

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОРОД ПЧЕЛЫ МЕДОНОСНОЙ (*APIS MELLIFERA* L.) ЮГО-ВОСТОКА БЕЛАРУСИ

А.Н. ЛЫСЕНКО, Е.М. КУРАК, Г.Г. ГОНЧАРЕНКО

УО «Гомельский государственный университет имени Ф.Скорины», г.Гомель, Беларусь

e-mail: lysenko_an@mail.ru

*В работе охарактеризованы разработанные и апробированные молекулярно-генетические методы идентификации породного состава особей *A. mellifera*. Подобраны праймеры для амплификации спейсерного участка COI-COII мтДНК. Определены параметры ПЦР-анализа, позволяющие получать ампликон COI-COII для породоспецифической идентификации *A. mellifera*. Показано, что разработанные ДНК-технологии позволяют проводить идентификацию пород *A. mellifera**

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: APIS MELLIFERA, ПОРОДНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ, МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ГЕНОМ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, СПЕЙСЕРНЫЙ УЧАСТОК, АМПЛИФИКАЦИЯ.

Введение. В связи со сложившимися экономическими условиями в агропромышленном комплексе численность пчелиных семей сокращается. Медовая продуктивность семей пчёл находится на очень низком уровне около 12-15 кг от одной семьи [17, 20]. Низкая продуктивность пчелиных семей связана с изменением структуры сельскохозяйственных угодий и медоносных ресурсов. Происходит уменьшение посевов продовольственных и кормовых энтомофильных растений. Все это негативно влияет на пчеловодство. Для содержания и разведения медоносных пчёл в условиях Юго-востока Беларуси требуется специфическая технология, основанная на знаниях биологии пчелиной семьи и в соответствующая местным медосборным условиям [22]. Высокая продуктивность пчелиных семей достигается в результате чистопородного разведения с учетом свойственного каждой породе пчел комплекса экстерьерных и хозяйственно-полезных признаков [16, 24]. Интенсивная межпородная гибридизация пчел приводит к снижению их зимостойкости и устойчивости к болезням и вредителям [15, 19, 25].

На сегодняшний день единственным эффективным способом контроля достоверности происхождения и идентификации пчел является генетическое тестирование, основанное на использовании молекулярно-генетических маркеров. В качестве маркеров используются ядерные микросателлиты и митохондриальные (мтДНК) последовательности ДНК. Особенностью мтДНК, как маркера, является ее однородительское наследование: мтДНК передается по материнской линии. Скорость мутаций в мтДНК примерно в 10–20 раз больше, чем в ядерной ДНК. При этом накапливаются преимущественно селективно-нейтральные изменения, вносящие свой вклад в полиморфизм мтДНК [5]. Благодаря особенностям наследования и изменчивости, мтДНК широко и успешно используется в различных исследованиях по эволюции и филогении пчел [9, 10, 11], в анализе популяционной структуры и филогеографии вида [1, 2, 3]; в анализе гибридизации, интрогрессии митохондриального генома, последствий интродукции и акклиматизации [4, 7]. На современном этапе развития популяционной биологии исследования по мтДНК широко используются при идентификации породной принадлежности пчел [21].

Материалы и методы. Для анализа методов выделения общей и митохондриальной ДНК пчел нами было проведено: вскрытие особей *A. mellifera* с выделением из них грудных мышц, а затем последующее выделение ДНК.

Выделение суммарной ДНК методом фенольной экстракции. Экстракция. Полученный биологический материал поместили в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую гидролизирующий экстрагирующий буфер следующего состава: 100 мМ раствор Трис, 0,005 М EDTA, 1 % SDS (рН буфера 7,8), 25 мг протеиназы К и инкубировали при 37 °С всю ночь. **Осаждение ДНК.** 1) Пробу ДНК смешивали с равным объемом фенола или смеси фенол – хлороформ в полипропиленовой пробирке с пластмассовой крышкой. 2) Содержимое пробирки размешивали до образования эмульсии. 3) После этого центрифугировали при 1600x g в течение 3 мин при комнатной температуре. 4) Верхний водный слой переносили в новую полипропиленовую пробирку. Промежуточную фазу и нижнюю органическую фазу отбрасывали. Добавляли равный объем смеси фенола и хлороформа (1:1). Повторяли стадии 2–4. Добавляли равный объем хлороформа, и повторяли стадии 2–4. **Очистка препарата ДНК.** Супернатант сливали, а полученный осадок ДНК промывали 1000 мкл 65 % этанола, охлажденного до минус 10 °С. После промывания содержимое пробирки центрифугировали при 15000x g (T = 4 °С) в течение 10 мин. Повторяли процедуру промывки 2-3 раза для удаления из осадка остатков EDTA. **Лиофилизация препарата ДНК.** После промывки этанолом пробирку размещали в штативе горизонтально и, открыв

крышки, просушивали осадок ДНК в течение 30-40 мин ($T = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) до полного испарения этанола. *Растворение препарата ДНК.* Высушенный осадок растворяли в 30 мкл бидистиллированной и деионизированной воды при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. ДНК хранили при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ для дальнейшего анализа [18].

Выделение суммарной ДНК упрощенным СТАВ-методом. Экстракция и гомогенизация. Образец помещали в центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл, содержащую 400 мкл экстрагирующего буфера ($T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$) следующего состава: 2 % р-р СТАВ; 0,1 М раствор Трис; 1,4 М раствор хлорида натрия; 20 мМ раствор Трилона Б (рН буфера 8,0). Используя прокаленные стеклянные пестики, гомогенизировали материал при комнатной температуре в течение 30-40 с. Затем пробирку с образцом закрывали и перемешивали содержимое на вихревом смесителе ($400\text{-}600\text{ мин}^{-1}$) в течение 5 с. После этого пробирку помещали на водяную баню и инкубировали в течение 60 мин при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. *Очистка гомогенатов.* После экстракции пробирку охлаждали до комнатной температуры, и к образцу добавляли 400 мкл смеси хлороформа. Содержимое перемешивали на вихревом смесителе (200 мин^{-1}) в течение 2 мин при комнатной температуре. Далее центрифугировали при $13000\times g$ ($T=18\text{-}20\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. *Осаждение ДНК.* По окончании центрифугирования пипеткой отбирали 350 мкл супернатанта и переносили в другую центрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и добавляли 300 мкл охлажденного изопропанола, оставляли на 20 мин, после чего центрифугировали при $13000\times g$ ($T=18\text{-}20\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 20 мин. Полученный осадок промывали двукратно 500 мкл 65 % этанола, охлажденного до минус $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. После промывания содержимое пробирки центрифугировали при $15000\times g$ ($T=4\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 10 мин. *Лиофилизация препарата ДНК.* После промывки этанолом пробирку размещали в штативе горизонтально и, просушивали осадок ДНК в течение 30-40 мин ($T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$) до полного испарения этанола. *Растворение препарата ДНК.* Высушенный осадок растворяли в 100 мкл бидистиллированной и деионизированной воды во встряхивающей ванне (200 мин^{-1}) при $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. ДНК хранили при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Результаты. Одно из основных условий сохранения генофонда – его четкая идентификация [6], которая тем точнее, чем совершеннее метод ее проведения. Первоначально для идентификации пчел анализировали только морфометрические признаки. Современная морфометрическая классификация *A. mellifera* основывается на работах Гетце, Алпатова и Ратнера [8, 13, 14]. Однако выяснилось, что эти методы часто не позволяют точно идентифицировать подвиды из-за сильной зависимости морфометрических характеристик пчел от условий окружающей среды и уровня внутривидовой гибридизации.

В настоящее время большинство исследователей стало переходить на использование молекулярных маркеров, дающих однозначно интерпретируемые результаты. Разработка полимеразной цепной реакции (PCR) в 80-х годах [12] сделала возможным изучение полиморфизма ДНК и привела к революции в области молекулярной биологии. Основная идея PCR заключается в многократном увеличении (амплификации) определенного фрагмента ДНК с использованием праймеров, ограничивающих этот фрагмент, что позволяет проводить анализ, пользуясь минимальным числом биологического материала.

Характеристика маркерного спейсерного участка COI-COII митохондриального генома *A. mellifera*. Митохондриальный геном *A. mellifera* полностью просеквенирован [20]. Он представлен кольцевой молекулой размером 16343 пар нуклеотидов и локализован внутри митохондриального матрикса. В мтДНК пчел обнаружено 13 белковых генов, 22 гена транспортной РНК и 2 гена субъединиц рибосом. Митохондриальный геном характеризуется большим содержанием АТ-нуклеотидов, большое количество которых было выявлено в спейсерном участке мтДНК, локализованном между генами COI и COII. Известно, что участок, расположенный между ними, образован последовательностью гена тРНК^{Leu} и сложными повторами (рис. 1) [1].

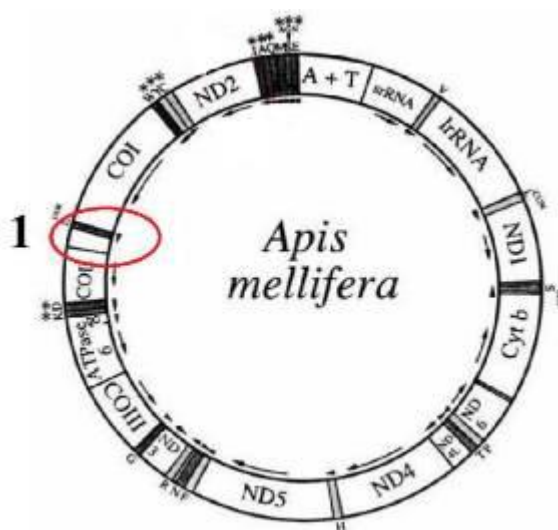


Рисунок 1 – Кольцевая митохондриальная ДНК *A. mellifera* (1 - межгенный локус COI-COII мтДНК)

У представителей среднерусской породы межгенный участок имеет комбинацию RQQ и содержит около 600 п.н., тогда как у представителей южных пород (кавказской и карпатской) имеется единственный элемент Q, и локус COI-COII содержит 350 п.н., что легко разделяется при электрофорезе [23]. Таким образом, этот маркер может быть

использован для различения особей среднерусской породы от карпатской и кавказской пород.

Конструирование праймеров для выявления маркерного спейсерного участка COI-COII митохондриального генома *A. mellifera*, позволяющего проводить породную идентификацию пчел. Целью разработки условий ПЦР-анализа была идентификация подвидов *A. mellifera* с использованием одной праймерной системы. Подходящая пара праймеров для выявления пород пчелы медоносной разрабатывалась нами, используя в качестве маркера спейсерный участок COI-COII митохондриальной ДНК ввиду его вариабельности у различных подвидов *A. mellifera*. Для конструирования праймеров использовалась информация о нуклеотидных последовательностях вида *A. mellifera* взятых нами из GenBank. Регистрационный номера в GenBank КТ164631.1.

При конструировании оптимальных праймеров для выявления маркерного спейсерного участка COI-COII мтДНК *A. mellifera* L. необходимо учитывать два главных параметра: 1) необходимо составлять такие праймеры, чтобы они лежали в консервативной области между генами COI и COII, образованной последовательностью гена тРНК_{Leu} и сложными повторами; 2) необходимо подбирать праймеры таким образом, чтобы выходить на однораундный ПЦР-анализ.

Последовательность нуклеотидов ДНК спейсерного межгенного участка COI-COII мтДНК *A. mellifera* L. представлена ниже (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank ID: EF688132.1).

```
CACATTTAGAAATTCCATTATGAATGAAAAATTTAAATTT 40
AAAATCAATTTTAAATGAAAAATTTAATATGGCAGAATAAG 80
TGCATTTGAACSTTAAGATTCAAATATAAAGTATTTTTTAAC 120
TTTTATGAAAAATGAAATAAATTAATATAAAATATAAATTAAT 160
ATTTATGAAAAATTTAATTTATGAAAAATTTTCCACTTAATTT 200
CATTTTAAATTTAAAAATATAAATGAAATATCAATTTTAAAT 240
AAAATAAATAAATTAATTTTATTTTATATTGAATTTTAAA 280
TTCAATCTTAAAGATTTAATCTTTTTATGAAAAATTAATAA 320
ATGAAATATAAAAAATAAAASAAAATATAASAAAATATATTT 360
TATGAAAAATTTAATTTATGAAAAATTTCCCACTTAATTCAT 400
TTGAAATTTAAAAATAAATTAATAAACAATTTTGAATAAAA 440
TAAATAATTAATTTTATTTTATATTGAATTTTAAATTTCA 480
ATCTTAAAGATTTAATCTTTTTATGAAAAATTAATAAATTA 520
ATATAAAAAATAAAASAAAATATAASAAAATATATTTATTA 560
AAATTTAATTTATGAAAAATTTCCACATGATTCATATTTAT 600
```

На первом этапе разработки ДНК-диагностической системы при выявлении специфичных участков ДНК для идентификации пород пчел необходимо было построить прямой праймер, который позволил бы начать амплификацию участка COI и соответственно весь спейсерный участок. После достраивания комплементарной цепочки 3'-5' выбрали в ней участок, которому будет комплементарен прямой праймер (Fw) следующего состава: 5'-CACATTTAGAAATTCATTA-3'

На втором этапе нами был сконструирован обратный праймер (Rv) из 20 нуклеотидов, следующего состава: 5'-АТАААТАТАААТСАТГТГГА-3'.

Таким образом, сконструированная нами пара праймеров позволяет амплифицировать участок ДНК размером в 600 нуклеотидов.

Этапы амплификации маркерного спейсерного участка COI-COII мтДНК *A.mellifera* с полученными праймерами. ПЦР проводили в объеме 25 мкл. В пронумерованные реакционные ПЦР-пробирки Ахуген (США), объемом 0,6 мл вносили смесь, содержащую: 2,5 мкл dNTP, по 1 мкл каждого праймера, 2,5 мкл 1x Taq Buffer, 1 мкл Taq-polymerase, 16 мкл Milli-Q Water, 1 мкл исследуемой ДНК. Тщательно перемешивали пипетированием и затем сверху наслаивали 25 мкл минерального масла для ПЦР. После чего пробирки помещали в амплификатор.

ПЦР проводили на амплификаторе Терцик.

После серии проведенных экспериментов были установлены оптимальные термопрофили, позволяющие амплифицировать фрагмент мтДНК *A. mellifera*, содержащий 3'-область гена цитохромоксидазы I, ген тРНК_{leu}, р-элемент и q-элемент (сложные повторы) и 5'-конец гена цитохромоксидазы II. Параметры оптимальных термопрофилей приведены ниже:

1 цикл	94 ⁰ С3 мин
30 циклов	94 ⁰ С45 с
	58 ⁰ С.....30 с
	72 ⁰ С60 с
1 цикл	72 ⁰ С.....5 мин
Хранение	10 ⁰ С.....∞

После амплификации полученный раствор с множественными копиями выделенного гена сохраняли в морозильной камере ($t \approx -20^0\text{C}$).

Выявление ампликонов проводили с помощью электрофореза в горизонтальной камере SE-1 Helicon. Электрофоретическое фракционирование проводилось с использованием ТАЕ буфера в 2 % агарозном геле с последующей окраской бромистым этидием. Электрофорез проводили в течение 45-60 минут при напряженности электрического поля 240 В. Визуализацию ампликонов после электрофореза проводили с помощью облучения полученных агарозных гелевых пластин ультрафиолетом (длина волна 360 нм) на специальных установках.

Электрофоретическое выявление ампликонов маркерного спейсерного участка COI-COII мтДНК *A.mellifera*

На рисунке 2 представлена электрофореграмма продуктов амплификации мтДНК с праймерами COI-COIFw/ COI-COIRv.

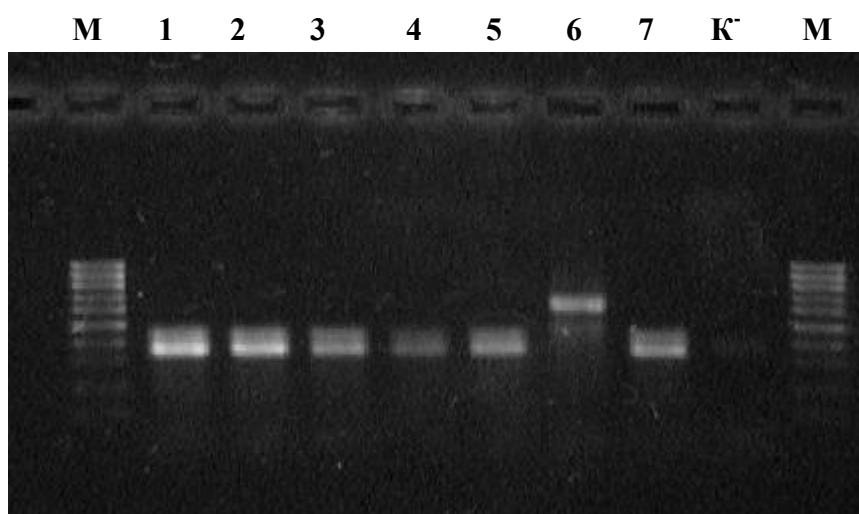


Рисунок 2 - Электрофорез продуктов ПЦР межгенного локуса COI-COII мтДНК особей пчелы медоносной:

М-маркер молекулярных масс, К⁻ - отрицательный контроль; 1-5,7 – элемент Q (фрагмент мтДНК размером 350 п.н.); 6 – элемент PQQ (фрагмент мтДНК размером 600 п.н.).

Хорошо видно, что полученные ампликоны имеют размеры величиной 350 н.п. (характерны для южных карпатской и кавказской пород) и 600 н.п. (характерен для среднерусской породы).

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были подобраны оптимальные условия ПЦР-анализа и сконструированы праймеры для выявления маркерного спейсерного участка COI-COII мтДНК пчелы медоносной, позволяющего идентифицировать породы *A. mellifera*.

Исследования проводились в рамках темы ГБЦМ 16-32 «Разработка методов для ДНК-идентификации пород и оценки состояния генофондов популяций медоносных пчел Юго-востока Беларуси» (№20160676).

Список использованных источников:

1. Avise, J.C. Molecular markers, natural history and evolution / J.C. Avise // N.Y.: Chapman and Hall. – 1994. – 511p.
2. Avise J.C. Phylogeography: The history and formation of species / J.C. Avise // Cambridge MA: Harvard Univ. – 2000. 447 p.

3. Bernatchez, L. Comparative phylogeography of nearctic and palearctic fishes/ L. Bernatchez, C.C. Wilson // Mol. Ecol. – 1998. – Vol. 7. – P. 431-452.
4. Billington, N. Mitochondrial DNA diversity of fishes and its implication for introductions / N. Billington , P.D.H. Hebert // Can. J. Fisch. Aquat. Sci. – 1991. – Vol. 48. – P. 80-94.
5. Brown, W.M. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution / W.M. Brown, E.M. Prager, A. Wang // J. Mol. Evol. - 1982. - Vol. 18. – P. 225–239.
6. Daly, H.V. Identification of Africanized honeybees in the western hemisphere by discriminant analysis / H.V. Daly, S.S. Ballings // J. Kans. Entomol. Soc. – 1978. – Vol 51. – P. 857-869.
7. Fontaine, P.M. A genetic test of metapopulation structure in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites / P.M. Fontaine, J.J. Dodson, L. Bernatchez, A. Slettan // Can. J. Fish. Aquat. Sci. – 1997. – Vol. 54. – P. 2434-2442.
8. Goetze, G.K. Die beste biene. Liedloff, Loth and Michaelis. / G.K. Goetze. Germany. Leipzig. – 1940. – 200 p.
9. Harrison, R.G. Animal mitochondrial DNA as a genetics marker in population and evolutionary biology / R.G. Harrison // Trends Ecol. Evol. – 1989. – Vol. 4. – P. 6-11.
10. Ingman, M. Mitochondrial genome variation and origin of modern humans / M. Ingman, H. Kaessmann, S. Paabo, U. Gyllensten // Nature. – 2000. – Vol. 180. – P . 326-329.
11. Kocher, T.O. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers / T.O. Kocher [et. al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. US. – 1989. – Vol. 86. – P. 6196-6200.
12. Mullis, K.B. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. / K.B. Mullis [et al.] // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. – Vol. 51. – P. 263-273.
13. Ruttner, F. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. / F.Ruttner, L.Tassencourt, J.Louveaux // Apidologie. – 1978. – V.9 (4). – P. 363–381.
14. Алпатов, В.В. Породы медоносной пчелы / В.В. Алпатов. М.: МОИСП, 1948. – 183 с.
15. Биладш, Г.Д. Селекция пчел. / Г.Д. Биладш, Н.И. Кривцов. М.: ВО Агропромиздат, 1991. – 303с.
16. Бойценюк Л. Выбор породы / Л. Бойценюк // Пчеловодство. – 2008. - №7. - С.7-9.
17. Методы проведения научно-исследовательских работ в пчеловодстве / А.В. Бородачев [и др.]. – Рыбное, издат. НИИП, 2006. – 154 с.

18. Гончаренко, Г.Г. ДНК-диагностика *Opisthorchis felineus* по ITS2-последовательностям в промежуточных хозяевах–моллюсках-битиниях / Г.Г. Гончаренко, А.Н. Лысенко, А.В. Катохин // Веснік Мазырскага дзяржаўнага педагагічнага ўніверсітэта імя ІІ Шамякіна. – 2012. - №1(34). – С. 30-36
19. Кривцов, Н.И. Пчеловодство. / Н.И. Кривцов. М.: 1999. – С.24
20. Кривцов, Н.И. Состояние генофонда среднерусских пчел / Н.И. Кривцов // Пчеловодство. – 2005. – № 3. – С. 12.
21. Монахова, М.А. Медоносная пчела *Apis mellifera* в генетическом поле / М.А. Монахова, И.И. Горячева, Н.И. Кривцов // Пчеловодство. 2007. – №4. – С.10–12.
22. Неручев, В.М. Пчелы Белорусского полесья / В.М. Неручев // Пчеловодство. – 1968. – №9. – С. 10.
23. Николенко, А.Г. Полиморфизм локуса COI-COII митохондриальной ДНК медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на Южном Урале / А.Г. Николенко, А.В. Постряков // Генетика. – 2002. – № 4. – С. 458–462.
24. Черевко, Ю.А. Гетерозис при чистопородном разведении пчел / Ю.А. Черевко // Пчеловодство. – 1995. – №2. – С.17–19.
25. Черевко, Ю.А. Чистопородное разведение и доходность в пчеловодстве / Ю.А. Черевко, Л.Д. Черевко // Пчеловодство. 1998. – №4. – С.14–16.

Molecular genetic methods for identification species of honey bees (*Apis mellifera* L.) in South-East of Belarus

A.N. Lysenko, E.M. Kurak, G.G. Goncharenko

KEY WORDS: APIS MELLIFERA, SPECIES IDENTIFICATION, MITOCHONDRIAL GENOME, MOLECULAR GENETIC MARKERS, SPACER, AMPLIFICATION

Described developed and validated molecular-genetic methods for identification of species composition of individuals *A. mellifera*. Was selected primers for the amplification spacer COI-COII mtDNA. Was defined PCR analysis parameters, allowing to receive amplification products of COI-COII for the breedspecific identification of *A. mellifera*. Was shown, that developed DNA-technologies allow to accurately identify breeds of *A. mellifera*.