae*, яка була експериментально отримана нами для зразка із Чернівецької області (TeSer-co1 – див. рис. 3.3.2), відрізняється від двох послідовностей (TeSerGB та TeSerGB2), ідентифікованих для цього виду у GenBank і є більше подібною до послідовності *Terellia longicauda* (TeLon-co1). Водночас послідовність TeSer-co1 ідентична із послідовністю *CO1* зразка *Terellia sp. n.* (Tespn), який все ще не визначений остаточно. З огляду на отримані результати можна припустити, що невизначений зразок Tespn та зразок TeSer-co1 із Чернівецької області можуть належати до виду *Terellia longicauda*.

В цілому філодендрограма отримана шляхом порівняння нуклеотидних послідовностей *CO1* відповідає сучасним таксономічним уявленням (Han & McPheron, 1997; Han et al., 2006), а отже це свідчить про можливість використання цієї ділянки для розмежування видів в межах окремих підродин мушок-тефритід.

Окрім аналізу за ділянкою *CO1* нами також було проведене порівняння спейсера між генами *CO1* та *CO2* (*CO1-CO2*), який, як відомо, також являє собою маркерний локус в оцінці генетичного різноманіття комах, зокрема медоносних бджіл (Alburaki et al., 2013; Cherevatov et al., 2019; Madella et al., 2020). Цей спейсер представлений АТ-багатою ділянкою, в межах якої знаходиться ген транспортної РНК.

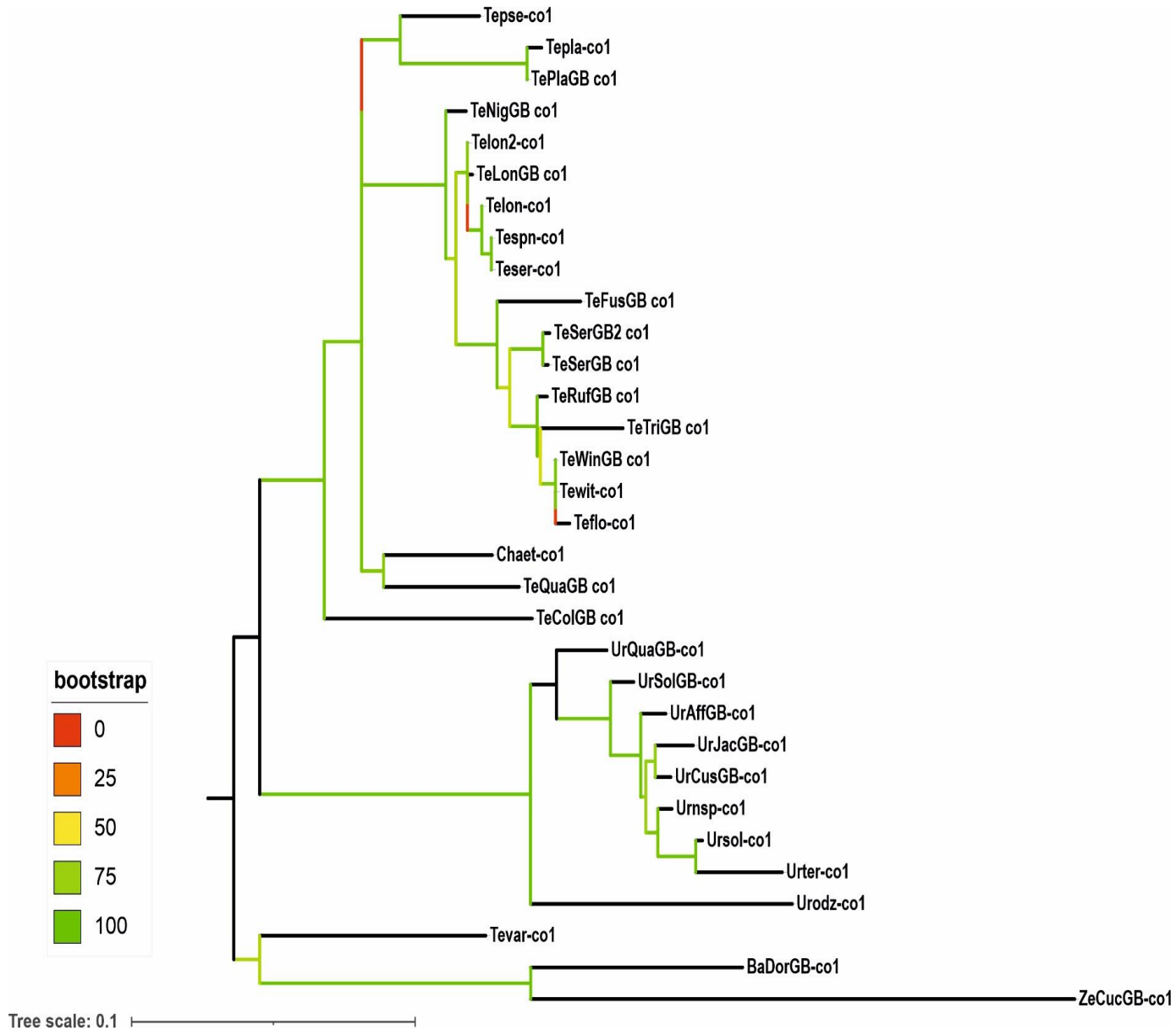


Рисунок 3.3.2.. ML-філодендрограма побудована на основі вирівнювання послідовностей *COI* представників родини Terphritidae.

Для нуклеотидних послідовностей *COI-CO2* представників родини Terphritidae було побудоване загальне вирівнювання. Виявилось, що за рахунок присутності в межах сиквенованої ділянки фрагменту 5'-області гену *CO2* рівень варіабельності всієї послідовностей *COI-CO2* дещо нижчий порівняно з *COI* (рис. 3.3.3).

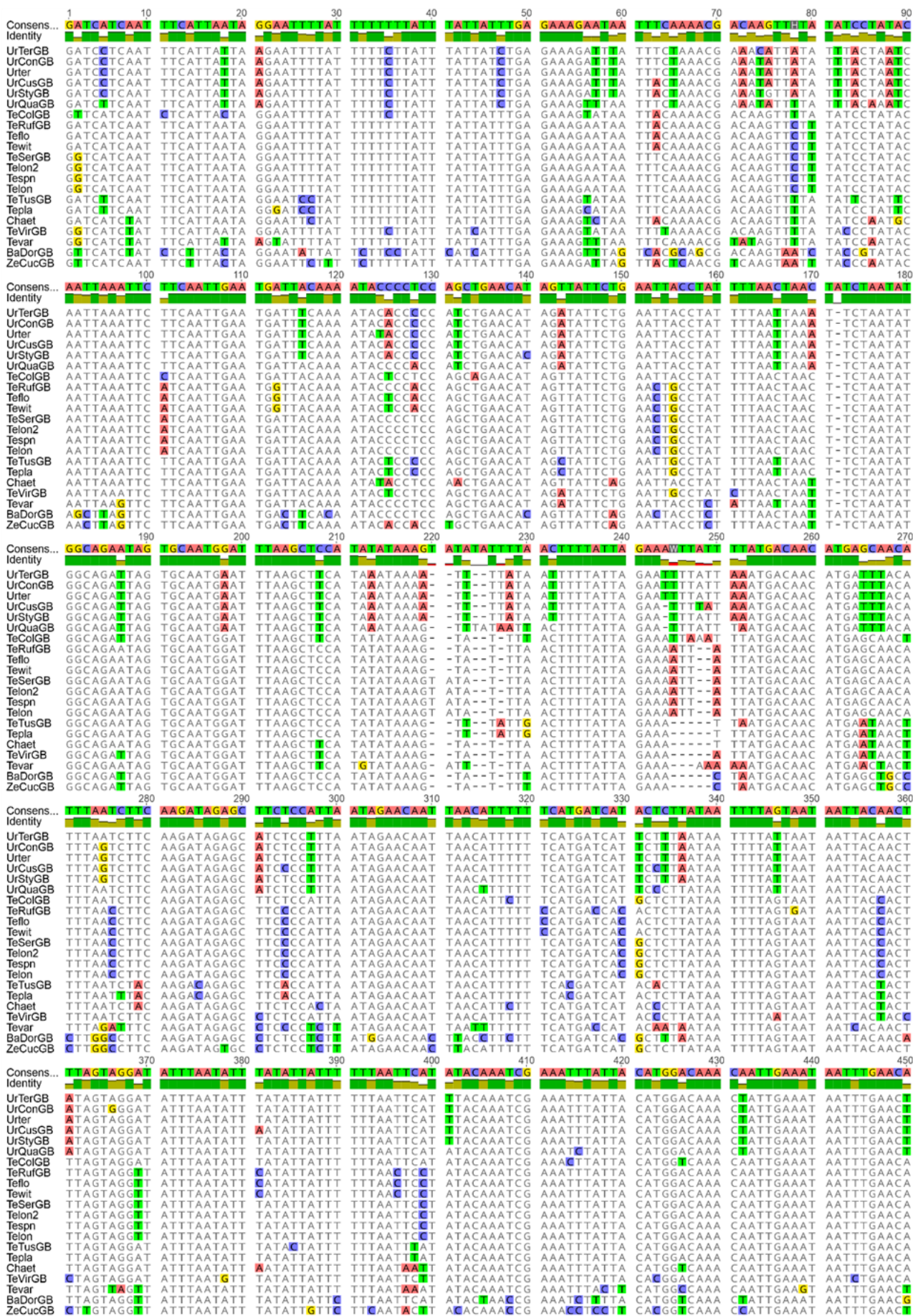


Рисунок 3.3.3 (початок)

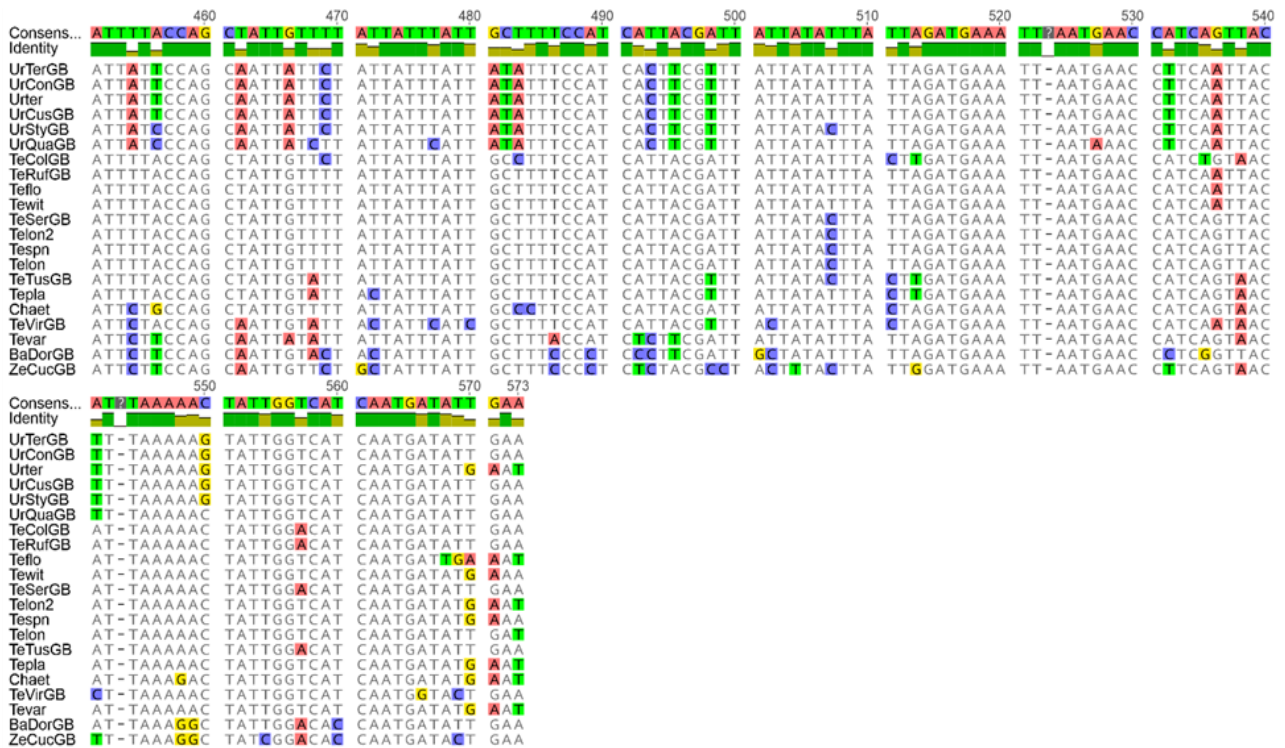


Рисунок 3.3.3 (закінчення). Вирівнювання послідовностей *COI-CO2* для представників родини Terphritidae.

На основі вирівнювання послідовностей *COI-CO2* була отримана ML-дендрограма (рис. 3.3.4), яке містить дві основні клади, куди увійшли представники двох підродин – Dacinae та Terphritinae. В межах підродини Terphritinae послідовності групуються відповідно до триб – Terellini та Muoritini. Проте, звертає на себе увагу відсутність чіткої межі між двома трибами. Зокрема, *T. variata*, що представляє трибу Terphritini, за послідовністю *COI-CO2* групується з представниками триб Terellini та Muoritini.

В межах триби Terellini відсотки подібності послідовностей *COI-CO2* склали 90,1-99,8%, а в межах триби Muoritini – 94,2-99,5%. Рівень подібності при порівнянні послідовностей між двома трибами становить 84,1-86,9%. Водночас, порівняння ділянки *COI-CO2* для представників підродин Dacinae та Terphritinae показало, що відсотки їх подібності знаходяться в межах 78,9-83,9%.

Повністю ідентичними виявились послідовності Teser/Telon2, а також Urter/Ursol. Водночас, два зразка одного виду – Telon та Telon2 – демонструють подібність 99,6%. Отримані результати свідчать, що з використанням ділянки

CO1-CO2, на відміну від гена *CO1*, розрізнити види *Terellia longicauda* та *Terellia serratulae* не вдається. Таким чином, складається враження, що для родини Tephritidae роздільна здатність ділянки *CO1-CO2* мтДНК дещо менша, ніж послідовності гена *CO1*. Для порівняння нагадаємо, що раніше співробітниками нашої кафедри було охарактеризовано ділянку *CO1-CO2* для медоносних бджіл і продемонстровано, що вона може бути використана для ідентифікації підвидів/порід *A. mellifera* (Cherevatov et al., 2019).

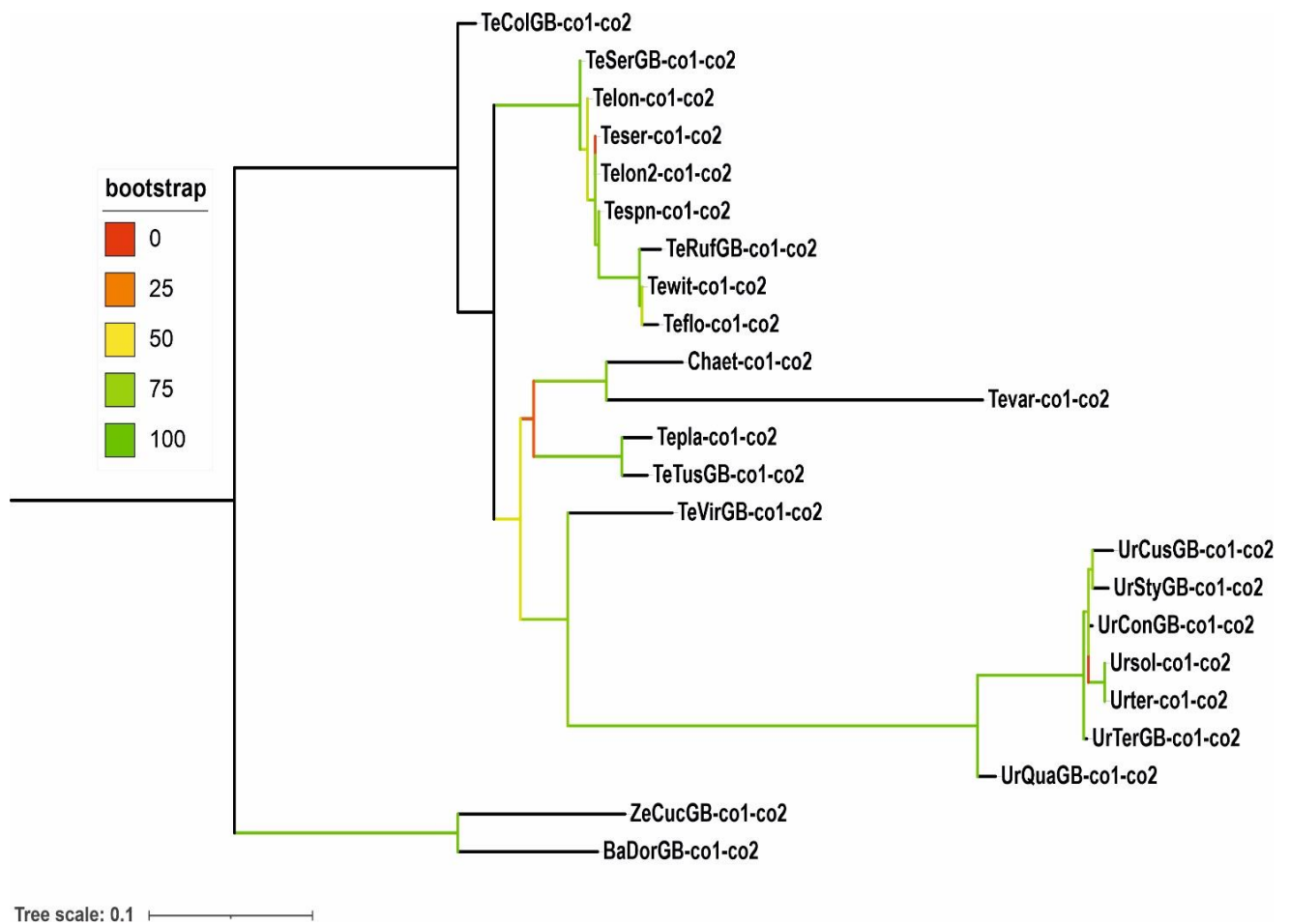


Рисунок 3.3.4. ML-філодендрограма побудована на основі вирівнювання послідовностей *CO1-CO2* представників родини Tephritidae.

Окрім того, щоб оцінити масштаб мінливості гена *CO2* і можливість використання цієї ділянки у філогенетиці віддалених таксонів комах, нами було проведене порівняння аналізованих нами раніше фрагментів *CO1-CO2* для медоносних бджіл і аналогічних послідовностей мітогену мушок-тефритід, зокрема 5'-кінця гена *CO2*. Вирівнювання показало практичну відсутність

подібності в межах міжгенної спейсерної ділянки та певну подібність білок-кодуючого фрагменту гену *CO2* для мушок-тефритід та медоносних бджіл (рис. 3.3.5): мінімальний відсоток спорідненості між послідовностями 5`-кінця гену *CO2* аналізованих представників різних рядів комах, Diptera та Hymenoptera, склав 60,5%, а максимальний – 67,5 %. Отже, міжгенний спейсер еволюціонує набагато швидше, ніж кодуюча ділянка гена *CO2*. Відповідно, порівняння кодуючої послідовності гена *CO2* може бути рекомендоване для реконструкції філогенетичних зв'язків між віддаленими таксонами комах.

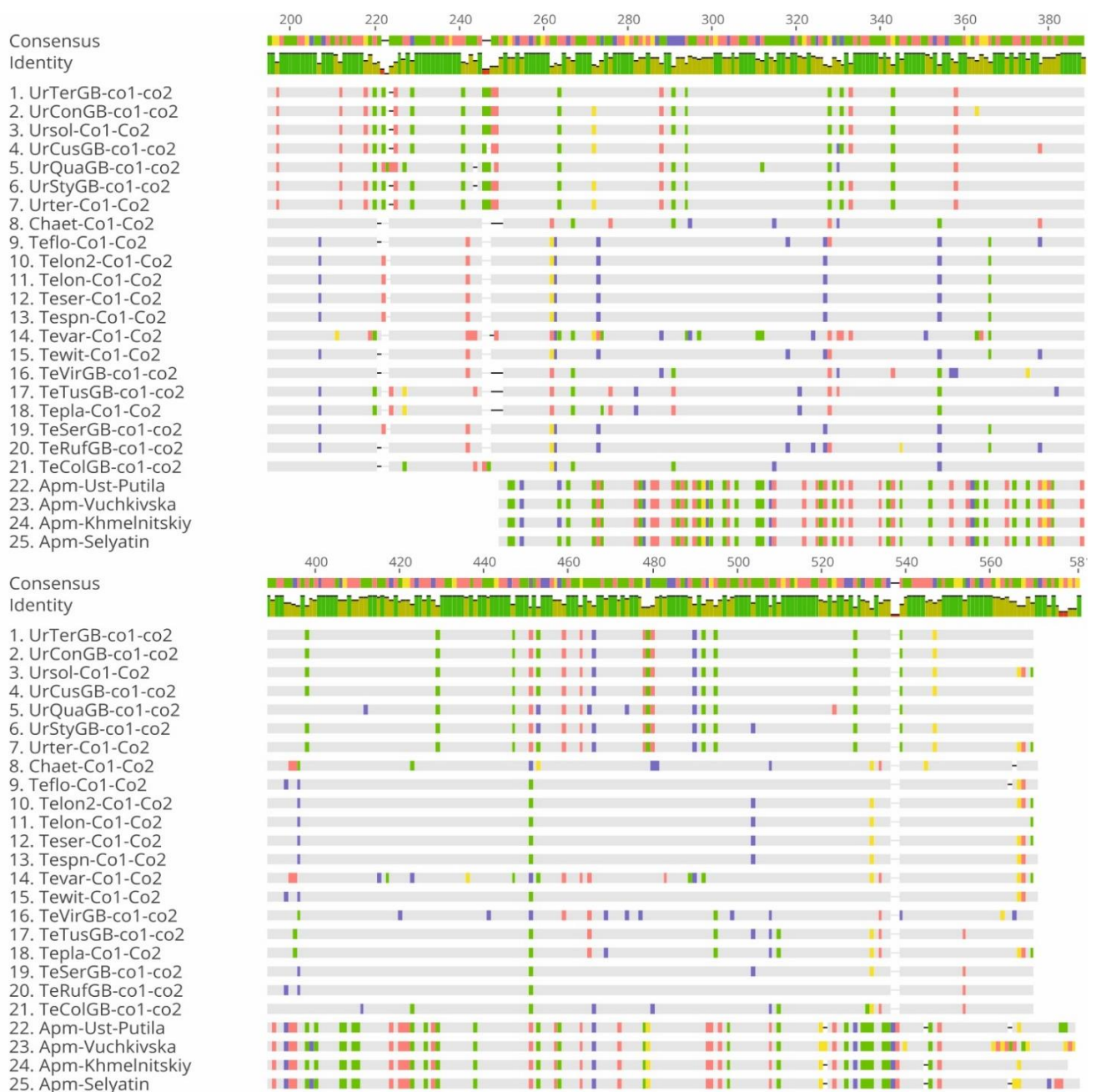


Рисунок 3.3.5. Вирівнювання 5`-кінця гену *CO2* для *Apis mellifera* та мушок-тефритід. Легенда: А – червоний колір, Т – зелений, G – жовтий, С – синій.

3.3.2. Клонування IGS, скринінг геномів у GenBank та хромосомна локалізація 5S рДНК у представників родини Tephritidae

В подальших експериментах було досліджено молекулярну організацію 5S рДНК у мушок-тефритід. Для одного зразка *Chaestomella sp.*, восьми видів роду *Terellia* та чотирьох видів роду *Urophora* (підродина Tephritinae) було проведено клонування IGS 5S рДНК. На загал сиквеновано 35 клонів (табл. 3.3.1). Крім того, скринінг бази даних GenBank виявив 3 геноми представників підродин Dacinae (*Bactrocera dorsalis*, *Zeugodacus cucurbitae*) та Trypetinae (*Anastrepha obliqua*), аналіз яких дозволив ідентифікувати 73 риботиби. Порівняння всіх отриманих послідовностей IGS показало, що у геномах видів підродини Dacinae довжина IGS знаходиться в межах 342-508 нп, підродини Trypetinae - 656-762 нп, а підродини Tephritinae – 220-292 нп, а вміст - GC-пар – 29,4-32,0, 25,6-27,3 та 28,4-30,0 %, відповідно.

Аналіз наявних у GenBank геномів показав, що у *Bactrocera dorsalis*, *Zeugodacus cucurbitae* кластер 5S рДНК знаходиться на хромосомі 1, у *Zeugodacus cucurbitae* – на хромосомі 3, тоді як у *Anastrepha obliqua* наявні два кластери, які розташовані на хромосомах 2 та 5 (табл. 3.3.1).

Таблиця 3.3.1.

Характеристика риботипів IGS 5S рДНК представників родини Tephritidae

Вид	Походження	Назва риботипу	Хромосомна локалізація	IGS	
				Довжина, нп	Вміст GC-пар, %
Підродина Dacinae					
<i>Zeugodacus cucurbitae</i>	GCA_0285547 25.2	ZeCucGB3-1 ¹	3	498	31,1
		ZeCucGB3-2	3	472	31,6
		ZeCucGB3-3	3	474	31,2
		ZeCucGB3-4	3	496	31,6
		ZeCucGB3-5	3	496	31,4
		ZeCucGB3-6	3	497	31,6
		ZeCucGB3-7 ¹	3	498	31,1
		ZeCucGB3-8 ⁴	3	498	31,3
		ZeCucGB3-9 ³	3	498	31,7
		ZeCucGB3-10 ³	3	498	31,7
		ZeCucGB3-11 ⁴	3	498	31,3

		ZeCucGB3-12	3	472	31,1
		ZeCucGB3-13	3	500	31
		ZeCucGB3-14	3	496	31,2
		ZeCucGB3-15	3	498	31,5
		ZeCucGB3-16	3	474	31,2
		ZeCucGB3-17	3	473	31,1
		ZeCucGB3-18	3	498	31,7
		ZeCucGB3-19 ¹	3	498	31,1
		ZeCucGB3-20	3	473	31,1
		ZeCucGB3-21	3	501	31,1
		ZeCucGB3-22	3	501	30,7
		ZeCucGB3-23 ²	3	503	31
		ZeCucGB3-24	3	508	30,9
		ZeCucGB3-25 ²	3	503	31
		ZeCucGB3-26	3	499	31,5
		ZeCucGB3-27	3	501	31,3
		ZeCucGB3-28	3	497	32
		ZeCucGB3-29	3	507	31
		ZeCucGB3-30	3	502	31,3
<i>Bactrocera dorsalis</i>	GCA_0233738 25.1	BaDorGB1-1	1	365	29,9
		BaDorGB1-2	1	353	30,3
		BaDorGB1-3	1	358	31,3
		BaDorGB1-4	1	357	30,5
		BaDorGB1-5	1	353	30,6
		BaDorGB1-6	1	348	31
		BaDorGB1-7	1	352	30,7
		BaDorGB1-8	1	351	30,8
		BaDorGB1-9	1	351	31
		BaDorGB1-10	1	353	30,6
		BaDorGB1-11	1	355	31
		BaDorGB1-12	1	350	31,7
		BaDorGB1-13	1	353	30,3
		BaDorGB1-14	1	360	30,6
		BaDorGB1-15	1	354	31,1
		BaDorGB1-16	1	348	31,3
		BaDorGB1-17 ⁵	1	344	31,1
		BaDorGB1-18	1	348	31
		BaDorGB1-19	1	365	29,9
		BaDorGB1-20	1	356	30,6
		BaDorGB1-21	1	345	31
		BaDorGB1-22	1	366	30,6
		BaDorGB1-23	1	354	30,5
		BaDorGB1-24	1	345	30,7
		BaDorGB1-25	1	343	31,2
		BaDorGB1-26	1	348	31,3
		BaDorGB1-27	1	342	31,3
		BaDorGB1-28 ⁵	1	344	31,1
		BaDorGB1-29	1	348	31
		BaDorGB1-30	1	363	29,7

		BaDorGB1-31	1	364	29,9
		BaDorGB1-32	1	357	29,4
Підродина Thepitrinae					
<i>Chaestomel la sp.</i>	-	Chaet1.1 ⁷	--	292	29,4
		Chaet1.2 ⁸	--	225	28,9
		Chaet1.3 ⁷	--	292	29,4
<i>Terellia florescentia</i>	Чернівецька обл.	Teflo1.4 ⁷	--	292	29,4
		Teflo1.5 ⁸	--	225	28,9
<i>Terellia longicauda</i>	Київська обл.	Telon1.1 ⁹	--	225	29,3
		Telon1.3 ⁸	--	225	28,9
		Telon1.4 ⁹	--	225	29,3
<i>Terellia plagiata</i>	Чернівецька обл.	Tepla1.1 ¹⁰	--	223	29,1
		Tepla1.5 ¹⁰	--	223	29,1
		Tepla1.6 ¹⁰	--	223	29,1
<i>Terellia pseudovirens</i>	-	Tepse1.1	--	225	29,3
		Tepse1.2 ¹⁰	--	223	29,1
		Tepse1.3	--	225	28,9
		Tepse1.5 ⁸	--	225	28,9
<i>Terellia serratulae</i>	Чернівецька обл.	Teser1.2	--	291	29,5
		Teser1.3 ¹⁰	--	223	29,1
<i>Terellia sp. n.</i>	Херсон	Tespn1.1	--	227	28,6
		Tespn1.3 ⁸	--	225	28,9
<i>Tephritis variata</i>	-	Tevar1.1 ¹⁰	--	223	29,1
<i>Terellia winthemi</i>	Чернівецька обл.	Tewit1.1	--	224	29
		Tewit1.2	--	228	28,5
		Tewit1.3 ⁸	--	225	28,9
<i>Urophora sp. n.</i>	Туреччина	Urnspl.1 ¹⁰	--	223	29,1
		Urnspl.2	--	223	30
		Urnspl.3	--	220	30
<i>Urophora dzieduszycki i</i>	--	Urodz1.2	--	235	28,5
		Urodz1.4 ¹²	--	292	29,4
		Urodz1.5	--	225	28,4
<i>Urophora n. soltifialis</i>	Херсон	Ursol1.1 ¹¹	--	225	28,9
		Ursol1.2 ¹¹	--	225	28,9
		Ursol1.3 ¹¹	--	225	28,9
<i>Urophora n. terebrans</i>	Херсон	Urter1.1 ¹²	--	292	29,4
		Urter1.2	--	223	29,6
		Urter1.3 ¹⁰	--	223	29,1
Підродина Trypetinae					
<i>Anastrepha obliqua</i>	GCF_0279432 55.1	AnOblGB2-1	2	762	27,2
		AnOblGB2-2	2	724	26,5
		AnOblGB2-3	2	716	26,4
		AnOblGB2-4	2	754	27,3
		AnOblGB2-5	2	759	26,6
		AnOblGB2-6	2	728	26,2
		AnOblGB2-7	2	728	26,2
		AnOblGB5-1	5	656	26,2
		AnOblGB5-2	5	656	26,2
		AnOblGB5-3	5	658	26,1
		AnOblGB5-4	5	657	25,6

3.3.2.1. Молекулярна організація IGS у представників родини Tephritidae

Наступним етапом аналізу IGS 5S рДНК була побудова загальної ML-філодендрограми, яка відображає поліморфізм цієї ділянки у мушок-тефритід (рис. 3.3.6). На отриманому дереві присутні 5 основних клад, дві з яких, № 1 та 2, містять по дві підклади кожна. Клади № 2, 3 та 4 об'єднують послідовності трьох видів, *Anastrepha obliqua*, *Zeugodacus cucurbitae* та *Bactrocera dorsalis*, відповідно. При цьому, риботипи локалізовані на хромосомах 2 і 5 у *Anastrepha obliqua*, групуються окремо і формують підклади, 2a та 2b. Рівень подібності послідовностей, які належать до однієї клад/підклади перевищує 90%. Водночас, відсоток подібності між риботипами *Anastrepha obliqua*, які локалізовані на різних хромосомах, знаходиться в межах 62,2-64,8%.

Більш складною виявилась картина розташування на дендрограмі риботипів IGS представників підродина Tephritinae, які були отримані нами шляхом клонування. Виявилось, що ці послідовності розподіляються між кладами 1a, 1b та 5, при чому кожна клада містить риботипи представників різних родів. Така картина свідчить, що риботипи IGS, які присутні у геномах представників родів *Chaestomella*, *Terellia* та *Urophora*, належать до кількох сильно дивергованих структурних класів, між якими не відбувається гомогенізація.

Порівняння будови IGS у мушок-тефритід показує (рис. 3.3.7), що суттєва різниця між риботипами різних структурних класів пов'язана із наявністю чисельних інделів та SNP.

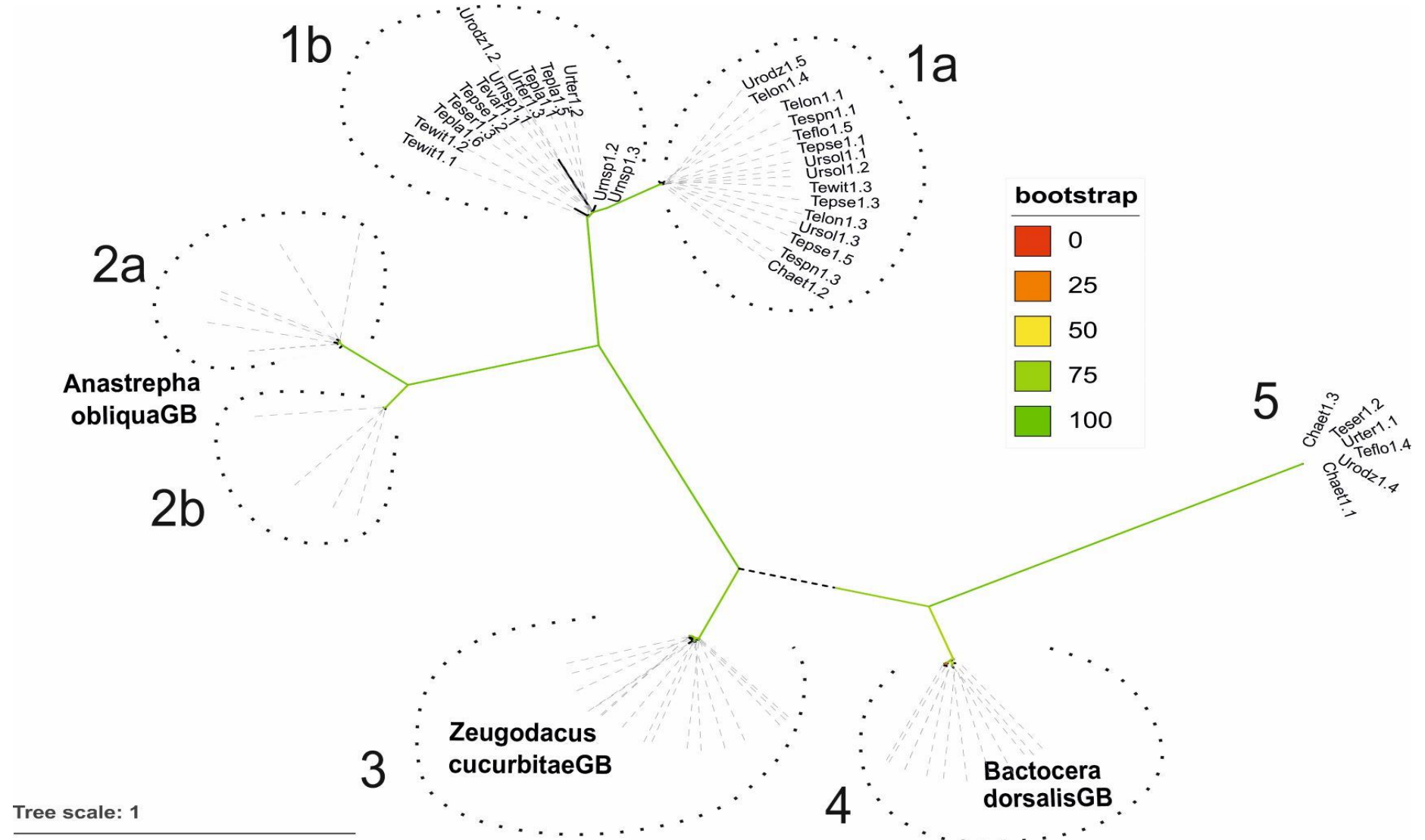


Рисунок 3.3.6. Невкорінена ML-філодендрограма, побудована на основі вирівнювання IGS 5S рДНК представників родини Tephritidae.



Рисунок 3.3.7. Вирівнювання послідовностей клонованих нами IGS 5S рДНК для представників двох родів *Terellia* та *Urophora*. Легенда: А – червоний колір, Т – зелений, G – жовтий, С – синій

Для IGS представників родини Tephritidae було проведено пошук можливих зовнішніх елементів промотору РНК-полімерази III. Було встановлено, що безпосередньо перед CDS у положенні від -20 до -13 нп у всіх досліджених видів знаходиться АТ-багатий мотив ТАААТТТТ або ААААТТТТ (рис. 3.3.8).

Крім того, у IGS досліджуваних видів було встановлено наявність потенційного термінатора транскрипції – oligo-T подібного елемента, розташованого після кодувальної ділянки (рис.3.3.8). Звертає на себе увагу присутність у всіх послідовностях СА-багатого мотиву, що межує з oligo-T. У представників родів *Anastrepha* (підродина Trypetinae), *Bactrocera* та *Zeugodacus* (підродина Dacinae) СА-багатий мотив розташований перед oligo-T мотивом, а родів *Chaestomella*, *Terellia* та *Urophora* (підродина Tephritinae) – після цього мотиву. Цей результат можна розглядати як свідчення філогенетичної спорідненості підродин Dacinae та Trypetinae.

Majority	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Majority	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
	10 20		280 290
AnOblGB-3igs	CCAACAATTTTTTTT- CTTCATTTC	Tepla1.1	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
AnOblGB-4igs	CCAACCATTTTTTTT- CTTCATTTC	Tepla1.5	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
AnOblGB-1igs	CCAACAATTTTTTTT- CTTCATTTC	Tepla1.6	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
AnOblGB-5igs	CCAACAATTTTTTTTCTTCATTTC	Tepse1.2	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
AnOblGB-6igs	CCAACAATTTTTTTT- CTTCATTTC	Teser1.3	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
AnOblGB-7igs	CCAACAATTTTTTTT- CTTCATTTC	Tewit1.2	TATAATTTTGTCTCAGCATTTC
BaDorGB-1igs	CCAACAACCTTTTTTGTTTT- - - - -	Urns1.1	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
BaDorGB-4igs	CCAACAACCTTTTTTGTTTT- - - - -	Urns1.2	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
BaDorGB-2igs	CCAACAACCTTTTTTGTTTT- - - - -	Tevar1.1	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
ZeCucGB-1igs	CCAACAACCTTTTTTACCTTTTTGT	Urns1.3	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
ZeCucGB-2igs	CCAACAACCTTTTTTACCTTTTTGT	Urter1.3	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
ZeCucGB-3igs	CCAACAACCTTTTTTACCTTTTTGT	Urter1.2	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
Chaet1.2	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Teflo1.5	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Teflo1.5	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Chaet1.2	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Telon1.1	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Telon1.1	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Telon1.3	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Telon1.3	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Telon1.4	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Telon1.4	TA- AATTTTGTCTCAGCATTTC
Tepla1.1	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Tepse1.1	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Tepla1.5	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Tepse1.3	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Tepla1.6	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Tepse1.5	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Tepse1.1	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Tespn1.1	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Tepse1.2	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Tespn1.3	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Tepse1.3	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Tewit1.3	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Tepse1.5	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Urodz1.5	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Teser1.3	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Ursol1.1	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Tespn1.1	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Ursol1.2	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Tespn1.3	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Ursol1.3	TA- AATTTTGACTTAGCATTTC
Tevar1.1	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Teser1.2	GAAAATTTTGTGACTGCTATC
Tewit1.2	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Urter1.1	GAAAATTTTGTGACTGCTATC
Tewit1.3	TTTGTTAACCAACGT- - - - -	Urodz1.4	GAAAATTTTGTGACTGCTATC
Urns1.1	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Chaet1.1	GAAAATTTTGTGACTGCTATC
Urns1.2	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Chaet1.3	GAAAATTTTGTGACTGCTATC
Urns1.3	TTTGTTAACCAATGT- - - - -	Teflo1.4	GAAAATTTTGTGACTGCTATC
Urodz1.5	TTTGTTAACCAATGT- - - - -		
Ursol1.1	TTTGTTAACCAACGT- - - - -		
Ursol1.2	TTTGTTAACCAACGT- - - - -		
Ursol1.3	TTTGTTAACCAACGT- - - - -		
Urter1.2	TTTGTTAACCAATGT- - - - -		
Urter1.3	TTTGTTAACCAATGT- - - - -		

Рисунок 3.3.8. Вирівнювання потенційних зовнішніх елементів промотору РНК-полімерази III представників родини Tephritidae. Зліва представлений oligo-T мотив, з правого боку – ТАТА-подібна послідовність.

3.3.2.2. Організація та поліморфізм кодувальної ділянки 5S рДНК у родині Tephritidae

Для пошуку гомологічних до CDS 5S рДНК послідовностей в зібраних та анотованих геномах представників родині Tephritidae використовували послідовності CDS описані в літературі та фрагменти кодувальних ділянок, отримані нами шляхом клонування. Довжини ідентифікованих послідовностей варіюють в межах 118-128 нп (рис. 3.3.9).

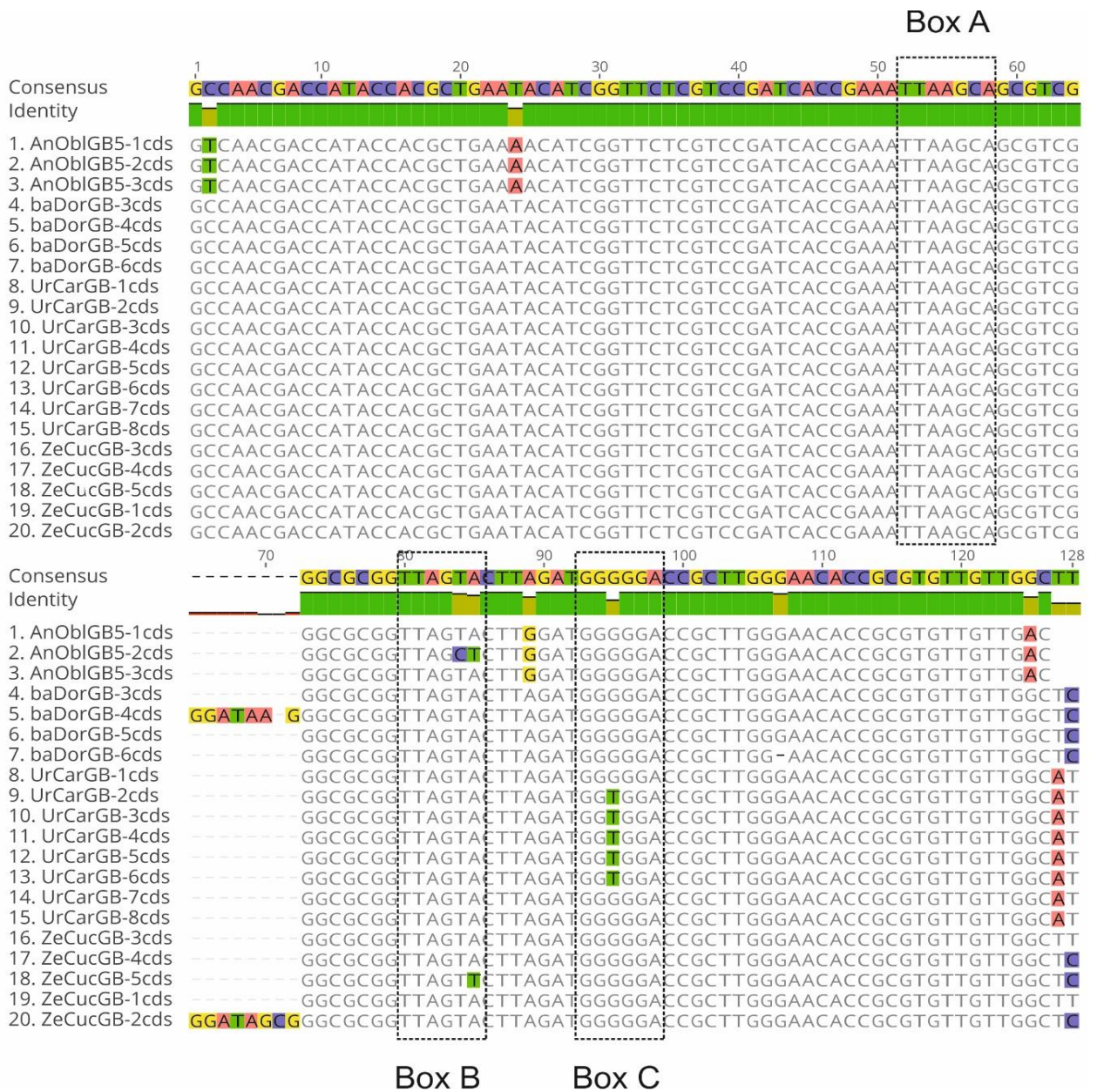


Рисунок 3.3.9. Вирівнювання кодувальних ділянок 5S рДНК представників родині Tephritidae. Потенційні внутрішні елементи промотору РНК-полімерази III виділені пунктирними рамками.

Аналіз вирівнювання отриманих послідовностей показав низький рівень варіабельності CDS, що видається очікуваним з огляду на їх функціональну важливість, яка була описана в попередніх розділах (див. розділ 3.1-3.2). Присутні SNP здебільшого мають видоспецифічний характер. Так, CDS AnObl відрізняються від консенсусної послідовності для родини Tephritidae трьома транзиціями та однією трансверсією. Одна транзиція T→A на 3'-кінці є специфічною для всіх CDS UrCar, тоді як транзиція G→T в межах боксу C характерна лише для частини CDS цього виду. Транзиція C→T в останній позиції CDS зближує між собою види *B. dorsalis* та *Z. cucurbitae*, які відносяться до родини Dacinae. Цікаво, що в окремих послідовностях з геномів цих двох видів присутня також майже ідентична восьминуклеотидна інсерція, що є ще одною вказівкою на філогенетичну близькість цих видів.

Для того, щоб оцінити вплив виявлених мутацій на функціональність CDS, нами були розраховані прогнозовані вторинні структури для гіпотетичних транскриптів 5S рРНК (рис. 3.3.10). Для побудов вторинних структур були відібрані послідовності, які співпадають з консенсусними для відповідного виду або ті, що містять заміни/індели. Оскільки консенсусні послідовності для видів *B. dorsalis* та *Z. cucurbitae* ідентичні, ми представили лише структуру для *Z. cucurbitae*. Аналіз побудованих структур показує, що послідовності, які ідентичні із консенсусними (рис. 3.3.10 А), формують вторинні структури 5S рРНК, що відповідають канонічним для багатоклітинних тварин (Barciszewska et al., 2001). Чотири нуклеотидні заміни в CDS AnOblGB5-1 (рис. 3.3.10 В) не змінюють нуклеотидних взаємодій у відповідних елементах вторинної структури. Очевидно, що частина з цих замін є компенсаторними. Виявлені SNP та індели істотно не впливають на вторинну структуру. Зокрема, для послідовностей ZeCucGB-2cds, що містить восьминуклеотидну інсерцію, та BaDorGB-6cds із одонуклеотидною делецією, вторинні структури виявились подібними канонічним. В цілому ці результати свідчать, що у геномах представників родини Tephritidae не вдається знайти очевидних ознак псевдогенізації CDS 5S рДНК.

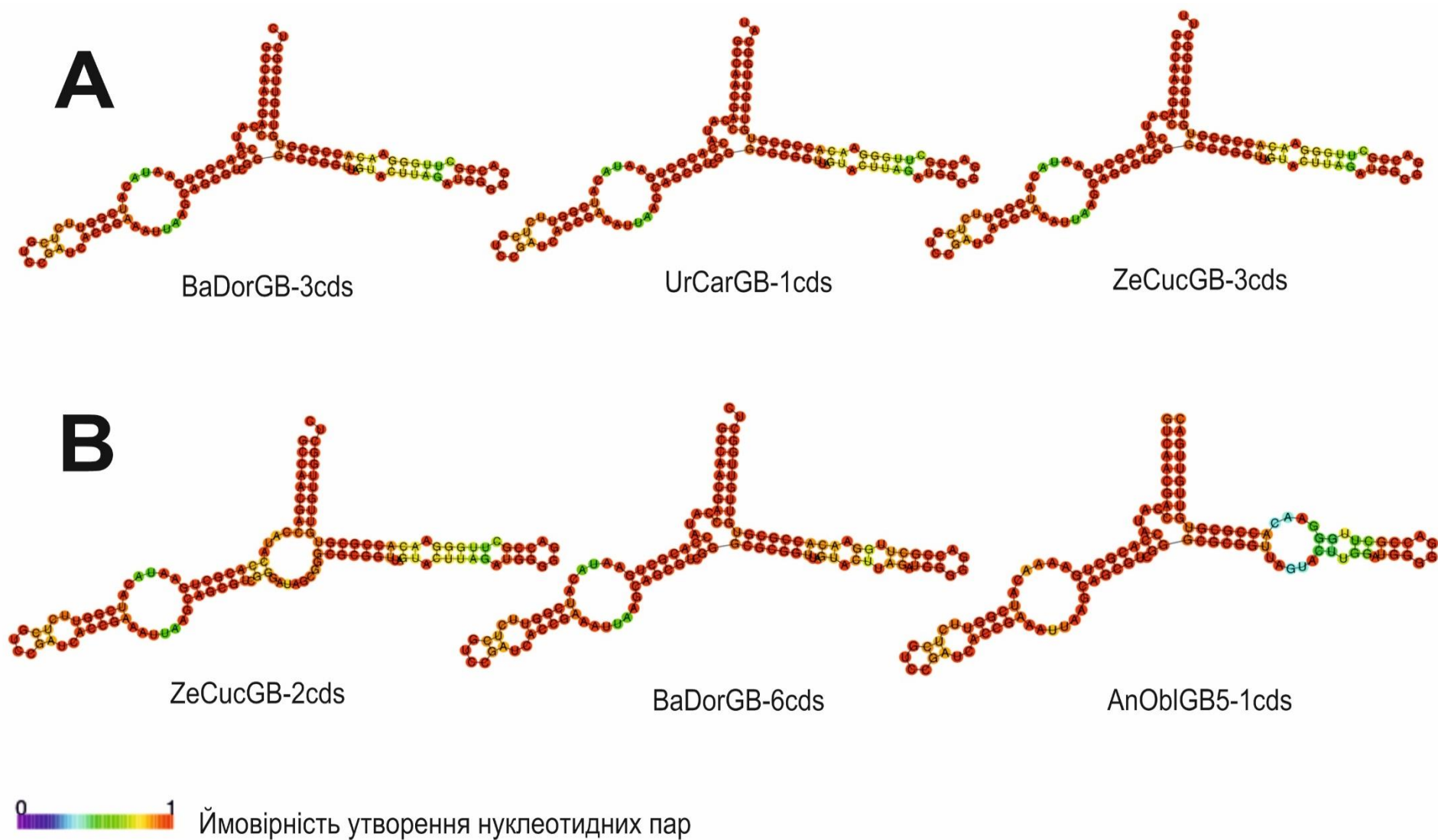


Рисунок 3.3.10. Прогнозовані вторинні структури кодувальних ділянок 5S рДНК представників родини Terphritidae. А – консенсусні послідовності, В – послідовності, які містять індели/заміни.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.3.

Проведений аналіз генів *CO1* та *CO1-CO2* показав, що ці ділянки можуть використовуватись для ідентифікації видів мушок-тефритід. При цьому роздільна здатність ділянки *CO1-CO2* мтДНК дещо менша, ніж послідовності гена *CO1*.

Дослідження молекулярної організації 5S рДНК свідчать, що рибо типи IGS, які присутні у геномах представників підродина *Thephritinae*, можуть бути представлені одним або кількома структурними класами. Риботипи, які належать до одного структурного класу, є високо подібними між собою, що можна пояснити високою активністю процесів гомогенізації. Інше кажучи, можна вважати, що вони еволюціонують згідно із моделлю концертної еволюції. На противагу цьому, риботипи різних структурних класів в межах одного геному суттєво відрізняються між собою, що вказує на їх незалежну еволюцію. Причиною відсутності гомогенізації між риботипами, які належать до різних структурних класів може бути їх розташування на різних хромосомах..

Частина результатів, використаних в цьому розділі згадана у статті Рошка & Череватов, 2020.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше досліджено організацію та поліморфізм генів *CO1-CO2* та 5S рДНК для різних підвидів медоносної бджоли *Apis mellifera*, метеликів-шкідників родини Drepanidae та плодових мушок родини Tephritidae. Вперше описано хромосому локалізацію кластерів 5S рДНК, виявлено новий тип диспергованої організації 5S рДНК у геномах метеликів.

Встановлено, що 5S рДНК може використовуватись як молекулярний маркер для ідентифікації таксонів низького рівня.

1. Порівняння характеру мінливості генів *CO1* та *CO2* свідчить, що для різних таксономічних груп філогенетична «роздільна здатність» цих локусів є різною. Зокрема, для медоносних бджіл послідовність *CO1-CO2* є більш інформативною, ніж для різних видів в межах родини плодових мушок Tephritidae.

2. В геномах видів роду *Apis* наявні два кластери 5S рДНК, які розташовані на різних хромосомах і містять IGS двох типів, які суттєво відрізняються між собою.

3. В геномах метеликів родини Drepanidae одночасно присутні як архаїчні предкові, так і похідні від них еволюційно молоді риботики IGS 5S рДНК, які демонструють високий рівень дивергенції. Виявлений характер мінливості 5S рДНК узгоджується із еволюційною моделлю «народження та смерті» (birth and death).

4. 5S рДНК у геномах представників підроду Tephritinae представлена одним або кількома структурними класами, які локалізуються на різних хромосомах. Риботики, які належать до одного структурного класу є високо подібними, що відповідає моделі концертної еволюції.

5. У різних групах комах 5S рДНК демонструє суттєві відмінності в молекулярній організації, характері та швидкості еволюції.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Григорчук, Д. І., Рабоконь, А. М., Постовойтова, А. С., Пірко, Н. М., Пірко, Я. В., & Блюм, Я. Б. (2020). Оцінка генетичного різноманіття бджіл в Україні за допомогою мікросателітних маркерів. *Фактори експериментальної еволюції організмів*, 26, 56-60.
2. Про бджільництво: Закон України No 184/82 від 20.09.2000. Офіційний вісник України від 10.11.2000 р., № 43, стор. 245, стаття 1872, код акта 16996/2000. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0736-00#Text>
3. Рошка, Н. М., Череватов, О. В., & Волков, Р. А. (2020) 5S рибосомна ДНК совковидки рожевої *Thyatira batis* L. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12(1), 20-25.
4. Рошка, Н. М., Волкова А. Р., & Панчук, І. І. (2021) Молекулярна організація 5S рибосомної ДНК *Apis mellifera ligustica*. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 19(1-2), 31-39.
5. Рошка, Н.М. (2023) Організація міжгенного спейсера 5S рибосомної ДНК *Aratea tonoglypha* (Lepidoptera). *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 15(1), 26-31.
6. Тимочко, Л. І., Череватов, О. В., & Череватов, В. Ф. (2023). Породний склад сімей медоносних бджіл (*Apis mellifera* L.) на пасіках північної Буковини. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 15(1), 70-78.
7. Федоряк, М. М., Тимочко, Л. І., Кульманов, О. М., Руденко, С. С., Делі, О. Ф., Подобівський, С. С., ... & Волков, Р. А. (2018). Втрати колоній медоносних бджіл (*Apis mellifera* L.) в Україні за результатами зимівлі 2016-2017 рр. в рамках міжнародного моніторингу. *Біологічні системи*, (10, Вип. 1), 37-46.
8. Череватов, О. В., Мельник, Є. О., & Волков, Р. А. (2020). Поліморфізм гена COI у медоносних бджіл з різних регіонів України. *Вісник українського товариства генетиків і селекціонерів*, 18(1-2), 22-28.

9. Череватов, О. В., & Рошка, Н. М. (2020) Поліморфізм ділянки СоII медоносних бджіл західних регіонів України. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи), 12(2), 174-179.
10. Abou-Shaara, H. F., Al-Ghamdi, A. A., Khan, K. A., & Al-Kahtani, S. N. (2021). Genetic network analysis between *Apis mellifera* subspecies based on mtDNA argues the purity of specimens from North Africa, the Levant and Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(5), 2718-2725.
11. Acharya, R., Akintola, A. A., Malekera, M. J., Kamulegeya, P., Nyakunga, K. B., Mutumbu, M. K., ... & Lee, K. Y. (2021). Genetic relationship of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) populations that invaded Africa and Asia. *Insects*, 12(5), 439.
12. Achou, M., Loucif-Ayad, W., Legout, H., Hmidan, H., Alburaki, M., & Garnery, L. (2015). An insightful molecular analysis reveals foreign honeybees among Algerian honeybee populations (*Apis mellifera* L.). *J. Data Mining Genomics Proteomics*, 6, 166.
13. Aizen, M. A., Morales, C. L., Vázquez, D. P., Garibaldi, L. A., Sáez, A., & Harder, L. D. (2014). When mutualism goes bad: density-dependent impacts of introduced bees on plant reproduction.
14. Alburaki, M., Bertrand, B., Legout, H., Moulin, S., Alburaki, A., Sheppard, W. S., & Garnery, L. (2013). A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria. *BMC genetics*, 14(1), 1-11.
15. Alvarez, J. M., & Hoy, M. A. (2002). Evaluation of the ribosomal ITS2 DNA sequences in separating closely related populations of the parasitoid *Ageniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(2), 250-256.
16. Arias, M. C., & Sheppard, W. S. (1996). Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular phylogenetics and evolution*, 5(3), 557-566.

17. Badii, K. B., Billah, M. K., Afreh-Nuamah, K., Obeng-Ofori, D., & Nyarko, G. (2015). Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa.
18. Baeza, J. A., & Fuentes, M. S. (2013). Exploring phylogenetic informativeness and nuclear copies of mitochondrial DNA (numts) in three commonly used mitochondrial genes: mitochondrial phylogeny of peppermint, cleaner, and semi-terrestrial shrimps (Caridea: Lysmata, Exhippolysmata, and Merguia). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 168(4), 699-722.
19. Bakar, A. A., Faik, A. A. M., Rajendraan, G., Gansau, J. A., & Abdulla, R. (2019, November). Potential DNA barcoding of local stingless honeybee (Tantadan) from Kiulu, Sabah using 28S ribosomal DNA. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1358, No. 1, p. 012023). IOP Publishing.
20. Barciszewska, M. Z., Szymański, M., Erdmann, V. A., & Barciszewski, J. (2001). Structure and functions of 5S rRNA. *Acta Biochimica Polonica*, 48(1), 191-198.
21. Barman, A. S., Singh, M., Singh, R. K., & Lal, K. K. (2016). Evidence of birth-and-death evolution of 5S rRNA gene in Channa species (Teleostei, Perciformes). *Genetica*, 144, 723-732.
22. Bartholomew, C. S., & Prowell, D. (2005). Pan compared to malaise trapping for bees (Hymenoptera: Apoidea) in a longleaf pine savanna. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 78(4), 390-392.
23. Beck, J., McCain, C. M., Axmacher, J. C., Ashton, L. A., Bärtschi, F., Brehm, G., ... & Novotny, V. (2017). Elevational species richness gradients in a hyperdiverse insect taxon: a global meta-study on geometrid moths. *Global Ecology and Biogeography*, 26(4), 412-424.
24. Behura, S. K. (2006). Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular ecology*, 15(11), 3087-3113.
25. Behura, S. K. (2007). Analysis of nuclear copies of mitochondrial sequences in honeybee (*Apis mellifera*) genome. *Molecular biology and evolution*, 24(7), 1492-1505.

26. Biancheri, M. J. B., Suárez, L., Kirschbaum, D. S., Garcia, F. R. M., Funes, C. F., & Ovruski, S. M. (2022). Natural parasitism influences biological control strategies against both global invasive pests *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) and *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae), and the Neotropical-native pest *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology*, *51*(6), 1120-1135.
27. Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., ... & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, *22*(3), 148-155.
28. Blaimer, B. B., Ward, P. S., Schultz, T. R., Fisher, B. L., & Brady, S. G. (2018). Paleotropical diversification dominates the evolution of the hyperdiverse ant tribe Crematogastrini (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Systematics and Diversity*, *2*(5), 3.
29. Borland, E. M., & Kading, R. C. (2021). Modernizing the toolkit for arthropod bloodmeal identification. *Insects*, *12*(1), 37.
30. Boudreaux, H. B. (1979). Confusion of names for the spider mites *Tetranychus tumidus* and *T. gloveri*. *Recent Advances in Acarology. Vol. II*, 395-398.
31. Boykin, L. M., Schutze, M. K., Krosch, M. N., Chomič, A., Chapman, T. A., Englezou, A., ... & Cameron, S. L. (2014). Multi-gene phylogenetic analysis of south-east Asian pest members of the *Bactrocera dorsalis* species complex (Diptera: Tephritidae) does not support current taxonomy. *Journal of Applied Entomology*, *138*(4), 235-253.
32. Branstetter, M. G., Longino, J. T., Ward, P. S., & Faircloth, B. C. (2017). Enriching the ant tree of life: enhanced UCE bait set for genome-scale phylogenetics of ants and other Hymenoptera. *Methods in Ecology and Evolution*, *8*(6), 768-776.
33. Brodschneider, R., Gray, A., Van der Zee, R., Adjlane, N., Brusbardis, V., Charrière, J. D., ... & Woehl, S. (2016). Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research*, *55*(5), 375-378.

34. Buckley, T. R., Lord, N. P., Ramón-Laca, A., Allwood, J. S., & Leschen, R. A. (2020). Multiple lineages of hyper-diverse Zopheridae beetles survived the New Zealand Oligocene Drowning. *Journal of Biogeography*, *47*(4), 927-940.
35. Buenaventura, E., Whitmore, D., & Pape, T. (2017). Molecular phylogeny of the hyperdiverse genus *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae), and comparison between algorithms for identification of rogue taxa. *Cladistics*, *33*(2), 109-133.
36. Bueno, D., Palacios-Gimenez, O. M., Martí, D. A., Mariguela, T. C., & Cabral-de-Mello, D. C. (2016). The 5S rDNA in two *Abracris* grasshoppers (Ommatolampidinae: Acrididae): molecular and chromosomal organization. *Molecular Genetics and Genomics*, *291*, 1607-1613.
37. Cabral-de-Mello, D. C., Moura, R. C., & Martins, C. (2010). Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminatus* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity*, *104*(4), 393-400.
38. Cameron, S. L. (2014). Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annual review of entomology*, *59*, 95-117.
39. Cánovas, F., De la Rúa, P., Serrano, J., & Galián, J. (2008). Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, *46*(1), 24-30.
40. Carpenter, M. H., & Harpur, B. A. (2021). Genetic past, present, and future of the honey bee (*Apis mellifera*) in the United States of America. *Apidologie*, *52*, 63-79.
41. Cherevatov OV, Volkov. R. A. (2010). Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Polyommatus icarus*. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr*, *8*(2), 271-278.
42. Cherevatov, O. V., & Volkov, R. A. (2011). Organization of 5S ribosomal DNA of *Melitaea trivia*. *Cytology and Genetics*, *45*(2), 115-120.
43. Cherevatov, O. V., Panchuk, I. I., Kerek, S. S., & Volkov, R. A. (2019). Molecular diversity of the CoI–CoII spacer region in the mitochondrial genome and the origin of the carpathian bee. *Cytology and Genetics*, *53*, 276-281.

44. Cherevatov, V. F., Ferkaljak, V. Y., & Volkov, R. A. (2014). Uncontrolled hybridization of honeybees (*Apis mellifera* L.) in the territory of Ivano-Frankivsk region. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine*, 12(2), 234-240.
45. Cherevatov, V. F., Ferkaljak, V. Y., & Volkov, R. A. (2016). Hybridization of honey bees (*Apis mellifera* L.) in the territory of Chernivtsy region (Ukraine), National Museum of Ethnography and Natural History of Moldova *Sci. Bull*, 24(37), 62-67.
46. Cherevatov, O.V., Statna, A.P. & Volkov, R. A. (2012). Novel structural subclass of *Lycaena tityrus* 5S ribosomal DNA. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr*, 10(2), 202-207.
47. Clarke, A. R., & Schutze, M. K. (2014). The complexities of knowing what it is you are trapping. *Trapping and the detection, control, and regulation of tephritid fruit flies: Lures, area-wide programs, and trade implications*, 611-632.
48. Clarke, A. R., & Measham, P. F. (2022). Competition: A Missing component of fruit fly (Diptera: Tephritidae) risk assessment and planning. *Insects*, 13(11), 1065.
49. Den Tex, R. J., Maldonado, J. E., Thorington, R., & Leonard, J. A. (2010). Nuclear copies of mitochondrial genes: another problem for ancient DNA. *Genetica*, 138, 979-984.
50. Desneux, N., Starý, P., Delebecque, C. J., Gariépy, T. D., Barta, R. J., Hoelmer, K. A., & Heimpel, G. E. (2009). Cryptic species of parasitoids attacking the soybean aphid (Hemiptera: Aphididae) in Asia: *Binodoxys communis* and *Binodoxys koreanus* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Annals of the Entomological Society of America*, 102(6), 925-936.
51. Dincă, V., Lukhtanov, V. A., Talavera, G., & Vila, R. (2011). Unexpected layers of cryptic diversity in wood white Leptidea butterflies. *Nature communications*, 2(1), 324.
52. Ding, Q., Li, R., Ren, X., Chan, L. Y., Ho, V. W., Xie, D., ... & Zhao, Z. (2022). Genomic architecture of 5S rDNA cluster and its variations within and between species. *BMC genomics*, 23(1), 1-20.

53. Dong, Z., Wang, Y., Li, C., Li, L., & Men, X. (2021). Mitochondrial DNA as a molecular marker in insect ecology: Current status and future prospects. *Annals of the Entomological Society of America*, *114*(4), 470-476.
54. Duyck, P. F., David, P., & Quilici, S. (2004). A review of relationships between interspecific competition and invasions in fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Ecological Entomology*, *29*(5), 511-520.
55. Dzurenko, M., Ranger, C. M., Hulcr, J., Galko, J., & Kaňuch, P. (2021). Origin of non-native *Xylosandrus germanus*, an invasive pest ambrosia beetle in Europe and North America. *Journal of Pest Science*, *94*, 553-562.
56. Eickbush, T. H., & Eickbush, D. G. (2007). Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, *175*(2), 477-485.
57. Elbrecht, V., Taberlet, P., Dejean, T., Valentini, A., Usseglio-Polatera, P., Beisel, J. N., ... & Leese, F. (2016). Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. *PeerJ*, *4*, e1966.
58. Erlandson, M. A., Mori, B. A., Coutu, C., Holowachuk, J., Olfert, O. O., Garipey, T. D., & Hegedus, D. D. (2019). Examining population structure of a bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae), outbreak in western North America: Implications for gene flow and dispersal. *Plos one*, *14*(6), e0218993.
59. Farris, J. S., & Kluge, A. G. (1986). Synapomorphy, parsimony, and evidence. *Taxon*, 298-306.
60. Farslow, J. C., Lipinski, K. J., Packard, L. B., Edgley, M. L., Taylor, J., Flibotte, S., ... & Bergthorsson, U. (2015). Rapid increase in frequency of gene copy-number variants during experimental evolution in *Caenorhabditis elegans*. *BMC genomics*, *16*(1), 1-18.
61. Fehrer, J., Slavíková, R., Paštová, L., Josefiová, J., Mráz, P., Chrtek, J., & Bertrand, Y. J. (2021). Molecular evolution and organization of ribosomal DNA in the hawkweed tribe Hieraciinae (Cichorieae, Asteraceae). *Frontiers in Plant Science*, *12*, 647375.
62. Fišer, C., Robinson, C. T., & Malard, F. (2018). Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Molecular Ecology*, *27*(3), 613-635.

63. Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M., & Cornuet, J. M. (2000). Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology*, 9(7), 907-921.
64. Freeland, J. R. (2020). *Molecular ecology*. John Wiley & Sons.
65. Garbatti Factor, B., de Moura Manoel Bento, F., & Figueira, A. (2022). Methods for delivery of dsRNAs for agricultural pest control: the case of lepidopteran pests. *RNAi Strategies for Pest Management: Methods and Protocols*, 317-345.
66. Garcia, S., Kovařík, A., Leitch, A. R., & Garnatje, T. (2017). Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. *The Plant Journal*, 89(5), 1020-1030.
67. Garnery, L., Cornuet, J. M., & Solignac, M. (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular ecology*, 1(3), 145-154.
68. Gill, B. A., Kondratieff, B. C., Casner, K. L., Encalada, A. C., Flecker, A. S., Gannon, D. G., ... & Funk, W. C. (2016). Cryptic species diversity reveals biogeographic support for the 'mountain passes are higher in the tropics' hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1832), 20160553.
69. Gillespie, J. J., Johnston, J. S., Cannone, J. J., & Gutell, R. R. (2006). Characteristics of the nuclear (18S, 5.8 S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements. *Insect molecular biology*, 15(5), 657-686.
70. Gippet, J. M., Liebhold, A. M., Fenn-Moltu, G., & Bertelsmeier, C. (2019). Human-mediated dispersal in insects. *Current opinion in insect science*, 35, 96-102.
71. Gonzalez-Ittig, R. E., & Gardenal, C. N. (2008). Co-amplification of mitochondrial pseudogenes in *Calomys musculus* (Rodentia, Cricetidae): a source of error in phylogeographic studies. *Genome*, 51(1), 73-78.
72. Grimaldi, D. (2001). Insect evolutionary history from Handlirsch to Hennig, and beyond. *Journal of Paleontology*, 75(6), 1152-1160.

73. Grover, A., & Sharma, P. C. (2016). Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 290-302.
74. Gunter, N. L., Oberprieler, R. G., & Cameron, S. L. (2016). Molecular phylogenetics of Australian weevils (Coleoptera: Curculionoidea): exploring relationships in a hyperdiverse lineage through comparison of independent analyses. *Austral Entomology*, 55(2), 217-233.
75. Hamilton, A. J., Basset, Y., Benke, K. K., Grimbacher, P. S., Miller, S. E., Novotný, V., ... & Yen, J. D. (2010). Quantifying uncertainty in estimation of tropical arthropod species richness. *The American Naturalist*, 176(1), 90-95.
76. Han, H. Y., & McPheron, B. A. (1997). Molecular phylogenetic study of Tephritidae (Insecta: Diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. *Molecular phylogenetics and evolution*, 7(1), 17-32.
77. Han, H. Y., Ro, K. E., & McPheron, B. A. (2006). Molecular phylogeny of the subfamily Tephritinae (Diptera: Tephritidae) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Molecules & Cells (Springer Science & Business Media BV)*, 22(1).
78. Hazkani-Covo, E., Zeller, R. M., & Martin, W. (2010). Molecular poltergeists: mitochondrial DNA copies (numts) in sequenced nuclear genomes. *PLoS genetics*, 6(2), e1000834.
79. Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812-14817.
80. 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.
81. Hendrichs, J., Vera, M. T., De Meyer, M., & Clarke, A. R. (2015). Resolving cryptic species complexes of major tephritid pests. *ZooKeys*, (540), 5.
82. Hennig, W. (1966). Phylogenetic systematics. *Annual review of entomology*, 10(1), 97-116.

83. Hotaling, S., Kelley, J. L., & Frandsen, P. B. (2021). Toward a genome sequence for every animal: where are we now?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(52), e2109019118.
84. Hundsdoerfer, A. K., Rheinheimer, J., & Wink, M. (2009). Towards the phylogeny of the Curculionoidea (Coleoptera): reconstructions from mitochondrial and nuclear ribosomal DNA sequences. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, *248*(1), 9-31.
85. Iftikhar, R., Ashfaq, M., Rasool, A., & Hebert, P. D. (2016). DNA barcode analysis of thrips (Thysanoptera) diversity in Pakistan reveals cryptic species complexes. *PLoS One*, *11*(1), e0146014.
86. Ishchenko, O. O., Bednarska, I. O., & Panchuk, I. I. (2021). Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytology and Genetics*, *55*, 10-18.
87. Ishchenko, O. O., Panchuk, I. I., Andreev, I. O., Kunakh, V. A., & Volkov, R. A. (2018). Molecular organization of 5S Ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytology and Genetics*, *52*, 416-421.
88. Johnson, R., & Strehler, B. L. (1972). Loss of genes coding for ribosomal RNA in ageing brain cells. *Nature*, *240*(5381), 412-414.
89. Jordal, B. H., & Cognato, A. I. (2012). Molecular phylogeny of bark and ambrosia beetles reveals multiple origins of fungus farming during periods of global warming. *BMC evolutionary biology*, *12*, 1-10.
90. Jordal, B. H., Sequeira, A. S., & Cognato, A. I. (2011). The age and phylogeny of wood boring weevils and the origin of subsociality. *Molecular phylogenetics and evolution*, *59*(3), 708-724.
91. Jung, S., Duwal, R. K., & Lee, S. (2011). COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular Ecology Resources*, *11*(2), 266-270.
92. Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, *20*(4), 1160-1166.

93. Kaur, R., & Singh, D. (2020). Molecular markers a valuable tool for species identification of insects: A review. *Annals of Entomology*, 38(1).
94. Kergoat, G. J., Goldstein, P. Z., Le Ru, B., Meagher Jr, R. L., Zilli, A., Mitchell, A., ... & Nam, K. (2021). A novel reference dated phylogeny for the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae: Noctuinae): new insights into the evolution of a pest-rich genus. *Molecular phylogenetics and evolution*, 161, 107161.
95. Kim, J. H., Antunes, A., Luo, S. J., Menninger, J., Nash, W. G., O'Brien, S. J., & Johnson, W. E. (2006). Evolutionary analysis of a large mtDNA translocation (numt) into the nuclear genome of the *Panthera* genus species. *Gene*, 366(2), 292-302.
96. Knapp, S., Aronson, M. F., Carpenter, E., Herrera-Montes, A., Jung, K., Kotze, D. J., ... & Hahs, A. K. (2021). A research agenda for urban biodiversity in the global extinction crisis. *BioScience*, 71(3), 268-279.
97. Korn, L. J. (1982). Transcription of *Xenopus* 5S ribosomal RNA genes. *Nature*, 295(5845), 101-105.
98. Kristensen, N. P. (1975). The phylogeny of hexapod "orders". A critical review of recent accounts. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 13(1), 1-44.
99. Kumar, L. S., Shankar, P., & Kulkarni, V. M. (2018). Analyses of the internal transcribed rDNA spacers (ITS1 and ITS2) of Indian weevils of *Odoiporus longicollis* (Olivier) reveal gene flow between locations. *International Journal of Tropical Insect Science*, 38, 313-329.
100. Kuschel, G. (1995). A phylogenetic classification of Curculionoidea to families and subfamilies. *Memoirs of the Entomological Society of Washington*, 14, 5-33.
101. Layat, E., Probst, A. V., & Tourmente, S. (2013). Structure, function and regulation of transcription factor IIIA: from *Xenopus* to *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(3-4), 274-282.
102. Layat, E., Sáez-Vásquez, J., & Tourmente, S. (2012). Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 53(2), 267-276.

103. Li, J., Coates, B. S., Kim, K. S., Bourguet, D., Ponsard, S., He, K., & Wang, Z. (2014). The genetic structure of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, populations in China: haplotype variance in northern populations and potential impact on management of resistance to transgenic maize. *Journal of Heredity*, *105*(5), 642-655.
104. Liao, C. Q., Wang, M., & Huang, G. H. (2019). A new genus *Gnathospinosa* (Lepidoptera: Tineidae: Euplocaminae) from China, with description of a new species and its taxonomic position. *Zootaxa*, *4555*(3), 416-424.
105. Longino, J. T., & Branstetter, M. G. (2020). Phylogenomic species delimitation, taxonomy, and 'bird guide' identification for the Neotropical ant genus *Rasopone* (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Systematics and Diversity*, *4*(2), 1
106. Lorković, Z. (1993). *Leptidea reali* REISSINGER 1989 (= *lorkovicii* REAL 1988), a new European species (Lepid., Pieridae). *Natura Croatica: Periodicum Musei Historiae Naturalis Croatici*, *2*(1), 1-26.
107. Luis-Martínez, A., Sánchez García, A., Ávalos-Hernández, O., Salinas-Gutiérrez, J. L., Trujano-Ortega, M., Arellano-Covarrubias, A., & Llorente-Bousquets, J. (2020). Distribution and diversity of Papilionidae and Pieridae (Lepidoptera: Papilionoidea) in Loxicha Region, Oaxaca, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, *68*(1), 139-155.
108. Lukhtanov, V. A. (2019). Species delimitation and analysis of cryptic species diversity in the XXI century. *Entomological Review*, *99*, 463-472.
109. Madella, S., Grubbs, K., & Alburaki, M. (2020). Non-invasive genotyping of honey bee queens *Apis mellifera* L.: Transition of the DraI mtDNA COI-COII test to in silico. *Insects*, *12*(1), 19.
110. Magoga, G., Forni, G., Brunetti, M., Meral, A., Spada, A., De Biase, A., & Montagna, M. (2022). Curation of a reference database of COI sequences for insect identification through DNA metabarcoding: COins. *Database*, *2022*, baac055.
111. Martins, C., & Galetti, P. M. (2001). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*, *111*, 439-446.

112. Marvaldi, A. E., Sequeira, A. S., O'Brien, C. W., & Farrell, B. D. (2002). Molecular and morphological phylogenetics of weevils (Coleoptera, Curculionoidea): do niche shifts accompany diversification?. *Systematic biology*, *51*(5), 761-785.
113. McLaughlin, G. M., & Dearden, P. K. (2019). Invasive insects: management methods explored. *Journal of Insect Science*, *19*(5), 17.
114. Milam, J., Johnson, D. E., Andersen, J. C., Fassler, A. B., Narango, D. L., & Elkinton, J. S. (2020). Validating morphometrics with DNA barcoding to reliably separate three cryptic species of *Bombus* Cresson (Hymenoptera: Apidae). *Insects*, *11*(10), 669.
115. Miller, S. E., Holloway, J. D., Dewaard, J. R., Pollock, D., Prosser, S. W., & Hebert, P. D. (2016). Calibrating the taxonomy of a megadiverse insect family: 3000 DNA barcodes from geometrid type specimens (Lepidoptera, Geometridae). *Genome*, *59*(9), 671-684.
116. Morales, C. L., Arbetman, M. P., Cameron, S. A., & Aizen, M. A. (2013). Rapid ecological replacement of a native bumble bee by invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, *11*(10), 529-534.
117. Morton, D. G., & Sprague, K. U. (1984). In vitro transcription of a silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *81*(17), 5519-5522.
118. Nelson, D. W., Linning, R. M., Davison, P. J., & Honda, B. M. (1998). 5'-flanking sequences required for efficient transcription in vitro of 5S RNA genes, in the related nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Gene*, *218*(1-2), 9-16.
119. Neumann, P., & Carreck, N. L. (2010). Honey bee colony losses. *Journal of apicultural research*, *49*(1), 1-6.
120. Nie, R. E., Wei, J., Zhang, S. K., Vogler, A. P., Wu, L., Konstantinov, A. S., ... & Xue, H. J. (2019). Diversification of mitogenomes in three sympatric *Altica* flea beetles (Insecta, Chrysomelidae). *Zoologica Scripta*, *48*(5), 657-666.

121. Oleksa, A., Chybicki, I., Tofilski, A., & Burczyk, J. (2011). Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland. *Journal of Apicultural Research*, 50(2), 116-129.
122. Onuferko, T., & Sheffield, C. (2022). A new species of *Epeolus* Latreille, 1802 (Hymenoptera: Apidae) from western North America. *Insecta Mundi*.
123. Ožana, S., Dolný, A., & Pánek, T. (2022). Nuclear copies of mitochondrial DNA as a potential problem for phylogenetic and population genetic studies of Odonata. *Systematic Entomology*, 47(4), 591-602.
124. Palting, J. D., & Moore, W. (2022). Molecular phylogeny of Lichen Tiger Moths (Lepidoptera, Erebidae, Arctiinae, Lithosiini): a contribution toward classifying Western Hemisphere genera. *ZooKeys*, 1108, 119.
125. Parejo, M., Wragg, D., Gauthier, L., Vignal, A., Neumann, P., & Neuditschko, M. (2016). Using whole-genome sequence information to foster conservation efforts for the European dark honey bee, *Apis mellifera mellifera*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 4, 140.
126. Patwardhan, A., Ray, S., & Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies-a review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2(2), 131.
127. Péntek-Zakar, E., Oleksa, A., Borowik, T., & Kusza, S. (2015). Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies. *Ecology and Evolution*, 5(23), 5456-5467.
128. Perina, A., Seoane, D., González-Tizón, A. M., Rodríguez-Fariña, F., & Martínez-Lage, A. (2011). Molecular organization and phylogenetic analysis of 5S rDNA in crustaceans of the genus *Pollicipes* reveal birth-and-death evolution and strong purifying selection. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 1-11.
129. Pham, P. H., & Terayama, M. (2022). Description of a New Leaf-Cutter Bee of the Genus *Megachile* Latreille, 1802 (Hymenoptera: Megachilidae) from Vietnam. *Japanese Journal of Systematic Entomology*, 28(1), 69-72.
130. Pieler, T., Hamm, J., & Roeder, R. G. (1987). The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell*, 48(1), 91-100.

131. Pinhal, D., Yoshimura, T. S., Araki, C. S., & Martins, C. (2011). The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. *BMC Evolutionary Biology*, *11*(1), 1-14.
132. Porrini, L. P., Quintana, S., Brasesco, C., Maggi, M. D., Porrini, M. P., Garrido, M. P., ... & Eguaras, M. J. (2022). Current genetic diversity of managed and commercially produced *Apis mellifera* colonies in Argentina inferred by wing geometric morphometrics and COI-COII mtDNA locus. *Apidologie*, *53*(5), 61.
133. Porter, T. M., Gibson, J. F., Shokralla, S., Baird, D. J., Golding, G. B., & Hajibabaei, M. (2014). Rapid and accurate taxonomic classification of insect (class Insecta) cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) DNA barcode sequences using a naïve Bayesian classifier. *Molecular Ecology Resources*, *14*(5), 929-942.
134. Powers, R. P., & Jetz, W. (2019). Global habitat loss and extinction risk of terrestrial vertebrates under future land-use-change scenarios. *Nature Climate Change*, *9*(4), 323-329.
135. Provazníková, I., Hejníčková, M., Visser, S., Dalíková, M., Carabajal Paladino, L. Z., Zrzavá, M., ... & Nguyen, P. (2021). Large-scale comparative analysis of cytogenetic markers across Lepidoptera. *Scientific Reports*, *11*(1), 12214.
136. Rafter, M. A., McKay, F., Parisi, M., Sosa, A., Heard, T. A., White, A., ... & Raghu, S. (2022). Biology, host specificity and DNA barcoding of cryptic *Eueupithecia* species (Lepidoptera: Geometridae), and implications for biological control of *Parkinsonia aculeata* (Fabaceae) in Australia. *Austral Entomology*, *61*(1), 124-132.
137. Ranjith, A. P., Quicke, D. L., Manjusha, K., Butcher, B. A., & Nasser, M. (2022). Completely predatory development is described in a braconid wasp. *Scientific Reports*, *12*(1), 1747.
138. Requier, F., Garnery, L., Kohl, P. L., Njovu, H. K., Pirk, C. W., Crewe, R. M., & Steffan-Dewenter, I. (2019). The conservation of native honey bees is crucial. *Trends in ecology & evolution*, *34*(9), 789-798.

139. Roshka N.M., Cherevatov O.V., Volkov R.A. (2021) Molecular organization and polymorphism of 5S rDNA in Carpathian bees. *Cytology and Genetics*, 55(5), 405-413.
140. Rudoy, A., Zhu, C. D., Ferrari, R. R., & Zhang, Y. Z. (2022). Integrative taxonomy based on morphometric and molecular data supports recognition of the three cryptic species within the *Encyrtus sasakii* complex (Hymenoptera, Encyrtidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 90, 129-152.
141. Ruttner, F (1988). Biogeography and taxonomy of Honey bees. Springer-Verlag; Berlin, Germany. 284 pp
142. Sáez, A. G., & Lozano, E. (2005). Body doubles. *Nature*, 433(7022), 111-111.
143. Sáfián, S. (2021). *Iridana languyi* sp. nov., a New Liptenine lycaenid Species from Liberia (Lepidoptera, Lycaenidae, Poritiinae, Liptenini)= *Iridana languyi* sp. nov., új zuzmászka faj Libériából (Lepidoptera, Lycaenidae, Poritiinae, Liptenini). *Annales Musei historico-naturalis hungarici*, 113, 83-92.
144. Salim, D., & Gerton, J. L. (2019). Ribosomal DNA instability and genome adaptability. *Chromosome research*, 27, 73-87.
145. Schiebelhut, L. M., Abboud, S. S., Gómez Daglio, L. E., Swift, H. F., & Dawson, M. N. (2017). A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses. *Molecular Ecology Resources*, 17(4), 721-729.
146. Schmidt, C. A., & Shattuck, S. O. (2014). The higher classification of the ant subfamily Ponerinae (Hymenoptera: Formicidae), with a review of ponerine ecology and behavior. *Zootaxa*, 3817(1), 1-242.
147. Schneider, S. S., Leamy, L. J., Lewis, L. A., & DeGrandi-Hoffman, G. (2003). The influence of hybridization between African and European honeybees, *Apis mellifera*, on asymmetries in wing size and shape. *Evolution*, 57(10), 2350-2364.
148. Sharp, S. J., & Garcia, A. D. (1988). Transcription of the *Drosophila melanogaster* 5S RNA gene requires an upstream promoter and four intragenic sequence elements. *Molecular and cellular biology*.

149. Sihvonen, P., Mutanen, M., Kaila, L., Brehm, G., Hausmann, A., & Staude, H. S. (2011). Comprehensive molecular sampling yields a robust phylogeny for geometrid moths (Lepidoptera: Geometridae). *PloS one*, *6*(6), e20356.
150. Simberloff, D. (2009). We can eliminate invasions or live with them. Successful management projects. *Ecological impacts of non-native invertebrates and fungi on terrestrial ecosystems*, 149-157.
151. Simon, L., Rabanal, F. A., Dubos, T., Oliver, C., Lauber, D., Poulet, A., ... & Probst, A. V. (2018). Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, *46*(6), 3019-3033.
152. Simon, S., Schierwater, B., & Hadrys, H. (2010). On the value of Elongation factor-1 α for reconstructing pterygote insect phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *54*(2), 651-656.
153. Skvarla, M. J., Larson, J. L., Fisher, J. R., & Dowling, A. P. (2021). A review of terrestrial and canopy Malaise traps. *Annals of the Entomological Society of America*, *114*(1), 27-47.
154. Smith, M. A., Woodley, N. E., Janzen, D. H., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. (2006). DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(10), 3657-3662.
155. Srivathsan, A., Hartop, E., Puniamoorthy, J., Lee, W. T., Kutty, S. N., Kurina, O., & Meier, R. (2019). Rapid, large-scale species discovery in hyperdiverse taxa using 1D MinION sequencing. *BMC biology*, *17*, 1-20.
156. Stein, L. D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M. R., Chen, N., ... & Waterston, R. H. (2003). The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS biology*, *1*(2), e45.
157. Stults, D. M., Killen, M. W., Pierce, H. H., & Pierce, A. J. (2008). Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome research*, *18*(1), 13-18.

158. Szitenberg, A., Becking, L. E., Vargas, S., Fernandez, J. C., Santodomingo, N., Wörheide, G., ... & Huchon, D. (2013). Phylogeny of Tetillidae (Porifera, Demospongiae, Spirophorida) based on three molecular markers. *Molecular phylogenetics and evolution*, *67*(2), 509-519.
159. Talavera, G., & Vila, R. (2011). What is the phylogenetic signal limit from mitogenomes? The reconciliation between mitochondrial and nuclear data in the Insecta class phylogeny. *BMC Evolutionary Biology*, *11*(1), 1-15.
160. Tekpinar, A. D., & Kalmer, A. (2019). Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia*, *109*(1-2), 187-224.
161. Tihelka, E., Cai, C., Giacomelli, M., Lozano-Fernandez, J., Rota-Stabelli, O., Huang, D., ... & Pisani, D. (2021). The evolution of insect biodiversity. *Current Biology*, *31*(19), R1299-R1311.
162. Tozkar, C. Ö. (2020). Genetic structure of honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) subspecies based on tRNA leu-COX2 and ND5 regions of mtDNA. *Applied Ecology & Environmental Research*, *18*(2).
163. Trajković, A., & Žikić, V. (2023). Stuck in the caterpillars' web: A half-century of biocontrol research and application on gregarious Lepidopteran pests in Europe. *Sustainability*, *15*(4), 2881.
164. Trautwein, M. D., Wiegmann, B. M., Beutel, R., Kjer, K. M., & Yeates, D. K. (2012). Advances in insect phylogeny at the dawn of the postgenomic era. *Annual review of entomology*, *57*, 449-468.
165. Troutt, A., Savin, T. J., Curtiss, W. C., Celentano, J., & Vournakis, J. N. (1982). Secondary structure of *Bombyx mori* and *Dictyostelium discoideum* 5S rRNA from S1 nuclease and cobra venom ribonuclease susceptibility, and computer assisted analysis. *Nucleic Acids Research*, *10*(2), 653-664.
166. Turner, C. E. (2020). Tephritidae in the biological control of weeds. In *Fruit fly pests* (pp. 157-164). CRC Press.
167. Turnhout, E., & Purvis, A. (2020). Biodiversity and species extinction: categorisation, calculation, and communication. *Griffith Law Review*, *29*(4), 669-685

168. Tyler, B. M. (1987). Transcription of *Neurospora crassa* 5 S rRNA genes requires a TATA box and three internal elements. *Journal of molecular biology*, 196(4), 801-811.
169. Tynkevich, Y. O., & Volkov, R. A. (2019). 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytology and Genetics*, 53, 459-466.
170. Úbeda-Manzanaro, M., Merlo, M. A., Palazon, J. L., Sarasquete, C., & Rebordinos, L. (2010). Sequence characterization and phylogenetic analysis of the 5S ribosomal DNA in species of the family Batrachoididae. *Genome*, 53(9), 723-730.
171. Utzeri, V. J., Ribani, A., Taurisano, V., Banqué, C. H. I., & Fontanesi, L. (2021). Distribution of the main *Apis mellifera* mitochondrial DNA lineages in Italy assessed using an environmental DNA approach. *Insects*, 12(7), 620.
172. van de Kamp, T., Mikó, I., Staniczek, A. H., Eggs, B., Bajerlein, D., Faragó, T., ... & Krogmann, L. (2022). Evolution of flexible biting in hyperdiverse parasitoid wasps. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1967), 20212086.
173. Van den Berg, J., & du Plessis, H. (2022). Chemical control and insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 115(6), 1761-1771.
174. van der Zee, R., Pisa, L., Andonov, S., Brodschneider, R., Charrière, J. D., Chlebo, R., ... & Wilkins, S. (2012). Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10. *Journal of Apicultural Research*, 51(1), 100-114.
175. Vargas, R. I., Piñero, J. C., & Leblanc, L. (2015). An overview of pest species of *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae) and the integration of biopesticides with other biological approaches for their management with a focus on the Pacific region. *Insects*, 6(2), 297-318.
176. Vershinina, A. O., Anokhin, B. A., & Lukhtanov, V. A. (2015). Ribosomal DNA clusters and telomeric (TTAGG) n repeats in blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae) with low and high chromosome numbers. *Comparative Cytogenetics*, 9(2), 161.

177. Vierna, J., Jensen, K. T., Martínez-Lage, A., & González-Tizón, A. M. (2011). The linked units of 5S rDNA and U1 snDNA of razor shells (Mollusca: Bivalvia: Pharidae). *Heredity*, *107*(2), 127-142.
178. Vierna, J., Wehner, S., Höner zu Siederdisen, C., Martinez-Lage, A., & Marz, M. (2013). Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity*, *111*(5), 410-421.
179. Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics selection evolution*, *34*(3), 275-305.
180. Vizoso, M., Vierna, J., González-Tizón, A. M., & Martínez-Lage, A. (2011). The 5S rDNA gene family in mollusks: characterization of transcriptional regulatory regions, prediction of secondary structures, and long-term evolution, with special attention to Mytilidae mussels. *Journal of Heredity*, *102*(4), 433-447.
181. Volkov, R. A., Borisjuk, N., Garcia, S., Kovařík, A., & Sáez-Vásquez, J. (2022). Molecular organization, evolution, and function of ribosomal DNA. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 994380.
182. Vozárová, R., Herklotz, V., Kovařík, A., Tynkevich, Y. O., Volkov, R. A., Ritz, C. M., & Lunerová, J. (2021). Ancient origin of two 5S rDNA families dominating in the genus *Rosa* and their behavior in the Canina-type meiosis. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 643548.
183. Wakie, T. T., Yee, W. L., Neven, L. G., & Kumar, S. (2019). Modeling the abundance of two *Rhagoletis* fly (Diptera: Tephritidae) pests in Washington State, USA. *PLoS One*, *14*(6), e0217071.
184. Walker, A. A., Robinson, S. D., Yeates, D. K., Jin, J., Baumann, K., Dobson, J., ... & King, G. F. (2018). Entomo-venomics: The evolution, biology and biochemistry of insect venoms. *Toxicon*, *154*, 15-27.
185. Wheeler, W. C. (1989). The systematics of insect ribosomal DNA. *The hierarchy of life. Molecules and morphology in phylogenetic analysis*, 307-321.
186. Wu, C. G., Han, H. X., & Xue, D. Y. (2010). A pilot study on the molecular phylogeny of Drepanoidea (Insecta: Lepidoptera) inferred from the nuclear gene EF-

1 α and the mitochondrial gene COI. *Bulletin of Entomological Research*, 100(2), 207-216.

187. Yee, W. L., Hernández-Ortiz, V., Rull, J., Sinclair, B. J., & Neven, L. G. (2014). Status of Rhagoletis (Diptera: Tephritidae) pests in the NAPPO countries. *Journal of Economic Entomology*, 107(1), 11-28.

188. Zhang, D. X., & Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular ecology*, 12(3), 563-584.

ДОДАТОК

Список публікацій здобувачки за темою дисертації

Статті у періодичних наукових виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та Scopus:

1. **Roshka N.M.**, Cherevatov O.V., Volkov R.A. (2021) Molecular organization and polymorphism of 5S rDNA in Carpathian bees. *Cytology and Genetics*, 55(5), 405-413.

Статті у фахових наукових виданнях України:

1. **Рошка, Н. М.**, Череватов, О. В., & Волков, Р. А. (2020) 5S рибосомна ДНК совковидки рожевої *Thyatira batis* L. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12(1), 20-25.

2. Череватов, О. В., & **Рошка, Н. М.** (2020) Поліморфізм ділянки *CoII* медоносних бджіл західних регіонів України. *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 12(2), 174-179.

3. **Рошка, Н. М.**, Волкова А. Р., & Панчук, І. І. (2021) Молекулярна організація 5S рибосомної ДНК *Apis mellifera ligustica*. *Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів*, 19(1-2), 31-39.

4. **Рошка Н.М.** (2023) Організація міжгенного спейсера 5S рибосомної ДНК *Aratea tonoglypha* (Lepidoptera). *Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи)*, 15(1), 26-31.

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Roshka, N. M.**, Cherevatov, A. V., & Volkov, R. A. (2019) Polymorphism of the 5S rDNA intergenic spacer in *A. mellifera carnica* and *A. m. macedonica*. *Biopolymers & Cell*, 35(5), 391.

2. **Рошка, Н.М.**, & Волков, Р. А. (2019) Поліморфізм міжгенного спейсера 5S рДНК у підвидів бджоли медоносної (*Apis mellifera* L.). І Міжнародна науково-практична конференція «Стале бджільництво в Україні», Чернівці. С. 28- 29.

3. **Рошка, Н. М., & Волков, Р. А.** (2020) Поліморфізм міжгенного спейсера 5S рДНК бджоли медоносної *Apis mellifera macedonica* (Insecta: Hymenoptera). *Українська ентомофауністика*, 11(1), 69-70.

4. **Roshka, N. M., & Volkov, R. A.** (2021) Bioinformatic analysis of the 5S rDNA IGS in the honeybee *Apis mellifera caucasica*. *Мат. XV Всеукраїнської конференції молодих вчених ІМБГ з міжнародною участю*, 26-27 травня, Київ. С. 239.

5. **Рошка, Н. М., & Волков, Р. А.** (2021) Структурна організація міжгенного спейсера 5S рДНК медоносних бджіл еко типу «Рахівська». *Мат. Наукової конференції «Зоологія в сучасному світі: виклики XXI століття»*, 1-3 червня, Київ. С.97

6. **Рошка, Н. М. & Волков, Р. А.** (2021) Структурна організація та поліморфізм міжгенного спейсера 5S рДНК карпатської бджоли. *Вісник Одеського національного університету. Біологія*. 26. Вип. 2(49). С. 125

7. Hlorina, K-H. D., **Roshka, N. M., & Volkov, R. A.** (2022) Molecular organization of 5S rDNA in *Cupido argiades* (Lycaenidae). *All-Ukrainian conference on molecular and cell biology with international participation dedicated to the heroic struggle of the Ukrainian people against russian invaders*, June 15-17, Kyiv. P. 31

8. **Roshka, N. M. & Volkov, R. A.** (2022) Long and short 5S rDNA variants in the genomes of *Apis* species. *Вісник Одеського національного університету. Біологія*. 27 (2(51)). P. 116-117