

Видовая идентификация особей близких видов шмелей с использованием митохондриального гена COI

Г.Г. ГОНЧАРЕНКО, С.А. ЗЯТЬКОВ

В ходе исследования были проанализированы особенности и применимость метода ПЦР-ПДРФ в качестве быстрого, дешевого и надежного инструмента для идентификации двух близких видов шмелей *Bombus terrestris* L. и *B. lucorum* L. Кроме того, приведена последовательность диагностического участка митохондриального гена субъединицы 1 цитохромоксидазы с (COI) и последовательность праймеров оптимальная для ДНК-диагностики данных видов.

Ключевые слова: шмели, *Bombus*, ПЦР-ПДРФ, COI, ДНК-идентификация.

The features and applicability of the PCR-RLFP method as a fast, cheap and reliable tool for identifying two closely related bumblebee species *Bombus terrestris* L. and *B. lucorum* L are analyzed. In addition, the sequence of the diagnostic site of the mitochondrial gene of cytochrome oxidase c (COI) subunit 1 and the sequence of primers is optimal for DNA diagnostics of these species.

Keywords: bumblebees, *Bombus*, PCR-RLFP, COI, DNA-identification.

Шмели наряду с пчелами являются основными опылителями цветковых растений и сельскохозяйственных культур и в три раза превосходят пчел по этим показателям, поэтому распространено их коммерческое разведение [1]. Для преодоления инбридинга, который происходит при разведении, используют особей из естественных популяций, при этом важна точная генотипическая и видовая идентификация представителей рода *Bombus*. В последние годы для этой задачи используются методы ДНК-анализа митохондриальных генов [2]–[6]. В связи с этим целью данной работы было проанализировать применимость ПЦР-ПДРФ метода на основе митохондриального гена субъединицы 1 цитохромоксидазы с (COI) для видовой идентификации особей близких видов шмелей *Bombus terrestris* L. и *B. lucorum* L.

Шмель земляной большой (*B. terrestris*) распространён на юге Беларуси и в последние годы широко используется как эффективный опылитель в тепличных хозяйствах. Что касается близкого вида – Шмеля земляного малого, норového (*B. lucorum*), то он также часто встречается в природных популяциях и ареалы этих двух видов частично пересекаются.

Для анализа отлавливались особи из природных популяций обоих видов, причем для исследования брали как рабочих особей, так маток и самцов. Затем отпрепарированные биологические образцы, полученные из грудных мышц и конечностей представителей рода *Bombus* Юга Беларуси, подвергали выделению суммарной ДНК. Для выделения ДНК [7] из грудных мышц оптимальным оказался упрощенный СТАВ-метод, а из конечностей – SDS-метод и метод с использованием ионно-обменной смолы Chelex 100.

```
3721 gaggtaaaaa agaaaccttt ggaaatttaa gaataattta tgctatatta ggaattggat
3781 ttttaggttt tattgtttga gctcatcata tatttactgt aggattagac gttgatacac
3841 gagcatattt tacatcagct acaataatta ttgccgtacc tacaggaatt aaagttttta
3901 gatgattagc aacatatcat gggtcaaaaa taaatttcaa tattacaatt atctgatcaa
3961 ttggattc●at tttaatattt acaattggag gattaactgg tgtaatactt tctaattcat
4021 caatcgatat tattttacat gatacatact atgtagtagg tcattttcac tatgttttat
4081 caataggagc agtttttgca attatttcaa gaattattca ttgattc●cca ataattacag
4141 gtttaataat aaatcaaaaa tgattaaaaa ttcaatt
```

Рисунок 1 –Фрагмент мтДНК *B. terrestris* размером 446 н.п., содержащий сайты рестрикции (выделено) для рестриктазы Hinf I и фланкирующие его участки прикрепления праймеров (подчеркнуто)

Построение праймеров базировалось на мтДНК *B. terrestris* (GenBank: NC_045179) [2]. Праймеры были разработаны для амплификации фрагмента митохондриального гена COI величиной 446 н.п. (рисунок 1) от 3732 до 4177 нуклеотида (GenBank: NC_045179).

Прямой: (COI_M2F) 5'-GAAACSTTTGGAAATTTAAGA-3';

обратный: (COI_End1R) 5'-AATTGAATTTTGAATCATTTTGA-3'.

После амплификации полученные образцы инкубировали с рестриктазой Hinf I [4], [6] с последующим электрофорезом в 1,5 % агарозном геле (рисунок 2).

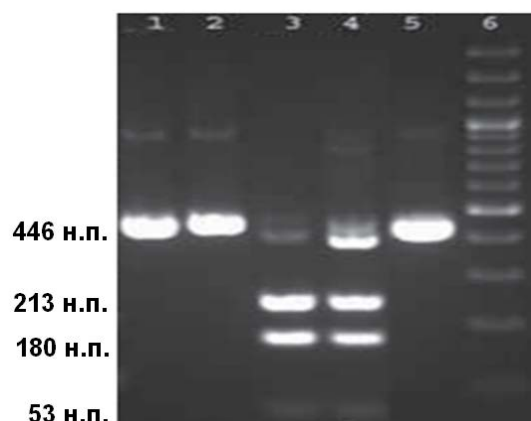


Рисунок 2 – Гаплотипы фрагмента COI мтДНК (446 п.н.) после обработки рестриктазой Hinf I.
1, 2, 5 – *Bombus lucorum*; 3, 4 – *B. terrestris*; 6 – Маркер

На рисунке 2 хорошо видно, что после разрезания рестриктазой Hinf I образцы *B. lucorum* представлены одной фракцией величиной 446 н.п., в то время как *B. terrestris* – тремя фракциями величиной 213, 180 и 53 н.п., соответственно. Это обусловлено тем, что в месте узнавания рестриктазы Hinf I присутствует диагностический сайт (на рисунке 1 обведен в квадрат): у *B. terrestris* он представлен цитозином, а у *B. lucorum* – тимином.

Таким образом, показано, что ПЦР-ПДРФ является быстрым, относительно дешевым и надежным инструментом для идентификации двух близких видов шмелей Юга Беларуси *B. terrestris* и *B. lucorum*.

Работа проводилась в рамках темы ГПНИ 21-14, выполняемой в рамках Государственной программы «Природные ресурсы и окружающая среда».

Литература

1. Perrigault, M. Alternative to honeybees. *Bombus* : rearing and use [in pollination] (Alternatives a l'abeille domestique. Les bourdons: elevage et utilisation) / M. Perrigault // Abeilles et Cie (Belgium). – 1999. – Vol. 64. – P. 23–24.
2. Murray, T. E. Cryptic species diversity in a widespread bumblebee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs / T. E. Murray, Ú. Fitzpatrick, M. J. F. Brown, R. J. Paxton // Conservation Genetics. – 2008. – Vol. 9. – P. 653–666.
3. Carolan, J. C. Colour Patterns Do Not Diagnose Species : Quantitative Evaluation of a DNA Bar-coded Cryptic Bumblebee Complex / J. C. Carolan [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, iss. 1. – P. 1–10.
4. Vesterlund, S.-R. Molecular identification of cryptic bumblebee species from degraded samples using PCR-RFLP approach / S.-R. Vesterlund, J. Sorvari, A. Vasemägi // Molecular Ecology Resources. – 2013. – Vol. 14, iss. 1. – P. 122–126.
5. Cejas, D. Unveiling introgression in bumblebee (*Bombus terrestris*) populations through mitogenome-based markers / D. Cejas [et al.] // Anim. Genet. – 2019. – Vol. 51 (1). – P. 70–77.
6. Зяцьков, С. А. ПЦР-ПДРФ анализ видов шмелей / С. А. Зяцьков, Г. Г. Гончаренко, А. В. Крук, Е. М. Курак // Биолого-химические и экологические аспекты состояния и развития Полесского региона и сопредельных территорий : сборник научных трудов X Международной научно-практической конф. – Мозырь : МПУ им. И.П. Шамякина, 2022. – С. 42–46.
7. Sambrook, J. Molecular Cloning : a Laboratory Manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, 1989. – 270 p.