

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 (*третьої 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.). I

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