

УДК 575+595.79

Г. Г. Гончаренко¹, С. А. Зяцьков²

¹Доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры биологии, УО «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины», член-корреспондент НАН Беларуси, г. Гомель, Республика Беларусь

²Старший преподаватель кафедры биологии, УО «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины», г. Гомель, Республика Беларусь

АНАЛИЗ ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА (SNP) В ГАПЛОТИПАХ МТ-ГЕНА COI У ОСОБЕЙ *B. terrestris* L. И *B. lucorum* L. В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЮГО-ВОСТОКА БЕЛАРУСИ

На основе ПЦР-анализа фрагмента (446 н. п.) гена *mt-COI* в популяциях шмелей юго-востока Беларуси выявлено 3 основных гаплотипа H, L и J у *B. terrestris* и один гаплотип A у *B. lucorum*. Анализ полученных ДНК-последовательностей позволил выявить 26 однонуклеотидных замещений (SNP), что указывает на средний уровень полиморфизма (6 замещений на 100 н.п.) по гену у 2-х видов шмелей. Более 96 % SNP в гаплотипах *mt-COI* не изменяют аминокислотный состав пептидов COI и являются селективно-нейтральными.

Ключевые слова: Шмели, *Bombus*, ПЦР-анализ, *mt-COI*, гаплотипы, выравнивание, SNP.

Введение

В последние годы методы ДНК-анализа митохондриальных генов стали все чаще использоваться как для проведения видовой идентификации, так и для исследования генетической структуры и изменчивости природных популяций, в том числе и хозяйственно значимых видов насекомых. Особенно успешно для решения этих задач используется анализ нуклеотидных последовательностей мт-гена COI, кодирующего субъединицу I митохондриального фермента цитохромоксидазы [1–6].

Цель данной работы – анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в гаплотипах маркерного фрагмента мт-гена COI у особей близких видов шмелей *Bombus terrestris* L. и *B. lucorum* L. в природных популяциях юго-востока Беларуси.

Методы и методология исследования

Шмель земляной большой (*B. terrestris*) распространён на территории всей Республики Беларусь, 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 Беларуси, и ареалы этих двух видов частично пересекаются.

Взрослых особей обоих видов отлавливали в период сезонов 2021–2023 годов в природных популяциях, расположенных на территории Гомельского, Жлобинского и Мозырского районов юго-востока Беларуси. Для молекулярно-генетического исследования брали по 5–10 маток и рабочих особей каждого вида. Затем отпрепарированные биологические образцы, полученные из грудных мышц и конечностей у особей *B. terrestris* и *B. lucorum*, подвергали выделению суммарной ДНК [7]. В ходе выделения ДНК из грудных мышц оптимальным оказался упрощенный СТАВ-метод, а из конечностей – SDS-метод и метод с использованием ионно-обменной смолы Chelex.

После ПЦР-амплификации полученные ампликоны подвергались электрофоретическому фракционированию с использованием трис-борат-ЭДТА (ТВЕ) буфера, pH 8,3 в 1,5 % агарозном геле в течение 40 минут при параметрах тока 240 В, с последующим окрашиванием гелей этидиум бромидом в течение 5 минут. Визуальный анализ полученных фракций ДНК на гелях осуществлялся под ультрафиолетовым светом [6–8].

Результаты исследования и их обсуждение

ПЦР-амплификация фрагмента гена *mt-COI*. При построении праймеров использовалась нуклеотидная последовательность митохондриальной ДНК *B. terrestris*, представленной в международной базе генетических данных National Center for Biotechnology Information, NCBI (GenBank: NC_045179) [9]. Ген, кодирующий субъединицу I митохондриальной цитохромоксидазы имеет размер 1559 нуклеотидных пар (н. п.). Необходимо отметить, что стартовым кодоном в гене *mt-COI* шмелей вместо обычного триплета *atg* является триплет *att*. Замена триплета *atg* на *att* обнаружена и в других группах насекомых [10; 11].

Праймеры были разработаны для ПЦР-амплификации фрагмента митохондриального гена COI величиной 446 н. п. (рисунок 1) с координатами от 790 до 1236 нуклеотида в референсной последовательности *B. terrestris* (GenBank: NC_045179) [9]. Нуклеотидные последовательности сконструированных прямого и обратного праймеров представлена ниже:

прямой: (COI_M2F) 5'-GAAACCTTTGGAAATTTAAGA-3';

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

Процесс ПЦР-амплификации проводили на амплификаторе Терцик (НПО ДНК-Технология). После серии проведенных экспериментов были установлены оптимальные термопрофили, позволяющие амплифицировать маркерный фрагмент митохондриального гена COI (446 н. п.) из тканей *B. terrestris* и *B. lucorum*. Параметры оптимальных термопрофилей представлены в виде таблицы ниже:

1 цикл	95 °C	15 мин
35 циклов	94 °C	30 с
	52 °C	90 с
	72 °C	60 с
1 цикл	72 °C	5 мин
Хранение	20 °C	60 с

Анализ однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в гаплотипах фрагмента mt-COI. На основании проведенного ранее рестрикционного анализа ампликонов фрагмента гена mt-COI было установлено, что особи *B. terrestris* в популяциях юго-востока Беларуси характеризуются наличием трех основных гаплотипов (Н, К, J), тогда как *B. lucorum* – только одним (А) [6]. Как было показано, первые три гаплотипа после рестрикции выявляются в ходе электрофореза в виде спектра, состоящего как из трех фракций величиной 213, 180, 53 н. п. (Н), так и двух фракций величиной 213, 233 н. п. (К) и 393, 53 н. п. (J), в то же время гаплотип А одной величиной – 446 н. п. [6].

Представленные в международной базе NCBI данные по секвенированию митохондриальной ДНК (GenBank: NC_045179) [9] позволили получить нуклеотидные последовательности всех четырех mt-COI гаплотипов. Затем с помощью программы Clustal Omega, находящейся на платформе Европейского института биоинформатики (EMBL's European Bioinformatics Institute) [12], нами было проведено множественное выравнивание ДНК последовательностей. Полученные результаты для четырех гаплотипов *B. terrestris* и *B. lucorum* приведены ниже на рисунке 1.

```

Гаплотип А 790 gaaacctttg gaaatttaag aataatttat gctatattag gaattggatt tttaggattt
Гаплотип Н 790 .....t...
Гаплотип К 790 .....t...
Гаплотип J 790 .....t...

Гаплотип А 850 attgtttgag ctccacatat atttactggt ggattagatg tagatacacg agcatatattt
Гаплотип Н 850 .....t.....a.....c..t.....
Гаплотип К 850 .....t.....a.....c..t.....
Гаплотип J 850 .....t.....a.....c..t.....

Гаплотип А 910 acatctgcta caataattat tgctgtacct acaggaatta aagtttttag atgattagct
Гаплотип Н 910 .....a.....c.....a.....
Гаплотип К 910 .....a.....c.....a.....
Гаплотип J 910 .....a.....c.....a.....

Гаплотип А 970 acatatcatg gttcaaaaat aaattttaat attacaatta tttgatcaat tggattattt
Гаплотип Н 970 .....c.....c.....c...
Гаплотип К 970 .....c.....c.....c...
Гаплотип J 970 .....c.....c.....c...

Гаплотип А 1030 ttaatattha caattggtgg attaactggt gtaatacttt ctaattcttc aattgatatt
Гаплотип Н 1030 .....a.....a.....a...c.....
Гаплотип К 1030 .....a.....a.....a...c.....
Гаплотип J 1030 .....a.....a.....a...c.....

Гаплотип А 1090 attttacatg acacgtatta tgtagttgga cattttcatt atgtattatc tataggagca
Гаплотип Н 1090 .....t.....c..a.....t.....c...t.....a.....
Гаплотип К 1090 .....t.....a..t.....c...t.....a.....
Гаплотип J 1090 .....t.....c..a.....t.....c...t.....a.....

Гаплотип А 1150 gtatttgcta ttattactag aattattcat tgatttcaa taattacagg ttaataata
Гаплотип Н 1150 ..t.....a.....t.a.....c.....
Гаплотип К 1150 ..t.....a.....t.a.....c.....
Гаплотип J 1150 ..t.....a.....t.a.....c.....

Гаплотип А 1210 aatcaaaaat gattaaaaat tcaatt
Гаплотип Н 1210 .....
Гаплотип К 1210 .....
Гаплотип J 1210 .....

```

Рисунок 1 – Множественное выравнивание отсекуированных нуклеотидных последовательностей четырех гаплотипов маркерного фрагмента mt-гена COI у особей *B. terrestris* и *B. lucorum*

Из данных по выравненным нуклеотидным последовательностям четырех гаплотипов фрагмента мт-СОІ у *B. terrestris* и *B. lucorum*, представленным на рисунке 1, хорошо видно, что в целом они различаются по 26 однонуклеотидным замещениям, *SNP* (рисунок 1). Это составляет в среднем около 6 нуклеотидных замещений на 100 нуклеотидов и указывает на относительно средний уровень полиморфизма маркерного фрагмента мт-СОІ у двух видов шмелей в юго-восточных популяциях Беларуси.

Как и следовало ожидать, из полученных данных наиболее обособленным оказался гаплотип А, найденный у шмеля норového *B. lucorum*, поскольку он отличался от других гаплотипов по 23–26 однонуклеотидным замещениям (рисунок 1). Наиболее сходный нуклеотидный состав оказался у гаплотипов Н и J, которые отличались друг от друга только одним нуклеотидным замещением в позиции 1186 (рисунок 1). Диагональная матрица, наглядно демонстрирующая все попарные сравнения однонуклеотидных различий между четырьмя гаплотипами мт-гена СОІ у особей *B. terrestris* и *B. lucorum*, представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Матрица однонуклеотидных различий в четырех встреченных гаплотипах маркерного фрагмента мт-гена СОІ у особей *B. terrestris* и *B. lucorum*

Гаплотипы	Количество однонуклеотидных замещений			
	А	К	Н	J
А				
К	23			
Н	26	3		
J	25	4	1	

Полученные нуклеотидные последовательности в четырех гаплотипах фрагмента мт-гена СОІ у особей *B. terrestris* и *B. lucorum* (рисунок 1) дают возможность оценить влияние нуклеотидных замещений на первичную структуру кодируемых ими аминокислот в белковой субъединице І цитохромоксидазы шмелей (таблица 2).

Из данных, приведенных в таблице 2, следует, что количество однонуклеотидных полиморфных сайтов (*SNP*) в четырех гаплотипах составило 26. При этом в 25 сайтах замещения произошли в третьем положении нуклеотидов в кодонах. Перевод нуклеотидных последовательностей в триплетях в аминокислоты с использованием стандартной таблицы генетического кода [13] показал, что однонуклеотидные мутации в третьем положении кодонов не привели к появлению новых аминокислот в кодируемых ими полипептидах (таблица 2). Иными словами, практически все однонуклеотидные мутации, произошедшие в четырех основных гаплотипах шмелей *B. terrestris* и *B. lucorum*, привели к появлению у них только синонимичных кодонов, не изменяющих аминокислоты.

Исключением является кодон, состоящий из трех нуклеотидов в позициях 1165–1167 (см. таблицу 2). Здесь произошло сразу два замещения – в первом и третьем нуклеотиде кодона. В результате двух мутаций кодон *act* изменился на кодон *tca*. Все это привело к замене аминокислоты *треонин* на аминокислоту *серин* (таблица 2). Но даже в этом случае замена аминокислоты практически не отразится на первичной структуре полипептида субъединицы І цитохромоксидазы, поскольку в радикалах обеих аминокислот располагаются одинаковые спиртовые группы ОН. То есть эти аминокислоты функционально практически одинаковы и не могут изменить ни суммарный заряд полипептида, ни его структуры.

Что касается характеристики мутаций, лежащих в основе однонуклеотидного полиморфизма в гаплотипах мт-СОІ шмелей *B. terrestris* и *B. lucorum*, то 10 мутаций являлись *транзигиями*, тогда как 16 – *трансверзиями*. Это составило 36,5 и 61,5 %, соответственно (таблица 2). Но в целом лишь одна *трансверзия* нуклеотида *a* в *t* в первом положении нуклеотида в кодоне в позиции 1165 гена мт-СОІ привела к замене аминокислоты, что составило менее 4 % от общего количества мутаций (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика *SNP* в исследованных гаплотипах шмелей мт-гена СОІ у особей *B. terrestris* и *B. lucorum*

№ п/п	Позиция нуклеотида в гене	Замена кодона	Позиция в кодоне	Замена аминокислоты	Тип мутации
1	846	<i>gga</i> > <i>ggt</i>	3	Гли	Трансверзия
2	864	<i>cac</i> > <i>cat</i>	3	Арг	Транзигия
3	879	<i>gtt</i> > <i>gta</i>	3	Ала	Трансверзия
4	888	<i>gat</i> > <i>gac</i>	3	Асп	–

Продолжение таблицы 2

5	891	ggt > gta	3	Вал	–
6	915	tct > tca	3	Сер	–
7	933	gct > gcc	3	Ала	Транзиция
8	969	gct > gca	3	Ала	Транверзия
9	996	ttt > ttc	3	Фен	Транзиция
10	1011	att > atc	3	Иле	–
11	1026	ttt > ttc	3	Фен	–
12	1047	ggg > gga	3	Гли	Транверзия
13	1077	tct > tca	3	Сер	–
14	1083	att > atc	3	Иле	Транзиция
15	1101	gac > gat	3	Асп	–
16	1107	tat > tac	3	Тир	–
17	1116	ggt > gta	3	Вал	Транверзия
18	1119	gga > ggt	3	Гли	–
19	1128	cat > cac	3	Гис	Транзиция
20	1134	gta > gtt	3	Вал	Транверзия
21	1140	tct > tca	3	Сер	–
22	1152	gta > gtt	3	Вал	–
23	1158	gct > gca	3	Ала	–
24, 25	1165, 1167	act > tca	1, 3	Тре > Сер	Транверзия, Транверзия
26	1185	ttt > ttc	3	Фен	Транзиция

Примечание – Гли – глицин, Арг – аргинин, Ала – аланин, Асп – аспарагин, Вал – валин, Сер – серин, Фен – фенилаланин, Иле – изолейцин, Тир – тирозин, Гис – гистидин, Тре – треонин.

Исходя из совокупности полученных данных следует, что, несмотря на различия в нуклеотидном составе все четыре гаплотипа у шмелей *B. terrestris* и *B. lucorum* кодируют пептиды субъединицы I цитохромоксидазы с одинаковой первичной структурой аминокислот. И в этом смысле все 26 однонуклеотидных мутаций являются селективно нейтральными (таблица 2). Следовательно, проанализированный нами фрагмент мтСОI в митохондриальной ДНК шмелей является удобным и надежным маркером для проведения видовой идентификации и исследования генетической структуры и изменчивости природных популяций хозяйственно значимых видов шмелей *B. terrestris* и *B. lucorum* на юго-востоке Беларуси.

Заключение

Таким образом, на основе ПЦР-анализа фрагмента (446 н.п.) гена мт-СОI цитохромоксидазы в популяции шмелей юго-востока Беларуси выявлено 3 основных гаплотипа H, L и J у *B. terrestris* и один гаплотип A – у *B. lucorum*. На основе проведенного выравнивания ДНК последовательностей в 4-х гаплотипах с помощью программы Clustal Omega установлено, что они различаются по 26 однонуклеотидным замещениям (SNP), это указывает на средний уровень полиморфизма (6 замещений на 100 н. п.) по гену у 2-х видов шмелей.

Более 96 % однонуклеотидных мутаций в гаплотипах мт-СОI не изменяют аминокислотный состав пептидов в субъединице I цитохромоксидазы и являются селективно-нейтральными.

Работа проводилась в рамках задания «2.05» НИР № 5.6 «Оценка состояния генофондов популяций ценных видов шмелей юга Беларуси на основе методов ДНК-анализа» подпрограммы «Биоразнообразие, биоресурсы, экология» ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда» на 2021–2025 гг.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Pedersen, B. V. European bumblebees (Hymenoptera: Bombini) – phylogenetic relationships inferred from DNA sequences / B. V. Pedersen // *Insect Systematics and Evolution*. – 2002. – Vol. 33. – P. 361–386.
2. Cryptic species diversity in a widespread bumblebee complex revealed using mitochondrial DNA RFLPs / T. E. Murray [et al.] // *Conservation Genetics*. – 2008. – Vol. 9. – P. 653–666.
3. Colour Patterns Do Not Diagnose Species: Quantitative Evaluation of a DNA Barcoded 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. Folmer, O. DNA primers for amplification of mitochondrial oxidase subunit I from metazoan invertebrates / O. Folmer. – *Molec : Mar. Biol*, 1994. – P. 294–299.
6. Гончаренко, Г. Г. Видовая идентификация особей близких видов шмелей с использованием митохондриального гена COI / Г. Г. Гончаренко, С. А. Зятков // *Изв. Гомел. гос. ун-та им. Ф. Скорины*, 2023. – № 3 (138). – С. 116–117.
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.
8. The Mss4 protein is to regulate stress response and apoptosis / B. Walter [et al.] // *Cell Death and Disease*. – 2012. – Vol. 3. – P. 1–10. – doi: 10.1038.
9. NCBI. National Center for Biotechnology Information Search database: *Bombus terrestris terrestris* mitochondrion, complete genome [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/1776687582>. – Date of access: 15.09.2023.
10. Fearnley, I. M. Initiation Codons in Mammalian Mitochondria: Differences in Genetic Code in the Organelle / I. M. Fearnley, J. E. Walker // *Biochemistry*. – 1987. – Vol. 26. – P. 8247–8251.
11. Генетический полиморфизм локуса mt-COI вершинного короледа *Ips acuminatus* Gyll. в белорусских популяциях / С. В. Пантелеев [и др.] // *Сибир. лесной журн.*, 2020. – № 4. – С. 15–29.
12. EMBL's European Bioinformatics Institute [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. – Date of access: 12.09.2023.
13. Гончаренко, Г. Г. Генетическая инженерия / Г. Г. Гончаренко // *Высш. шк.* – Минск, 2005. – 236 с.

Поступила в редакцию 05.04.2024

E-mail: ggoncharenko@gsu.by; zyatkov@gsu.by

G. G. Goncharenko, S. A. Zyat'kov

ANALYSIS OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) IN HAPLOTYPES
OF THE MT-GENE COI IN *B. terrestris* L. AND *B. lucorum* L. IN NATURAL POPULATION
OF SOUTH-EAST OF BELARUS

Based on PCR analysis of a fragment (446 bp) of the mt-COI gene in bumblebee populations in Southeastern Belarus, 3 main haplotypes H, L and J in *B. terrestris* and one haplotype A in *B. lucorum* have been identified. DNA analysis of the obtained sequences has revealed 26 single nucleotide polymorphisms (SNPs), which indicates an average level of polymorphism (6 substitutions per 100 bp) by gene in 2 species of bumblebees. More than 96 % of SNPs in mtCOI haplotypes do not change the amino acid composition of COI peptides and are selectively neutral.

Keywords: Bumblebees, *Bombus*, PCR-analysis, mt-COI, haplotypes, alignment, SNP.