

МОЛЕКУЛЯРНА ОРГАНІЗАЦІЯ 5S РИБОСОМНОЇ ДНК *APIS MELLIFERA LIGUSTICA*

Н. М. РОШКА, А. Р. ВОЛКОВА, І. І. ПАНЧУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича
вул. Коцюбинського, 2, м. Чернівці, 58012, Україна
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

Мета. 5S рДНК належать до середньо повторюваних, тандемно організованих послідовностей, які складаються з кодувальних ділянок та міжгенних спейсерів (*intergenic spacer* — IGS). Порівняння IGS успішно використовується при дослідженні мікроеволюційних процесів та у молекулярній таксономії рослин, хребетних та деяких безхребетних тварин. Водночас, у комах 5S рДНК все ще вивчена недостатньо. У цій статті ми наводимо результати дослідження молекулярної організації та поліморфізму IGS 5S рДНК *Apis mellifera ligustica*. **Методи.** Екстракція ДНК, ПЛР-ампліфікація, клонування 5S рДНК, сиквенування, біоінформатичний аналіз. **Результати.** IGS 5S рДНК *A. m. ligustica* клонували у плазмідному векторі і сиквенували. Отримані послідовності порівнювали з аналогічними ділянками геному *A. m. carnica*. Встановлено, що в геномі *A. m. ligustica* існує один клас IGS 5S рДНК, який представлений структурними підкласами 1A, 1B, 1G та 1F. Два з цих підкласів — 1G та 1F — описані вперше і є специфічними для *A. m. ligustica*. **Висновки.** Отримані результати свідчать про високий внутрішньо- та міжгеномний поліморфізм 5S рДНК у підвидів *Apis mellifera*.

Ключові слова: 5S рДНК, міжгенний спейсер, повторювані послідовності, *Apis mellifera*, *Apis* dae.

Вступ. Медоносна бджола (*Apis mellifera* L.), ареал якої охоплює Європу, Західну Азію та Африку, колонізуючи нові території розділилась на чисельні підвиди та екотиби (Ruttner, 1992; Munoz, De la Rua, 2021). Зокрема, у Європі широко розповсюдились підвиди, які належать до еволюційної лінії С (Ruttner, 1988; Munoz, De la Rua, 2020). Територія України вважається природним ареалом для трьох підвидів: *A. m. carnica*, *A. m. macedonica* та *A. m. mellifera* (Ruttner, 1988). Ці підвиди представлені трьома породами — Карпатська, Українська степова та Темна європейська, які добре адаптовані до локальних умов довкілля (Ruttner, 1988; Cherevatov et al., 2019; Cherevatov et al., 2020). Не зважаючи на це, за останні десятиліття відбувається неконтрольоване ввезення в Україну інших підвидів / порід (Bagriy, 2006). Це призводить до їх спонтанної гібридизації з місцевими формами, що в свою чергу стає причиною втрати генфонду останніх (Cherevatov et al., 2014; Cherevatov et al., 2016; Fedoriak et al., 2017; Fedoriak et al., 2018; Cherevatov et al., 2019; Cherevatov, Roshka, 2020).

Поряд з іншими селекційними расами на територію України здійснювались спроби інтродукції італійської медоносною бджолою — *A. m. ligustica*. Хоча підвиди *A. m. carnica* та *A. m. ligustica* є близько спорідненими в межах еволюційної гілки С, вони демонструють генетичну різницю. Було показано, що мітохондріальна ДНК (мтДНК) *A. m. carnica* належить до мітотипу C2, а *A. m. ligustica* — в основному до C1, хоча в межах *A. m. ligustica* також знаходять мітотип M7. Такі результати свідчать про гібридне походження італійської бджолою внаслідок схрещування її предкових форм з представниками лінії М (Utzeri et al., 2021).

В наш час гостро постає питання про встановлення приналежності існуючих на території України популяцій медоносної бджоли до певних підвидів / порід. Моніторинг їх розповсюдження вимагає застосування сучасних молекулярно-генетичних методів. Наразі для цього широко використовується порівняння мінливих ділянок мтДНК, а саме — генів *COI* та *COII*, які кодують субодиниці цитохромоксидази (Cherevatov et al., 2019; Henriques et al., 2019; Cherevatov et al., 2020; Cherevatov, Roshka, 2020; Francoso et al., 2020; Abou-Shaara et al., 2021). Проте, з огляду на успадкування мтДНК у бджіл виключно по материнській лінії, видається доцільним розширити ці дослідження, використовуючи ядерні молекулярні маркери.

Ділянки ядерного геному, що кодують 5S рРНК (5S рДНК) належать до тандемно організованих, середньо повторюваних послідовностей, які складаються з кодувальних ділянок та міжгенних спейсерів (intergenic spacers, IGS) (Ishchenko et al., 2018; Simon et al., 2018; Ding et al., 2021). Послідовності, що кодують рРНК є очікувано високо подібними навіть у представників віддалених таксонів, оскільки їх консервативність підтримується дією стабілізуючого добору. На відміну від цього, IGS може суттєво відрізнятися навіть у близько споріднених форм. Відповідно, порівняння послідовностей IGS з успіхом використовується при дослідженні мікроеволюційних процесів та у молекулярній таксономії рослин (Tynkevich et al., 2015; Ishchenko et al., 2018; Tynkevich, Volkov, 2019; Ishchenko et al., 2021; Vozarova et al., 2021), хребетних (Vierna et al., 2013; Cavalcante et al., 2020) та деяких безхребетних тварин (Cherevatov et al., 2010; Cherevatov et al., 2011a, 2011b; Vizoso et al., 2011; Cherevatov et al., 2012; Statna et al., 2014; Bardella et al., 2018; Roshka et al., 2020). Водночас, у комах 5S рДНК все ще вивчена недостатньо.

Попередньо нами був описаний високий внутрішньо- та міжгеномний поліморфізм послідовностей IGS в межах підвиду медоносної бджоли *A. m. carnica* (Roshka et al., 2021). У цій статті ми наводимо результати сиквенування IGS 5S рДНК підвиду *A. m. ligustica* та порівнюємо їх з отриманими раніше даними.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були робочі бджоли підвиду *A. m. ligustica*, надані І. Фурсиком (м. Харків). Екстракцію геномної ДНК з тіла бджоли здійснювали з використанням СТАВ (Schiebelhut et al., 2017). Для клонування 5S рДНК використано ДНК, отриману з двох особин.

Ампліфікацію IGS проводили за допомогою ПЛР, для якої використовували пару праймерів, комплементарних до 3' та 5' кінців кодувальної ділянки 5S рДНК: Pr5S-F (5'- CAT AGC GGC CGC GTC AGT ACT TGG ATG GGT GA-3') + Pr5S-R (5'- CAT GGC GGC CGC GTA CGT AGC TTG ACT TTG GTG ATC G-3'). Реакційна суміш загальним об'ємом 20 мкл містила 1 нг ДНК, 1x Hot FirePol Blend Master Mix (Solis Biodyne, Estonia) та 0,2 мкМ кожного з праймерів. ПЛР проводили на апліфікаторі PTC-100 (MJ Research, Inc., США) за програмою: 1 — початкова активація ДНК-полімерази: 95 °С, 13 хв; 2 — денатурація ДНК: 95 °С, 15 с; 3 — гібридизація праймерів: 57 °С, 30 с; 4 — синтез ДНК: 72 °С, 40 с; 5 — завершення ампліфікації: 72 °С, 8 хв; 6 — припинення реакції: 4 °С. Загальна кількість циклів — 35. Отримані ПЛР-продукти аналізували в 2 % агарозному гелі.

Відібрані ампліфікати лігували у плазмідний вектор pJet1.2 за допомогою набору CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific). Трансформацію компетентних клітин *Escherichia coli* (штам XL1-blue) здійснювали методом електропорації з використанням приладу E. coli Pulser (BioRad, США). Колонії, що містили рекомбінантні плазміди, виявляли за резистентністю до ампіциліну. Відібрані плазміди сиквенували на фірмі LGC Genomics (Німеччина). Первинну обробку розшифрованих послідовностей проводили з використанням комп'ютерних програм Chromas та DNASTAR. Вирівнювання отриманих послідовностей здійснювали за допомогою методу ClustalV (Higgins et al., 1992). Для побудови та візуалізації філогенетичного дерева використовували онлайн-сервер iqTree (<http://www.iqtree.org>) та програму FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

Результати та обговорення

Аналіз отриманих електрофореграм показав для всіх зразків утворення ампліфікатів довжиною приблизно 400 нп. Така довжина ПЛР-продуктів була характерна і для досліджених нами раніше представників підвиду *A. m. carnica* (Roshka et al., 2021). Ці дані свідчать про низь-

кий рівень поліморфізму за довжиною IGS у бджоли медоносної.

Отримані ПЛР-продукти клонували у плазмідному векторі. За результатами скринінгу для сиквенування було обрано по 2 клони для двох особин: Lig1.1, -1.2 та Lig2.1 та -2.2, які містили вставки очікуваної довжини (табл. 1)..

Таблиця 1. Характеристика IGS 5S рДНК представників роду *Apis*

Підвид	Клон /фрагмент ДНК		IGS		Посилання
	Назва	GenBank Acc. No	Довжина, нп	Вміст GC- пар, %	
<i>A. m. ligustica</i>	Lig1.1	–	239	20,1	Ця стаття
	Lig1.2	–	250	22,4	Ця стаття
	Lig2.1	–	253	22,5	Ця стаття
	Lig2.2	–	253	21,3	Ця стаття
<i>A. m. carnica</i>	Gov3.4	MZ328121	247	21,5	Roshka et al. 2021
	Gov3.5	MZ328122	252	21,0	Roshka et al. 2021
	Rakh3.1	MZ328123	252	21,4	Roshka et al. 2021
	Rakh3.2	MZ328124	249	22,5	Roshka et al. 2021
	Rakh3.3	MZ328125	251	21,5	Roshka et al. 2021
	Rakh3.4	MZ328126	253	22,1	Roshka et al. 2021
	Rakh3.5	MZ328127	253	22,5	Roshka et al. 2021
	CarnGB1.1	GCA_013841245.1	250	21,6	Roshka et al. 2021
	CarnGB1.3	GCA_013841245.1	246	21,1	Roshka et al. 2021
	CarnGB1.4	GCA_013841245.1	250	21,6	Roshka et al. 2021
	CarnGB1.6	GCA_013841245.1	251	21,1	Roshka et al. 2021
	CarnGB1.7	GCA_013841245.1	248	21,4	Roshka et al. 2021
	CarnGB1.9	GCA_013841245.1	251	21,5	Roshka et al. 2021
CarnGB1.10	GCA_013841245.1	244	21,3	Roshka et al. 2021	
<i>A. cerana</i>	CerGB1.3	GCA_001442555.1	252	24,6	Roshka et al. 2021

Аналіз отриманих послідовностей показав, що у *A. m. ligustica* довжина IGS знаходиться в межах від 239 до 253 нп, тобто практично співпадає з такою у *A. m. carnica* — від 237 до 253 нп (Roshka et al., 2021). Рівень подібності між двома клонами для першої особини становив 88,7%, для другої — 97,2 %, а між клонами різних особин — 84,5-92,8 %. Отже, дві досліджені особини помітно відрізняються між собою за послідовністю IGS. Для пояснення цього можна запропонувати дві можливості: (1) особини в межах однієї колонії дійсно відрізняються між собою за набором варіантів IGS 5S рДНК, які присутні в геномі; (2) у геномі кожної особини присутні всі чотири варіанти IGS, але цього не було виявлено, оскільки для сиквенування було

використано лише по два клони. Для перевірки цих двох можливостей необхідно дослідити більше клонів для кожної особини.

На відміну від низької варіабельності за довжиною, мінливість за нуклеотидною послідовністю у представників різних підвидів виявилась високою: подібність між IGS *A. m. ligustica* та *A. m. carnica* коливалась в межах від 68,7 до 97,2 % (табл. 2). Найвищу подібність виявлено для пари послідовностей Lig2.2/Rakh3.4. Водночас, найнижчий рівень подібності демонструють клони Gov3.4 та CarnGB1.3. На загал отримані результати вказують на високу швидкість молекулярної еволюції та мінливість IGS в межах виду *A. mellifera*.

Таблиця 2. Рівень подібності (%) IGS 5S рДНК представників роду *Apis*

Назва клону / фрагменту ДНК	Lig1.1	Lig1.2	Lig2.1	Lig2.2	Gov3.4	Gov3.5	Rakh3.3	Rakh3.4	CarnGB1.3	CarnGB1.4	CerGB1.3
Lig1.1	100	88,7	84,5	85,4	77,8	84,1	87,0	87,9	82,0	89,5	56,9
Lig1.2		100	92,0	92,8	75,3	89,2	92,8	95,6	88,2	95,2	62,4
Lig2.1			100	97,2	73,7	88,5	95,6	96,4	84,6	91,2	62,3
Lig2.2				100	73,3	90,1	92,8	97,2	83,7	90,4	61,2
Gov3.4					100	78,5	76,9	73,7	68,7	76,9	61,9
Gov3.5						100	92,4	88,1	84,1	90,0	65,1
Rakh3.3							100	92,0	88,2	94,4	65,3
Rakh3.4								100	86,2	94,0	60,7
CarnGB1.3									100	89,0	60,2
CarnGB1.4										100	64,0
CerGB1.3											100

Примітка. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1.

Порівняння послідовностей IGS показало наявність чисельних однонуклеотидних поліморфізмів (single nucleotide polymorphism, SNP) та кількох коротких інделів (інерцій / делецій) (рис. 1). IGS виду *A. cerana*, який був взятий для порівняння, відрізняється від *A. m. carnica* та *A. m. ligustica* великою кількістю SNP, кількома короткими інделами та наявністю специфічної інсерції ATTGATG, яка виникла в результаті дуплікації сусідньої ділянки.

Відомо, що окрім внутрішніх елементів промотору РНК-полімерази III, до яких належать

A-box, IE (intermediate element) та C-box (Tyler, 1987; Sharp, Garcia 1988; Vizoso et al., 2011; Layat et al., 2013), транскрипція 5S рДНК у комах може також залежати від зовнішніх елементів промотора. Одним з таких елементів, який бере участь в ініціації транскрипції 5S рДНК, є ТАТА-подібна послідовність, знайдена 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 молюсків (Vizoso et al, 2011)

Молекулярна організація 5S рибосомної ДНК *Apis mellifera ligustica*

і риб (Martins, Galetti, 2001), а також у рослин (Simon et al., 2018; Tynkevich et al., 2015; Tynkevich, Volkov, 2019) і грибів (Tyler, 1987). В попередніх дослідженнях нами був виявлений АТ-багатий мотив ТАТТТ у положенні від -30 до -26 нп перед початком кодувальної ділянки у

A. m. carnica (Roshka et al., 2021). Аналіз отриманих клонів виявив ідентичне розташування мотиву ТАТТТ у IGS *A. m. ligustica*. Виняток становить клон Lig1.2, у якого ця ділянка представлена послідовністю ТАТТС.

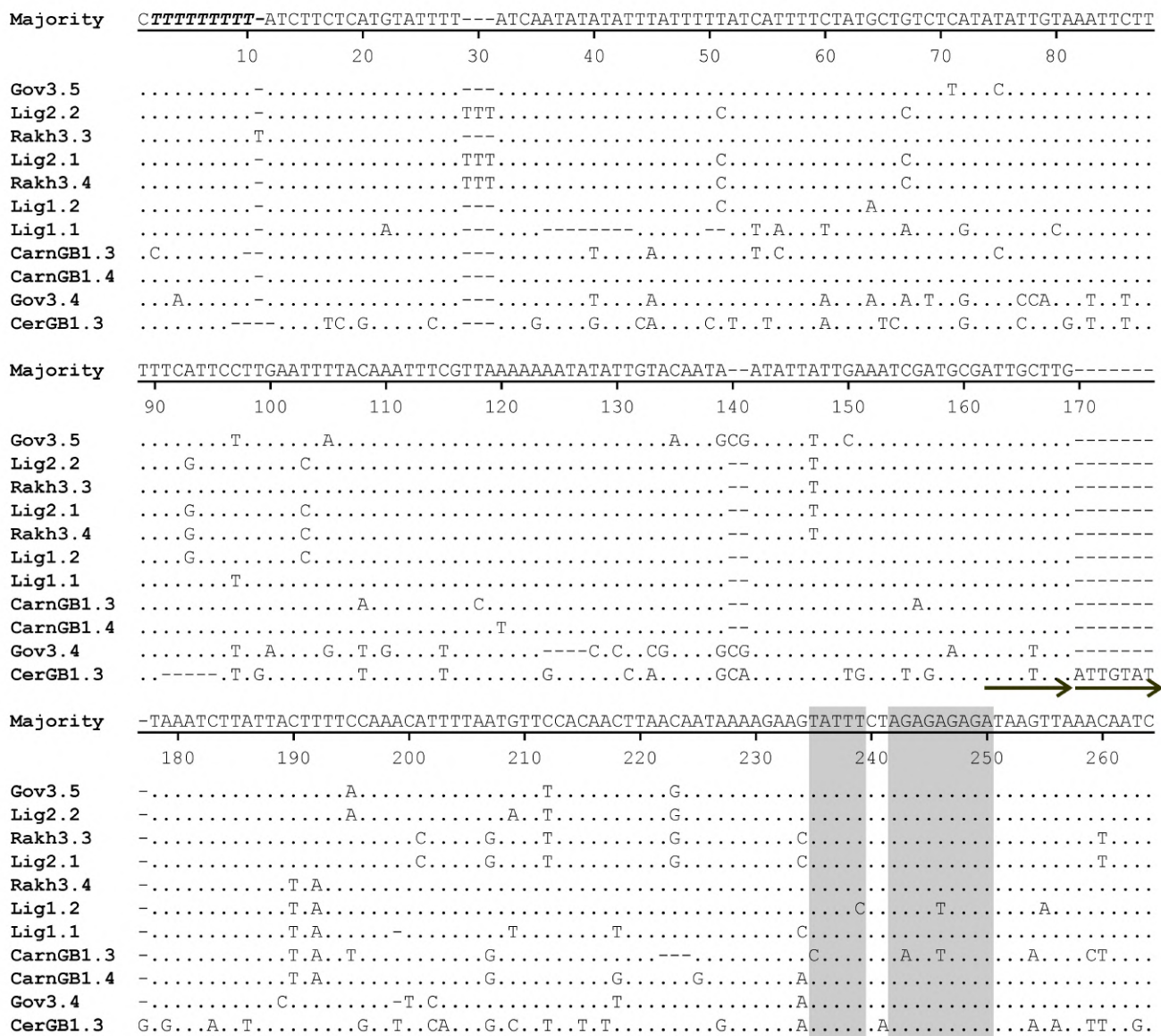


Рис. 1. Порівняння послідовностей IGS 5S рДНК *Apis mellifera ligustica*, *A. m. carnica* та *A. cerana*. Сірим кольором виділено потенційні зовнішні елементи промотора; жирним курсивом вказано oligo-dT послідовність термінатора; стрілками позначено розташування дуплікації у IGS. Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1.

У IGS *A. m. ligustica*, як і в *A. m. carnica* у положенні від -23 до -15 нп присутній висококонсервативний пурин-багатий мотив AGAGAGAGA (рис. 1), роль якого наразі невідома. Проте міжвання цього мотиву з TATA-подібним елементом нашоухує на думку про його можливу регуляторну функцію. Крім того, на 5' кінці IGS на межі з кодувальною ділянкою у *A. m. ligustica* та інших представників роду *Apis* знаходиться oligo-dT мотив, який імовірно виконує роль термінатора транскрипції (Vierna et al., 2013).

На основі наявних послідовностей IGS була побудована ML-філодендрограма (рис. 2). Її аналіз свідчить, що в геномі представників *A. m. carnica* існує щонайменше два класи IGS, кожен з яких включає в себе різні структурні підкласи. Водночас, у геномі *A. m. ligustica* нами виявлено IGS лише першого класу. Зокрема, встановлено, що IGS клонів Lig2.2 та Lig2.1 належать до структурних підкласів 1A та 1B, відповідно, тоді як IGS Lig1.1 та Lig 1.2 слід віднести до нових, не описаних раніше підкласів

1G та 1F. Імовірно, ці два підкласи виникли в ході молекулярної еволюції вже після дивергенції двох досліджуваних підвидів медоносної бджоли.

A. m. carnica та *A. m. ligustica*, хоч і належать до різних підвидів медоносної бджоли, майже не відрізняються за наборами SNP в межах мінливих ділянок генів *COI-COII*, які широко використовуються для генотипування представників родини *Apis* (Hristov et al., 2018; Cherevatov et al., 2019; Henriques et al., 2019; Cherevatov et al., 2020; Hailu et al., 2020; Madella et al., 2020; Merheb et al., 2020). На відміну від цього, послідовності IGS 5S рДНК демонструють значно вищий рівень варіабельності. Отже, ядерна 5S рДНК є еволюційно більш мінливою, ніж мітохондріальні гени *COI-COII*. Відповідно, можна висунути припущення, що порівняння наборів структурних класів/підкласів IGS може бути використано для ідентифікації підвидів медоносної бджоли.

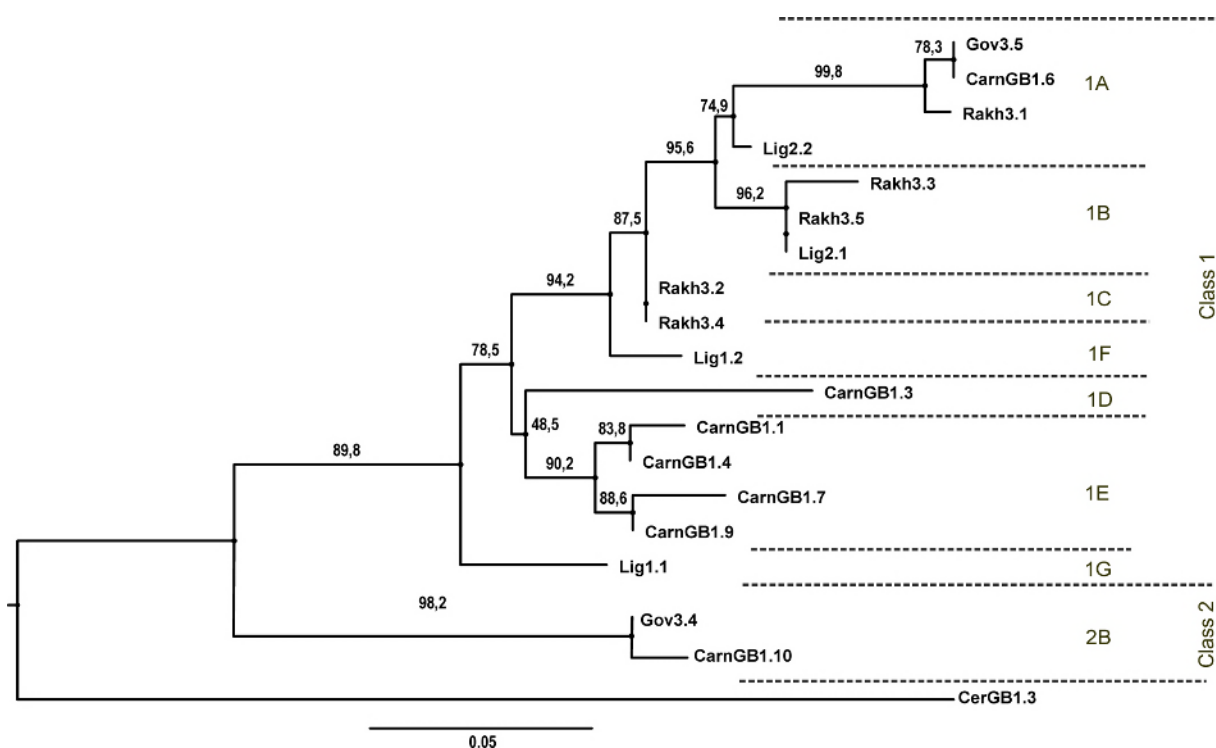


Рис. 2. ML-філодендрограма, отримана при порівнянні послідовностей IGS 5S рДНК *Apis mellifera ligustica*, *A. m. carnica* та *A. sergala* методом максимальної правдоподібності з використанням GTR моделі заміщення. Цифри біля вузлів відповідають бутстреп-підтримці, яка розрахована у відсотках для 1000 реплікацій. Приналежність окремих клонів до певних підкласів відповідає класифікації, яка була запропонована нами раніше (Roshka et al., 2021). Характеристики використаних для порівняння клонів наведено у табл. 1.

Таким чином, нами встановлено, що в геномі *A. m. ligustica* існує принаймні один клас IGS 5S рДНК, який представлений структурними підкласами 1A, 1B, 1G та 1F. Два з цих підкласів — 1G та 1F — описані вперше і видаються специфічними для *A. m. ligustica*. Водночас, у геномах досліджених раніше представників *A. m. carnica* присутні два класи 5S рДНК, які включають п'ять (1A, 1B, 1C, 1D, 1E) та два (2A та 2B) підкласи, відповідно (Roshka et al., 2021).

Висновки

Довжина IGS 5S рДНК *A. m. ligustica* варіює в межах від 239 до 253 пн. Передбачувані зовнішні елементи промотора 5S рДНК ідентичні з описаними нами раніше для підвиду *A. m. carnica*. У геномі *A. m. ligustica* присутній один клас IGS 5S рДНК, який представлений чотирма структурно відмінними підкласами 1A, 1B, 1G та 1F, з яких два останні є специфічними для *A. m. ligustica*. Отримані результати свідчать про високий внутрішньо- та міжгеномний поліморфізм IGS 5S рДНК в межах виду *Apis mellifera*.

Подяка. Автори висловлюють подяку проф. Р. А. Волкову (Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича) за участь у обговоренні отриманих результатів.

Фінансування. Дослідження проводились за фінансової підтримки Міністерства освіти і науки України (грант № 0120U102119).

Перелік літератури

1. Abou-Shaara H. F., Abbas A. S., AL-Kahtani S. N., Taha El-K. A. et al. Exploring the non-coding regions in the mtDNA of some honey bee species and subspecies. *Saudi. J. Bio. Sci.* 2021. Vol. 28(1). P. 204–209. doi:10.1016/j.sjbs.2020.09.047
2. Bagriy I. G. About relatives of Ukrainian bees. *Sci. Herald Nat. Agrar. Univ.* 2006. Vol. 94. P. 90–93.
3. Bardella V. B., Cabral-de-Mello D. C. Uncovering the molecular organization of unusual highly scattered 5S rDNA: The case of *Chariesterus armatus* (Heteroptera). *Gene.* 2018. Vol. 646. P. 153–158. doi:10.1016/j.gene.2017.12.030
4. Merheb B., Al Homsy R., Chaddad A., Nasr Z. Genetic screening of *Apis mellifera* subspecies in Lebanon using mitochondrial DNA test. *J. Apicultural Res.* 2020. Vol. 59 (4). P. 658–662. doi:10.1080/00218839.2020.1740407
5. Cavalcante M. G., Nagamachi C. Y., Pieczarka J. C., Noronha R. C. R. Evolutionary insights in Amazonian turtles (Testudines, Podocnemididae): co-location of 5S rDNA and U2 snRNA and wide distribution of Tc1/Mariner. *Biol. Open.* 2020. Vol. 9(4): bio049817. doi:10.1242/bio.049817
6. Cherevatov O. V., Melnik E. O., Volkov R. A. Polymorphism of *COI* gene in honey bees from different regions of Ukraine. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2020. Vol. 18(1-2). P. 22–28. [in Ukrainian] / Череватов О. В., Мельник Є. О., Волков Р. А. Поліморфізм гена *COI* у медоносних бджіл з різних регіонів України. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2020. Т. 18(1–2). С. 22–28. doi:10.7124/visnyk.utgis.18.1-2.1351
7. Cherevatov O. V., Panchuk I. I., Kerek S. S., Volkov R. A. Molecular diversity of the *CoI–Coll* spacer region in the mitochondrial genome and the origin of the Carpathian bee. *Cytol. Genet.* 2019. Vol. 53(4). P. 276–281. doi:10.3103/S0095452719040030
8. Cherevatov O. V., Roshka N. M. Polymorphism of the *Coll* gene of honey bees in the western regions of Ukraine. *Sci. Herald Chernivtsi Univ. Biol. (Biol. System.).* 2020. Vol. 12(2). P. 174–179. [In Ukrainian] / Череватов О. В., Рошка Н. М. Поліморфізм ділянки *Coll* медоносних бджіл західних регіонів України. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2020. Т. 12(2). С. 174–179. doi: 10.31861/biosystems-2020.02.174
9. Cherevatov O. V., Statna A. P., Volkov R. A. Novel structural subclass of *Lycaena tityrus* 5S ribosomal DNA. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2012. Vol. 10(2). P. 202–207. [in Ukrainian] / Череватов О. В., Станта А. П., Волков Р. А. Новий структурний підклас 5S рибосомної ДНК *Lycaena tityrus*. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2012. Т. 10(2). С. 202–207.
10. Cherevatov O. V., Volkov R. A. Molecular organization of 5S rDNA of *Satyrus drias* (Lepidoptera). *Rep. Natl. Acad. Sci. Ukr.* 2011a. Vol. 1. P. 140–145. [in Ukrainian] / Череватов О. В., Волков Р. А. Молекулярна організація 5S рДНК *Satyrus drias* (Lepidoptera). Доповіді Національної академії наук України. 2011a. № 1. С. 140–145.
11. Cherevatov O. V., Volkov R. A. Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Polyommatus icarus*. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2010. Vol. 8(2). P. 271–278. [in Ukrainian] / Череватов О. В., Волков Р. А. Молекулярна організація 5S рибосомної ДНК *Polyommatus icarus*. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2010. Т. 8(2). С. 271–278.
12. Cherevatov O. V., Volkov R. A. Organization of 5S ribosomal DNA of *Melitaea trivialis*. *Cytol. Genet.* 2011b. Vol. 45(2). P. 115–120. doi:10.3103/S0095452711020034
13. Cherevatov V. F., Ferkaljak V. Y., Volkov R. A. Hybridization of honey bees (*Apis mellifera* L.) in the territory of Chernivtsy region (Ukraine). *Natl. Mus. Ethnogr. Nat. Hist. Mold. Sci. Bull.* 2016. Vol. 24 (37). P. 62–67.
14. Cherevatov V. F., Ferkaljak V. Y., Volkov R. A. Uncontrolled hybridization of honeybees (*Apis mellifera* L.) in the territory of Ivano-Frankivsk region. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukr.* 2014.

- Vol. 12(2). P. 234–240. [in Ukrainian] / Череватов В. Ф., Феркаляк В. Ю., Волков Р. А. Неконтрольована гібридизація бджоли медоносної (*Apis mellifera* L.) на території Івано-Франківської області. Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. 2014. Т. 12(2). С. 234–240.
15. Ding Q., Li R., Ren X., Chan L. et al. Genomic architecture of 5S rDNA cluster and its variations within and between species. *bioRxiv*. 2021. doi:10.1101/2021.02.17.431734
 16. Fedoriak M. M., Tymochko L. I., Kulmanov O. M., Volkov R. A. et al. Winter losses of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in Ukraine (monitoring results of 2015–2016). *Ukr. J. Ecol.* 2017. Vol. 7 (4). P. 604–613. doi: 10.15421/2017_167
 17. Fedoriak M. M., Tymochko L. I., Kulmanov O. M., Rudenko S. S. et al. Honey bee (*Apis mellifera* L.) colony losses in Ukraine after the winter of 2016–2017 within the international monitoring. *Sci. Herald Chernivtsy Univ. Biol. (Biol. Systems)*. 2018. Vol. 10(1). P. 37–46. [in Ukrainian] / Федоряк М. М., Тимочко Л. І., Кульманов О. М., Руденко С. С. та ін. Втрати колоній медоносних бджіл (*Apis mellifera* L.) в Україні за результатами зимівлі 2016–2017 рр. в рамках міжнародного моніторингу. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2018. Т. 10(1). С. 37–46. doi: 10.31861/biosystems.2018.01.037
 18. Francoso E., de Souza Araujo N., Ricardo P. C., Santos P. K. F. et al. Evolutionary perspectives on bee mtDNA from mito-OMICS analyses of a solitary species. *Apidologie*. 2020. Vol. 51. P. 531–544. doi:10.1007/s13592-020-00740-x
 19. Hailu T. G., D'Alvise P., Tofilski A., Fuchs S. et al. Insights into Ethiopian honey bee diversity based on wing geomorphometric and mitochondrial DNA analyses. *Apidologie*. 2020. Vol. 51. P. 1182–1198 doi: 10.1007/s13592-020-00796-9
 20. Henriques D., Chavez-Galarza J., Quaresma A., Neves C. J. et al. From the popular *tRNA^{Leu}-COX2* intergenic region to the mitogenome: insights from diverse honey bee populations of Europe and North Africa. *Apidologie*. 2019. Vol. 50. P. 215–229. doi: 10.1007/s13592-019-00632-9
 21. Higgins D. G., Bleasby A. J., Fuchs R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. *Bioinformatics*. 1992. Vol. 8 (2). P. 189–191. doi:10.1093/bioinformatics/8.2.189
 22. Hristov P., Shumkova R., Georgieva A., Sirakova D. et al. Methods for genotyping of the honey bee (*Apis mellifera* L.: Hymenoptera: Apidae) in Bulgaria. — In: I. Y. Abdurakhmonov (Ed.) Genotyping. *Intech-Open*. 2018. doi: 10.5772/intechopen.73306
 23. Ishchenko O. O., Bednarska O. I., Panchuk I. I. Application of 5S ribosomal DNA for molecular taxonomy of subtribe Loliinae (Poaceae). *Cytol. Genet.* 2021. Vol. 55(1). P. 10–18. doi:10.3103/S0095452721010096
 24. Ishchenko O. O., Panchuk I. I., Andreev I. O., Kunakh V. A. et al. Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Deschampsia antarctica*. *Cytol. Genet.* 2018. Vol. 52. P. 416–421. doi: 10.3103/S0095452718060105
 25. Layat E., Probst A.V., Tourmente S. Structure, function and regulation of transcription factor IIIA: from *Xenopus* to *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. Vol. 1829(3-4). P. 274-282. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.10.013
 26. Madella S., Grubbs K., Alburaki M. Non-invasive genotyping of honey bee queens *Apis mellifera* L.: Transition of the Dral mtDNA *COI-COII* test to *in silico*. *Insects*. 2020. Vol. 12. P. 19. doi: 10.3390/insects12010019
 27. Martins C., Galetti P. M. Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes? *Genetica*. 2001. Vol. 111. P. 439–446 doi: 10.1023/a:1013799516717
 28. Morton D. G., Sprague K. U. In vitro transcription of a silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. Vol. 81(17). P. 5519–5522 doi: 10.1073/pnas.81.17.5519
 29. Muñoz I., De la Rúa P. Wide genetic diversity in Old World honey bees threaten by introgression. 2021. *Apidologie*. Vol. 52(1). P. 200–217. doi: 10.1007/s13592-020-00810-0
 30. Nelson D. W., Linning R. M., Davison P. J., Honda B. M. 5'-flanking sequences required for efficient transcription *in vitro* of 5S RNA genes, in the related nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Gene*. 1998. Vol. 218. P. 9–16 doi: 10.1016/s0378-1119(98)00392-8
 31. Roshka N. M., Cherevatov O. V., Volkov R. A 5S ribosomal DNA of peach blossom *Thyatira batis* L. *Sci. Herald Chernivtsi Univ., Biol. (Biol. Syst.)*. 2020. Vol. 12(1). P. 20–25. [In Ukrainian] / Рошка Н. М., Череватов О. В., Волков Р. А. 5S рДНК Совковидки рожевої *Thyatira batis* L. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2020. Т. 12(1). С. 20–25.
 32. Roshka N. M., Cherevatov O. V., Volkov R. A. Molecular organization and polymorphism of 5S rDNA in Carpathian bees. *Cytol. Genet.* 2021. Vol. 55 (5). P. 405-413. doi:10.3103/S00954527-21050108
 33. Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH*. 1988. doi:10.1007/978-3-642-72649-1
 34. Ruttner F. *Naturgeschichte der Honigbienen. Munich: Ehrenwirth, Germany*. 1992.
 35. Schiebelhut L. M., Abboud S. S., Gómez Daglio L. E., Swift H. F. et al. A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses. *Mol. Ecol. Res.* 2017. Vol. 17(4). P. 721–729. doi:10.1111/1755-0998.12620
 36. Sharp S. J., Garcia A. D. Transcription of the *Drosophila melanogaster* 5S RNA gene requires an

- upstream promoter and four intragenic sequences elements. *Mol. Cell Biol.* 1988. Vol. 8(3). P. 1266–1274. doi: 10.1128/mcb.8.3.1266-1274.1988
37. Simon L., Rabanal F. A., Dubos T., Oliver C. et al. Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46(6). P. 3019–3033. doi:10.1093/nar/gky163
 38. Statna A. P., Cherevatov O. V., Volkov R. A. Molecular organization and evolution of 5S ribosomal DNA of *Sphinx ligustri*. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine.* 2014. Vol. 11(2). P. 276–282. [In Ukrainian] / Статна А. П., Череватов О. В., Волков Р. А. Молекулярна організація та еволюція 5S рибосомної ДНК *Sphinx ligustri*. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* 2013. Т. 11(2). С. 276–282.
 39. Tyler B. M. Transcription of *Neurospora crassa* 5S rRNA genes requires a TATA box and three internal elements. *J. Mol. Biol.* 1987. Vol. 196. P. 801–811. doi:10.1016/0022-2836(87)90406-2
 40. Tynkevich Y., Nevelska A., Chorney I., Volkov R. Organization and variability of the 5S rDNA intergenic spacer of *Lathyrus venetus*. *Bull. Vavilov Soc. Genet. Breed. Ukraine.* 2015. Vol. 13(1). P. 81–87. [in Ukrainian] / Тинкевич Ю. О., Невельська А. О., Чорней І. І., Волков Р. А. Організація та мінливість міжгенного спейсера 5S рДНК *Lathyrus venetus*. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів.* 2015. Т. 13(1). С. 81–87.
 41. Tynkevich Y. O., Volkov R. A. 5S ribosomal DNA of distantly related *Quercus* species: molecular organization and taxonomic application. *Cytol. Genet.* 2019. Vol. 53(6). P. 459–466. doi:10.3103/S0095452719060100
 42. Utzeri V. J., Ribani A., Taurisano V., Banqué C., Fontanesi L. Distribution of the main *Apis mellifera* mitochondrial DNA lineages in Italy assessed using an environmental DNA approach. *Insects.* 2021. Vol. 12. P. 620. doi:10.3390/insects12070620
 43. Vierna J., Wehner S., Höner zu Siederdissen C., Martínez-Lage A. et al. Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity.* 2013. Vol. 111. P. 410–421. doi:10.1038/hdy.2013.63
 44. Vizoso M., Vierna J., González-Tizón A. M., Martínez-Lage A. 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. *J. Heredity.* 2011. Vol. 102(4). P. 433–447. doi:10.1093/jhered/esr046
 45. Vozarova R., Herklotz V., Kovařík A., Tynkevich Y. O. et al. Ancient origin of two 5S rDNA families dominating in the genus *Rosa* and their behavior in the Canina-type meiosis. *Front. Plant Sci.* 2021. Vol. 12. Art. 643548. P. 1–15. doi: 10.3389/fpls.2021.643548

MOLECULAR ORGANIZATION OF 5S RIBOSOMAL DNA OF APIS MELLIFERA LIGUSTICA

N. M. Roshka, A. R. Volkova, I. I. Panchuk

Yuriy Fedkovych Chernivtsi National University
Kotsiubynski str. 2, 58012, Chernivtsi, Ukraine
e-mail: i.panchuk@chnu.edu.ua

Aim. 5S rDNA belongs to the moderately repeated, tandemly arranged sequences composed of coding regions and intergenic spacers (IGS). The IGS comparison is successfully used for the study of microevolution and in the molecular taxonomy of plants, vertebrates and some invertebrates. However, 5S rDNA of insects still remains insufficiently characterized. In this article, we analyze the molecular organization and polymorphism of 5S rDNA IGS of *Apis mellifera ligustica*. **Methods.** DNA extraction, PCR amplification, cloning of 5S rDNA, sequencing, bioinformatics analysis. **Results.** The 5S rDNA IGS of *A. m. ligustica* was cloned into the plasmid vector and sequenced. The obtained sequences were compared with the same genomic region of *A. m. carnica*. It was found that the genome of *A. m. ligustica* contains one class of IGS, which is represented by structural subclasses 1A, 1B, 1G and 1F. Two of these subclasses, 1G and 1F, which are identified here for the first time, are specific for *A. m. ligustica*. **Conclusions.** The obtained results show a high intra- and intergenomic polymorphism of 5S rDNA within the subspecies of *Apis mellifera*.

Keywords: 5S rDNA, intergenic spacer, repeated sequences, *Apis mellifera*, Apidae.