УДК 577.29:595.787 *https://doi.org/10.31861/biosystems2020.01.020*

5S РИБОСОМНА ДНК СОВКОВИДКИ РОЖЕВОЇ *THYATIRA BATIS* L.

Н. М. РОШКА, О. В. ЧЕРЕВАТОВ, Р. А. ВОЛКОВ

Кафедра молекулярної генетики та біотехнології,
Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
вул. Коцюбинського 2, м. Чернівці, 58012
e-mail: r.volkov@chnu.edu.ua

Ділянки геному, які кодують 5S рибосомну РНК, становлять зручне джерело молекулярних маркерів. Ці ділянки геному складаються з тандемно організованих повторюваних одиниць. До складу кожної одиниці входять високо консервативна ділянка, яка кодує 5S рРНК, та мінливий міжгенний спейсер (МГС). В межах МГС містяться регуляторні елементи, які беруть участь в транскрипції 5S рДНК. З огляду на те, що 5S рДНК зустрічаються в геномах всіх еукаріот, ця ділянка може бути використана як універсальна модель для вивчення молекулярної еволюції у різних таксонах. Молекулярно-генетичні дослідження Лускокрилих (Lepidoptera) завжди становили значний практичний інтерес, оскільки велика кількість представників цієї групи є шкідниками сільськогосподарських культур. Відповідно, результати таких досліджень в подальшому можуть бути використані для створення молекулярних паспортів та коректної ідентифікації комах-шкідників. Враховуючи, що молекулярна організація та поліморфізм 5S рДНК все ще залишаються недослідженими у видів родини Drepanidae, метою нашої роботи було дослідити 5S рДНК представника цієї родини – совковидки рожевої (Thyatira batis L.). Повторювану одиницю 5S рДНК ампліфікували за допомогою ПЛР, а отримані фрагменти ДНК лігували в плазмідний вектор. Плазміди, які містили вставки, сиквенували. Виявлено, що у 5S рДНК T. batis зустрічаються два варіанти МГС довжиною 75 та 120 нп, рівень подібності між якими становить лише 32%. Отже, T. batis має найменші за розміром МГС 5S рДНК серед всіх досліджених на сьогодні лускокрилих. В межах МГС було знайдено декілька варіантів мікросателітних послідовностей. У довгому варіанті МГС в позиції -22 присутній TATA-подібний мотив, який ймовірно може брати участь в ініціації транскрипції, тоді як у короткому варіанті МГС цей мотив було втрачено внаслідок делеції.

Ключові слова: 5S рДНК, міжгенний спейсер, молекулярна еволюція, повторювані послідовності, Thyatira batis, Lepidoptera.

Вступ. Генетичні дослідження лускокрилих (Lepidoptera) становлять значний практичний інтерес, оскільки велика кількість представників цієї групи є шкідниками сільськогосподарських культур (Goodarzi et al., 2015; Pickett et al., 2017; Szanyi et al., 2015). Дослідження метеликів на молекулярно-генетичному рівні може бути використане для створення молекулярних паспортів для ідентифікації комах-шкідників. На сьогодні у молекулярній таксономії комах – зокрема, лускокрилих – використовують ділянки мітохондріального геному, ядерної 45S рДНК та деяких ядерних генів, що кодують білки (Arimoto and Iwaizumi, 2016; Chen et al., 2019; Cherevatov et al., 2019; Janzen et al. 2017; Kim et al., 2017; Li et al., 2019; Shapoval and Lukhtanov, 2015; Shapoval and Lukhtanov, 2017; Song et al. 2016; Tóth and Lakatos, 2018; Wen et al., 2015; Yang et al., 2017). Водночас, організація та еволюція 5S рДНК лускокрилих все ще залишаються майже невивченими.

Ділянки геному, які кодують 5S рРНК (5S рДНК), являють собою популярний інструмент для вивчення закономірностей молекулярної еволюції та таксономії у еукаріот (Cioffi et al., 2010; Grimm et al., 2010; Pinhal at al., 2011). 5S рДНК є представником тандемно організованих середньо повторюваних послідовностей. До складу повторюваної одиниці 5S рДНК входять кодувальна ділянка та міжгенний спейсер (МГС) (Perina et al., 2011; Vierna et al., 2013). Розмір кодувальної ділянки, як правило, становить 120 нп. Ця ділянка є консервативною, тобто високо подібною навіть у віддалених таксонів. В той же час МГС є мінливим, як за послідовністю нуклеотидів, так і за довжиною, і може показувати різницю вже на міжвидовому або міжпопуляційному рівні (Grimm et al., 2010).

У наших попередніх публікаціях було описано організацію 5S рДНК у кількох представників надродин Papilionoidea (Череватов, Волков, 2010; Череватов, Волков, 2011; Cherevarov and Volkov, 2011; Череватов та ін., 2012) та Bombycoidea (Статна та ін., 2013). У цій статті ми наводимо результати аналізу молекулярної будови повторюваної ділянки 5S рДНК представника родини Drepanidae – совковидки (пухоспинки) рожевої (*Thyatira batis* L.), широко розповсюдженого шкідника малини та ожини (Szanyi et al., 2015).

Матеріали та методи. В якості матеріалу для дослідження був використаний екземпляр метелика *T. batis*, відловлений в околицях міста Чернівці. Загальна ДНК з тіла метелика була екстрагована згідно зі стандартним протоколом (Панчук та Волков, 2007). Для ампліфікації досліджуваної ділянки методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) використовували праймери RV0803 (5`-CAT AGC GGC CGC GTG GTC AGT ACT TGG ATG GGT GA-3`) та RV0902 (5`-GAT CGC GGC CGC CGT GTT TTT AAT GTG GTA TGG ACG TTG-3`), комплементарні до кодувальної ділянки 5S рДНК. Місця гібридизації праймерів було обрано так, щоб досягти ампліфікації повного МГС та суміжних фрагментів кодувальної ділянки. Отримані ПЛР-продукти лігували в вектор pJET 1.2, використовуючи набір реактивів CloneJET PCR Cloning Kit, (Thermo Fisher Scientific, США). Колонії із рекомбінантними плазмідами виявляли за резистентністю до ампіциліну. Плазміди, які містили вставки 5S рДНК, сиквенували на фірмі GATC (Німеччина). Первинну обробку розшифрованих послідовностей проводили за допомогою комп'ютерних програм Chromas та DNASTAR. Вирівнювання послідовностей здійснювали методом Clustal V (Higgins et al., 1991).

Результати та їх обговорення. Електрофоретичний аналіз отриманих ПЛР-продуктів показав, що в результаті ампліфікації досліджуваної ділянки утворюються фрагменти ДНК, розмір яких становить приблизно 300 та 350 пн, відповідно. Це свідчить про наявність в геномі *T. batis* щонайменше двох варіантів повторів 5S рДНК. Цей результат підтримує наші попередні дані, що у Лускокрилих можуть зустрічатись декілька класів 5S рДНК, які відрізняються довжиною (Череватов та Волков, 2010; Cherevatov and Volkov, 2011; Череватов та ін., 2012).

Отримані ПЛР-продукти клонували у плазмідний вектор, після чого було ідентифіковано шість рекомбінантних плазмід зі вставкою. Для подальшого сиквенування було відібрано два клони, Thbat-C1 та Thbat-C4, які містили рекомбінантні вставки різного розміру.

В результаті аналізу отриманих послідовностей було показано, що досліджені клони містять МГС 5S рДНК, який з обох боків фланкований фрагментами послідовності кодувальної ділянки та використаними для ПЛР праймерами. Загальна характеристика клонів Thbat-C1 та Thbat-C4 наведена в табл. 1.

Встановлено, що сумарна довжина фланкуючих МГС фрагментів кодувальної ділянки (включаючи послідовність ПЛР-праймерів) в обох клонах складає 112 нп. Враховуючи, що при застосуванні використаних праймерів 8 нп у центральній частини кодувальної ділянки залишаються неампліфікованими, можна стверджувати, що загальний розмір ділянки, яка кодує 5S рРНК у *T. batis* становить 120 нп.

Таблиця 1.
Характеристика МГС 5S рДНК Thyatira batis.

Table 1.
Characterization of the 5S rDNA intergenic spacer (IGS) of Thyatira batis.

Назва клону	**МГС**	
	Довжина, нп	**Вміст GC пар, %**
Thbat-C1	75	36,0
Thbat-C4	120	23,3

Визначення меж кодувальних послідовностей дозволило встановити розміри МГС клонів: 75 та 120 нп (табл. 1). Порівняння з попередніми дослідженнями 5S рДНК у Лускокрилих показало, що такі розміри міжгенного спейсера відрізняються від типових для представників родин Nymphalidae та Lycaenidae, для яких розмір МГС коливається в межах 181-237 нп (Череватов та Волков, 2010; Череватов та ін., 2012). Отже, *T. batis* має найменші за розміром МГС 5S рДНК серед всіх досліджених на сьогодні Лускокрилих.

Порівняння послідовностей досліджених клонів показало дуже низький рівень подібності між ними – 32%. Така суттєва різниця в послідовностях пов'язана з тим, що у МГС меншого розміру мали місце чисельні делеції. Крім того, короткий та довгий МГС *T. batis* відрізняються кількома точковими замінами (рис. 1).

Аналіз послідовностей МГС виявив численні тринуклеотидні повторювані мотиви ATT та TTT. Такі мотиви були раніше знайдені у МГС 5S рДНК інших метеликів (Череватов та Волков, 2010). Крім того, було також показано, що в геномі шовкопряда *Bombyx mori* такі послідовності належать до найбільш розповсюджених мікросателітів (Morton and Sprague, 1984).

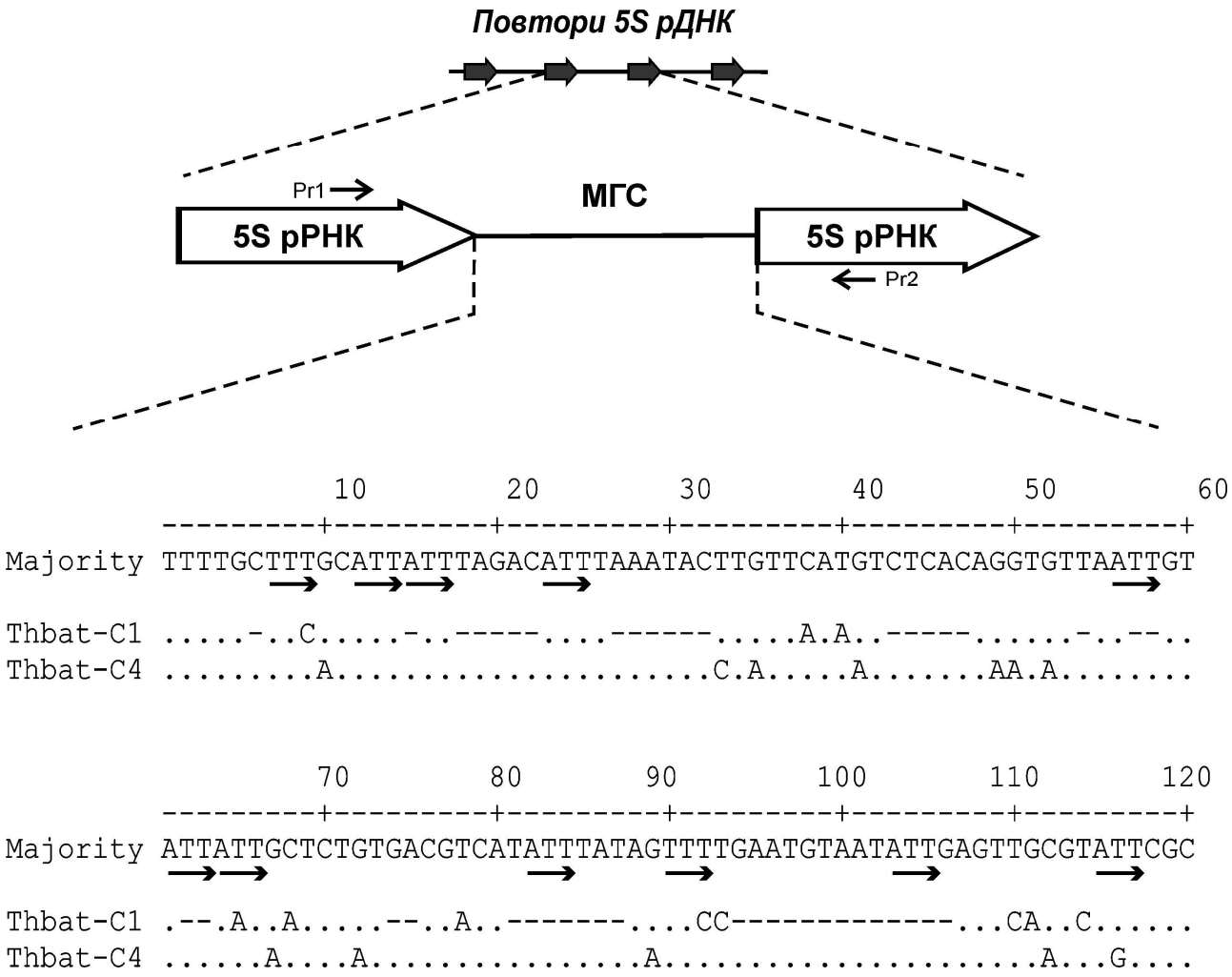

Рис. 1. Структурна організація МГС 5S рДНК Thyatira batis. Pr1 та Pr2 – праймери RV0803 та RV0902, відповідно. Стрілками вказано розташування мікросателітних послідовностей ATT/TTT. Скорочення назв клонів та їх характеристики наведено у табл. 1.

Fig. 1. Structural organization of the 5S rDNA IGS of Thyatira batis. Pr1 and Pr2 – primers RV0803 and RV0902. Arrows indicate the location of microsatellites repeats ATT/TTT. The abbreviation of clone names and their characteristics are shown in the table 1.

Окрім того, послідовності МГС *T. batis* аналізувались на наявність потенційних сигналів, задіяних у транскрипції 5S рДНК, а саме – зовнішніх елементів промотора. У рослин такі елементи є відносно консервативними та мають чітко визначене положення (Simon et al., 2018; Souza et al., 2019), в той час як для комах, зокрема для метеликів, їх розташування не встановлено. Раніше було показано, що у булавовусих метеликів структурні підкласи 5S рДНК містять різні послідовності у положенні від -27 до -20 пн перед кодувальною ділянкою (Череватов та Волков, 2010; Статна та ін., 2013), де у рослин знаходиться необхідний для ініціації транскрипції ТАТА-бокс (Simon et al., 2018; Souza et al., 2019). Для отриманих нами клонів спостерігається аналогічна ситуація. В МГС клону Thbat-C1 у позиції -22 до -18 міститься ТАТА-подібний мотив ТААТА, в той час як у клону Thbat-C4 в цій позиції сталась делеція. Отримані результати наводять на думку про те, що регуляторні елементи, які містяться в МГС метеликів, можуть суттєво відрізнятись як у різних видів, так і між різними структурними класами 5S рДНК в межах одного геному.

Висновки. Встановлено, що в геномі *T. batis* присутні щонайменше два варіанти МГС 5S рДНК, які суттєво відрізняються між собою як за послідовністю, так і за довжиною. В межах МГС було знайдено мікросателітні послідовності ATT/TTT. У довгому варіанті МГС в позиції -22 присутній ТАТА-подібний мотив, який ймовірно може брати участь в ініціації транскрипції, тоді як у короткому варіанті МГС в цій ділянці сталась нуклеотидна делеція довжиною 13 нп.

Список літератури:

1. Панчук І.І., Волков Р.А. Практикум з молекулярної генетики // Чернівці, Рута. – 2007. – 120 с.

2. Статна А.П., Череватов О.В., Волков Р.А. Молекулярна організація та еволюція 5S рибосомальної ДНК *Sphinx ligustri* // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. - 2013. – Т. 11, № 2. – С. 276-282.
3. Череватов О.В., Волков Р.А. Молекулярна організація 5S рибосомальної ДНК *Polyommatus icarus* // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 2. – С. 271-278.
4. Череватов О.В., Волков Р.А. Молекулярна організація 5S рДНК *Satyrus drias* (Lepidoptera) // Доп. НАН України. – 2011. – № 1. – С. 140-145.
5. Череватов О.В., Статна 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.
6. Arimoto M., Iwaizumi R. PCR-RFLP analysis of the ITS2 region to identify Japanese *Lymantria* species (Lepidoptera: Lymantriidae) // Appl. Entomol. Zool. – 2016. – Vol. 51. – P. 63-70. doi: 0.1007/s13355-015-0371-6
7. Chen L., Huang J.-R., Dai J. et al. Intraspecific mitochondrial genome comparison identified CYTB as a high-resolution population marker in a new pest *Athetis lepigone* // Genomics. – 2019. – Vol. 111, Is. 4. – P. 744-752. doi:10.1016/j.ygeno.2018.04.013
8. Cherevatov O.V., Volkov R.A. Organization of 5S ribosomal DNA of *Melitaea trivia* // Cytol. Genet. – 2011. – Vol. 45, Is. 2. – P. 416-421. doi: 10.3103/S0095452711020034.
9. Cherevatov O.V., Panchuk I.I., Kerek S.S., Volkov R.A. Molecular diversity of the *COI–COII* spacer region in the mitochondrial genome and the origin of the Carpathian Bee // Cytol. Genet. – 2019. – Vol. 53, Is. 4. – P. 276-281. doi: 10.3103/S0095452719040030.
10. Cioffi M., Martins C., Bertollo L. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish // BMC Evol. Biol. - 2010. – Vol. 10. – P. 1-9. doi: org/10.1186/1471-2148-10-271
11. Goodarzi M., Fathipour Y., Talebi A. Antibiotic resistance of canola cultivars affecting demography of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) // J. Agr. Sci. Tech. – 2015. – Vol. 17. – P. 23-33.
12. Grimm G., Denk T. The reticulate origin of modern plane trees (*Platanus*, Platanaceae): A nuclear marker puzzle // Taxon. – 2010. – Vol. 59, Is.1. – P. 134-147.
13. Higgins D.G., Bleasby A.J., Fuchs R. CLUSTAL V: Improved software for multiple sequence alignment // Comput. Appl. Biosci. – 1992. – Vol. 8. – P. 189- 191. doi: 10.1093/bioinformatics/8.2.189
14. Janzen D., Burns J., Cong Q. et al. Nuclear genomes distinguish cryptic species suggested by their DNA barcodes and ecology // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2017. – Vol. 114, Is. 31. – P.8313-8318. doi: 10.1073/pnas.1621504114
15. Kim S., Lee W., Lee S. Estimation of a new molecular marker of the genus *Stathmopoda* (Lepidoptera: Stathmopodidae): Comparing EF1a and COI sequences // J. Asia-Pacific Entom. – 2017. – Vol. 20. – P. 269-280. doi:10.1016/j.aspen.2016.12.002
16. Li Y., Zhu J., Ge C. et al. Molecular phylogeny and historical biogeography of the butterfly tribe Aeromachini Tutt (Lepidoptera: Hesperiidae) from China // Cells. – 2019. – Vol. 8. – P. 294-306. doi: org/10.3390/cells8040294
17. 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. – P. 5519–5522.
18. Perina A., Seoane D., Gonzalez-Tizon A. et al. Molecular organization and phylogenetic analysis of 5S rDNA in crustaceans of the genus *Pollicipes* reveal birth-and-death evolution and strong purifying selection // BMC Evol. Biol. – 2011. – Vol. 11. – P. 1-11.
19. Pickett B., Gulzar A., Ferre J., Wright D. *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin resistance in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) // Appl. Environ. Microbiol. – 2017. – Vol. 83, Is. 9. – P. 1-9.
20. Pinhal D., Yoshimura T., Araki C., Martins C. The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays // BMC Evol. Biol. – 2011. – Vol. 11. – P. 1-14. doi:org/10.1186/1471-2148-11-151
21. Shapoval N., Lukhtanov V. Intragenomic variations of multicopy ITS2 marker in *Agrodiaetus* blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae) // Comp. Cytogenet. – 2015. – Vol. 9, Is. 4. – P. 483-497. doi:10.3897/CompCytogen.v9i4.5429
22. Shapoval N., Lukhtanov V. Chromosomal identification of cryptic species sharing their DNA barcodes: *Polyommatus (Agrodiaetus) antidolus* and *P. (A.) morgani* in Iran (Lepidoptera, Lycaenidae) // Comp. Cytogenet. – 2017. – Vol. 2, Is. 4. – P. 759-768. doi: 10.3897/CompCytogen.v11i4.20876
23. Simon L., Rabanal F., Dubos T. et al. Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana* // Nucl. Acids Res. – 2018. – Vol. 46, Is. 6. – P. 3019-3033.
24. Song W., Cao L.-J., Wang Y.-Z. et al. Novel microsatellite markers for the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) and effects of null alleles on population genetics analyses // Bull. Entom. Res. – 2016. – Vol. 107, Is. 3. – P. 349-358 doi:10.1017/S0007485316000936
25. Souza T., Gaeta M., Martins C., Vanzela A. IGS sequences in *Cetrum* present AT-and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA // Mol. Biol. Reports. – 2019. – P. 1-12.
26. Szanyi S., Nagy A., Molnar A. et al. Pest species of Macrolepidoptera in the game reserve of Velyka Dobron` (Transcarpathia, Ukraine) // J. Argic. Scien. – 2015. – Vol. 65. – P.58-64.
27. Toth V., Lacatos F. Phylogeographic pattern of the plane leaf miner, *Phyllonorycter platani* (STAUDINGER, 1870) (Lepidoptera: Gracillariidae) in Europe // BMC Evol. Biol. – 2018. – Vol. 18. – P. 1-12.
28. Vierna J., Wehner S., Siederdissen H. et al. Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans // Heredity. – 2013. – Vol.111. – P. 410-421.
29. Wen T., Zha L., Xiao Y. et al. *Metacordyceps shibinensis* sp. nov. from larvae of Lepidoptera in Guizhou Province, southwest China // Phytotaxa. –

2015. – Vol. 226, Is. 1. – P. 51-62. doi: 10.11646/phytotaxa.226.1.5.
30. Yang Y., Wu Z., Xu H. et al. Structural characterization and applications of ITS2 from rice leaffolders *Cnaphalocrocis medinalis* and *Marasmia patnalis* (Lepidoptera: Pyralidae) // J. Asia-Pacific Entom. – 2017. – Vol. 20. – P. 313-318.

References:

1. Panchuk II, Volkov RA. A practical course in molecular genetics. Chernivtsi, Ruta. 2007; 120 p.
2. Statna AP, Cherevatov OV, Volkov RA. Molecular organization and evolution of 5S ribosomal DNA of *Sphinx ligustri*. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2013; 11 (2): 276-282.
3. Cherevatov OV, Volkov RA. Molecular organization of 5S ribosomal DNA of *Polyommatus icarus. The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2010; 8 (2): 271-278.
4. Cherevatov OV. Volkov RA. Molecular organization of 5S rDNA of *Satyrus drias* (Lepidoptera). *Reports of the NAS of Ukraine*. 2011; 1: 140-145.
5. Cherevatov OV, Statna AP, Volkov RA. Novel structural subclass of *Lycaena tityrus* 5S ribosomal DNA. *The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine*. 2012; 10 (2): 202-207.
6. Arimoto M, Iwaizumi R. PCR-RFLP analysis of the ITS2 region to identify Japanese *Lymantria* species (Lepidoptera: Lymantriidae). *Appl. Entomol. Zool*. 2016; 51: 63-70. doi: 0.1007/s13355-015-0371-6
7. Chen L, Huang J-R, Dai J. et al. Intraspecific mitochondrial genome comparison identified CYTB as a high-resolution population marker in a new pest *Athetis lepigone*. *Genomics*. 2019; 111 (4): 744-752. doi:10.1016/j.ygeno.2018.04.013
8. Cherevatov OV, Volkov RA. Organization of 5S ribosomal DNA of *Melitaea trivia*. *Cytol. Genet*. 2011; 45 (2): 416-421. doi: 10.3103/S0095452711020034.
9. Cherevatov OV, Panchuk II, Kerek SS, Volkov RA. Molecular diversity of the *COI–COII* spacer region in the mitochondrial genome and the origin of the Carpathian Bee. *Cytol. Genet*. 2019; 53 (4): 276-281. doi: 10.3103/S0095452719040030.
10. Cioffi M, Martins C, Bertollo L. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evol. Biol*. 2010; 10: 1–9. doi: org/10.1186/1471-2148-10-271
11. Goodarzi M, Fathipour Y, Talebi A. Antibiotic resistance of canola cultivars affecting demography of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Agr. Sci. Tech*. 2015; 17: 23-33.
12. Grimm G, Denk T. The reticulate origin of modern plane trees (*Platanus*, Platanaceae): A nuclear marker puzzle. *Taxon*. 2010; 59 (1): 134-147.
13. Higgins DG, Bleasby AJ, Fuchs R. CLUSTAL V: Improved software for multiple sequence alignment. *Comput. Appl. Biosci*. 1992; 8: 189-191. doi: 10.1093/bioinformatics/8.2.189
14. Janzen D, Burns J., Cong Q. et al. Nuclear genomes distinguish cryptic species suggested by their DNA barcodes and ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017; 114 (31): 8313-8318. doi: 10.1073/pnas.1621504114
15. Kim S, Lee W, Lee S. Estimation of a new molecular marker of the genus *Stathmopoda* (Lepidoptera: Stathmopodidae): Comparing *EF1a* and *COI* sequences. *J. Asia-Pacific Entom*. 2017; 20: 269-280. doi:10.1016/j.aspen.2016.12.002
16. Li Y, Zhu J, Ge C. et al. Molecular phylogeny and historical biogeography of the butterfly tribe Aeromachini Tutt (Lepidoptera: Hesperiidae) from China. *Cells*. 2019; 8: 294-306. doi: org/10.3390/cells8040294
17. Morton DG, Sprague KU. In *vitro* transcription of a silkworm 5S RNA gene requires an upstream signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984; 81: 5519–5522.
18. Perina A, Seoane D, Gonzalez-Tizon A. et al. Molecular organization and phylogenetic analysis of 5S rDNA in crustaceans of the genus *Pollicipes* reveal birth-and-death evolution and strong purifying selection. *BMC Evol. Biol*. 2011; 11: 1-11.
19. Pickett B, Gulzar A, Ferre J, Wright D. *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa toxin resistance in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol*. 2017; 83 (9): 1-9.
20. Pinhal D, Yoshimura T, Araki C, Martins C. The 5S rDNA family evolves through concerted and birth-and-death evolution in fish genomes: an example from freshwater stingrays. *BMC Evol. Biol*. 2011; 11: 1-14. doi:org/10.1186/1471-2148-11-151
21. Shapoval N, Lukhtanov V. Intragenomic variations of multicopy ITS2 marker in *Agrodiaetus* blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae). *Comp. Cytogenet*. 2015; 9 (4): 483-497. doi:10.3897/CompCytogen.v9i4.5429
22. Shapoval N, Lukhtanov V. Chromosomal identification of cryptic species sharing their DNA barcodes: *Polyommatus (Agrodiaetus) antidolus* and *P. (A.) morgani* in Iran (Lepidoptera, Lycaenidae). *Comp. Cytogenet*. 2017; 2 (4): 759-768. doi: 10.3897/CompCytogen.v11i4.20876
23. Simon L, Rabanal F, Dubos T. et al. Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res*. 2018; 46 (6): 3019-3033.
24. Song W, Cao L-J, Wang Y-Z. et al. Novel microsatellite markers for the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) and effects of null alleles on population genetics analyses. *Bull. Entom. Res*. 2016; 107 (3): 349-358. doi:10.1017/S0007485316000936
25. Souza T, Gaeta M, Martins C, Vanzela A. IGS sequences in *Cetrum* present AT-and GC-rich conserved domains, with strong regulatory potential for 5S rDNA. *Mol. Biol. Reports*. 2019; 1-12.
26. Szanyi S, Nagy A, Molnar A. et al. Pest species of Macrolepidoptera in the game reserve of Velyka Dobron` (Transcarpathia, Ukraine). *J. Argic. Scien*. 2015; 65: 58-64.
27. Toth V, Lacatos F. Phylogeographic pattern of the plane leaf miner, *Phyllonorycter platani*

(STAUDINGER, 1870) (Lepidoptera: Gracillariidae) in Europe. *BMC Evol. Biol*. 2018; 18: 1-12.
28. Vierna J, Wehner S, Siederdissen H. et al. Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity*. 2013; 111: 410-421.
29. Wen T, Zha L, Xiao Y. et al. *Metacordyceps shibinensis* sp. nov. from larvae of Lepidoptera in Guizhou Province, southwest China. *Phytotaxa*. 2015; 226 (1): 51-62. doi: 10.11646/phytotaxa.226.1.5.
30. Yang Y, Wu Z, Xu H. et al. Structural characterization and applications of ITS2 from rice leaffolders *Cnaphalocrocis medinalis* and *Marasmia patnalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Asia-Pacific Entom*. 2017; 20: 313-318.

5S RIBOSOMAL DNA OF PEACH BLOSSOM *THYATIRA BATIS* L.

N. M. Roshka, V. O. Cherevatov, R. A. Volkov

Genomic regions encoding 5S ribosomal RNA represent a convenient source of molecular markers. These genomic regions are composed of tandemly organized repeated units. Each unit consists of a highly conserved 5S rRNA coding region and a variable intergenic spacer (IGS). Within the IGS, regulatory elements involved in 5S rDNA transcription are located. Given that 5S rDNA is present in the genomes of all eukaryotes, this region can be used as a universal model to study molecular evolution in different taxa.Molecular studies of Lepidoptera have always been of considerable practical interest, because this group includes a large number of crop pests. Accordingly, the results of molecular studies can be used for molecular genotyping and correct identification of insect pests. Taking into account that the molecular organization and polymorphism of 5S rDNA remain still unexplored in species of the Drepanidae family, the aim of our work was to investigate the 5S rDNA of peach blossom (Thyatira batis L.), a representative of this family. The repeated unit of 5S rDNA was amplified by PCR, and the obtained DNA fragments were ligated into a plasmid vector. Plasmids containing the inserts were sequenced. It was found that two variants of IGS, 75- and 120-bp-long, respectively, are present in the 5S rDNA of T. batis, and the level of similarity between them amounts to 32% only. Therefore, T. batis possess the smallest size of the 5S rDNA IGS among all lepidopterans studied to date. Within the IGS, several variants of microsatellite sequences were found. In the long variant of the IGS in the position -22 bp a TATA-like motif was identified, which may be involved in transcription initiation, whereas in the short variant of the IGS this motif was lost due to deletion.

Keywords: 5S rDNA, intergenic spacer region, molecular evolution, repeated sequences, Thyatira batis, Lepidoptera

Отримано редколегією 02.03.2020