

Генетический полиморфизм микросателлитного локуса B-100 в популяциях шмелей *Bombus terrestris* L.

Г.Г. ГОНЧАРЕНКО, С.А. ЗЯТКОВ, А.В. КРУК

В работе установлены аллельные частоты и гетерозиготность в популяциях шмелей *Bombus terrestris* юго-востока Беларуси на основе анализа микросателлитного локуса B-100. Приведена последовательность праймеров оптимальная для ДНК-анализа микросателлитного локуса B-100.

Ключевые слова: шмели, *Bombus*, ПЦР, локус B-100, микросателлиты, гетерозиготность.

The allelic frequencies and heterozygosity in bumblebee populations of *Bombus terrestris* in the South-East of Belarus were established based on the analysis of the microsatellite locus B-100. The sequence of the primers optimal for DNA analysis of microsatellite locus B-100 is given.

Keywords: bumblebees, *Bombus*, PCR, locus B-100, microsatellites, heterozygosity.

Введение. Микросателлиты представляют собой отрезки ДНК с большим количеством (до ста и выше) tandemно повторяющихся идентичных фрагментов. **Повтором** является короткая последовательность из нескольких (от двух до восьми) пар нуклеотидов [1]. В зависимости от длины повтора микросателлиты подразделяются на локусы с ди-, три-, тетра- и пентануклеотидными повторами. Таким образом, **микросателлитным локусом** называют участок ДНК, содержащий **короткие tandemные повторы** (Short Tandem Repeats, STR).

Необходимо отметить, что с момента открытия микросателлиты были обнаружены у широкого спектра эукариот, включая перепончатокрылых [2], [3]. Микросателлиты, как правило, имеют много аллелей и высокую гетерозиготность у насекомых, что делает их потенциально эффективными маркерами для популяционно-генетических исследований перепончатокрылых [4], [5].

Довольно удобными для исследований оказались микросателлиты с динуклеотидными повторами, которые представляют собой многочисленные повторяющиеся элементы ДНК в геномах многих эукариот [6], [7].

Следует подчеркнуть, что согласно классификации Вебера [8], микросателлиты с динуклеотидными повторами подразделяются на три класса: совершенные (непрерывная последовательность одного типа), несовершенные (состоят из одной или нескольких прерывающихся последовательностей одного и того же типа) и сложные (состоят из совершенных или несовершенных повторов, прерывающихся другими простыми последовательностями) [6]–[8].

Целью данной работы было выявить наиболее удобный динуклеотидный микросателлитный маркер для идентификации генотипов и оценки генетического полиморфизма у особей хозяйственно ценного вида шмелей *B. terrestris* L. в природных популяциях юго-востока Беларуси.

Материалы и методы исследований. Для анализа отлавливались особи из 6 природных популяций Большого земляного шмеля *B. terrestris* расположенных на территории Гомельского, Ветковского, Жлобинского, Мозырского и Лельчицкого районов юго-востока Беларуси. Причем для исследования брали маток и рабочих шмелей. Затем отпрепарированные биологические образцы, полученные из грудных мышц и конечностей *B. terrestris*, подвергали выделению суммарной ДНК. Для выделения ДНК из грудных мышц оптимальным оказался упрощенный СТАВ-метод, а из конечностей – SDS-метод и метод с использованием ионно-обменной смолы Chelex 100 [9]. Все этапы ПЦР-анализа подробно описаны в ранее опубликованных нами работах [10], [11].

Результаты и обсуждение. В ходе проведенного нами анализа ряда микросателлитов наиболее удобным маркером для идентификации особей *B. terrestris* оказался микросателлитный локус **B-100** с динуклеотидным сложным повтором.

На основании проведенных экспериментов была подобрана оптимальная пара праймеров для ПЦР-амплификации и выявления микросателлитного локуса B-100, с мотивом (СТ)₁₂GTC(СТ)₃ для идентификации особей *B. terrestris*, которая представлена ниже:

Прямой: F: 5'- CGTCCTCGTATCGGGCTAAC -3'

обратный: R: 5'- CGTGGAACGTCGTGACG -3'.

Нуклеотидная последовательность локуса B-100 (GenBank: NC_063280) [12], содержащего повторы СТ (выделена цветом) и прилежащие к повторам справа и слева (фланкирующие) последовательности ДНК с указанием мест присоединения праймеров (подчеркнутые участки), представлены на рисунке 1.

```

1  cgtcctcgta tgggctaac tttcttcgta aacttgcgcc atttttccac cgcgtccacc
61 ctttgtgccc tgcctttcca cctctccct cctctctttc tctctctctc tctctctctc
121 tctgtcctct ctttcaaacc agcgtggaaa cgtcgtgacg
  
```

Рисунок 1 – Фрагмент ДНК размером 160 н.п., содержащий (СТ)₁₂GTC(СТ)₃ повторы локуса B-100 и фланкирующие его участки

Из рисунка 1 хорошо видно, что данный аллель локуса B-100 содержит микросателлитный несовершенный динуклеотидный повтор, повторенный 12 + 3 раза. Поэтому формула данного аллеля записывается как (СТ)₁₂GTC(СТ)₃.

Продукты амплификации для последующей идентификации микросателлитов подвергались фрагментному сиквенс-анализу на капиллярном генетическом секвенаторе (анализаторе) 3500 Applied Biosystem (США). В качестве маркера использовался оранжевый маркер масс GeneScan™ 500 LIZ™ (Thermo Fisher). Информация о длине аллелей по исходным данным получена в программе GeneMapper v.4.1 («Applied Biosystems», «Life technologies», США). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы GenAlEx 6.50 [13]. Характерные спектры генотипов микросателлитного локуса B-100 для трех образцов шмелей приведены на рисунке 2.

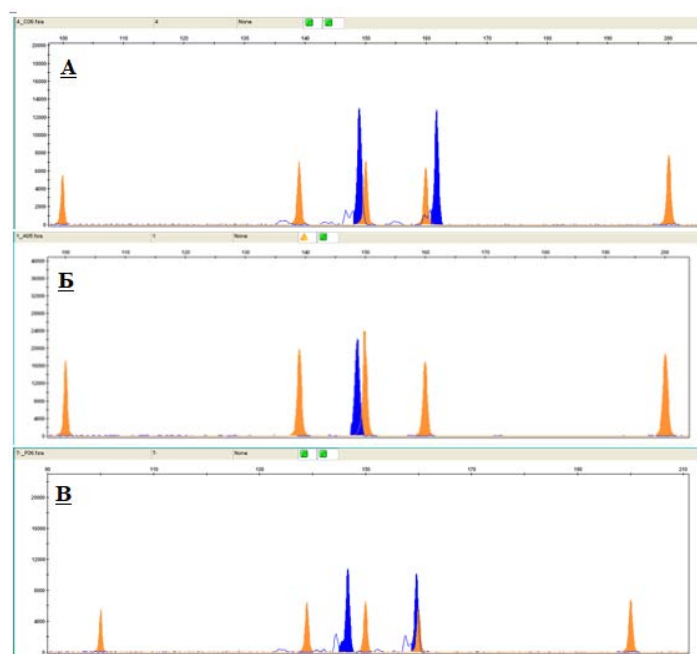


Рисунок 2 – Спектр основных генотипов *B. terrestris* по локусу B-100:

А) 148\162; Б) 148\148; В) 146\160. Электрофоретические маркеры 139, 150, 160, 200 н.п. – оранжевый цвет, STR-локусы – синий

В целом, в ходе анализа 16 особей *B. terrestris* из 6 природных популяций юго-востока Беларуси нами было обнаружено 7 различных аллельных вариантов STR-локуса B-100 (146, 148, 150, 156, 160, 162, 164 н.п.).

Частоты встречаемости 7 аллелей и показатели гетерозиготности в юго-восточных белорусских популяциях шмелей *B. terrestris*, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Аллельные частоты и показатели гетерозиготности по микросателлитному локусу B-100 в популяциях шмелей *B. terrestris*

аллели	146	148	150	156	160	162	164	Но	Не
частоты	0,094	0,655	0,063	0,063	0,063	0,031	0,031	0,313	0,548

Из таблицы 1 хорошо видно, что *преобладающим* для популяций *B. terrestris* юго-востока Беларуси является аллель 148, который встречался с частотой более 65 %. Вторым по частоте встречаемости 9,4 % является аллель 146. Еще 3 аллеля встречались с частотой 6,3 % и 2 аллеля встретились только по одному разу и имели частоту 3,1 % (таблица 1).

Наибольшим аллельным разнообразием обладали популяции Жлобина и Лельчиц – 4 и 3 аллеля, соответственно. Присутствие только одного аллеля в популяциях Ветки и Мозыря объясняется тем, что проанализированные особи из этих популяций оказались гомозиготными по наиболее характерному для юго-востока Беларуси аллелю 148. Следует подчеркнуть, что в европейских популяциях, включая балканские, количество найденных аллелей было выше и составило 14 [14].

Значение средней наблюдаемой гетерозиготности H_o для белорусских популяций в целом составило 0,32, в то время как средняя ожидаемая гетерозиготность H_e равнялась 0,55 (см. таблицу 1). Достоверно меньшее значение показателя наблюдаемой гетерозиготности в проанализированных популяциях *B. terrestris* по сравнению с ожидаемой указывает на наличие инбридинга в этих популяциях. В то же время эта разница в показателях гетерозиготности скорее всего связана с ограниченной выборкой исследованных нами особей в популяциях *B. terrestris* юго-востока Беларуси.

Следует отметить, что в ходе анализа популяций *B. terrestris* с использованием микросателлитного локуса B-100 на Европейском континенте, включая Балканы, Пиренеи и Центральную Европу, было обнаружено 14 аллелей и гетерозиготность по обоим показателям H_o и H_e превышала 60 % [14].

Существенную разницу в показателях гетерозиготности между южно-белорусскими и европейскими популяциями [14] также легче всего объяснить ограниченной выборкой особей проанализированных нами в белорусских популяциях. Однако нельзя исключить и определенную обособленность белорусских популяций *B. terrestris* от европейских. Для окончательного выяснения этого вопроса необходимы расширенные исследования белорусских популяций с привлечением дополнительных микросателлитных локусов и количества особей.

Данная работа проводилась в рамках задания «2.05» НИР № 5.6 программы ГПНИ «Природные ресурсы и окружающая среда» на 2021–2025 гг.

Литература

1. Tautz, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences / D. Tautz // DNA Fingerprinting : State of the Science. – Switzerland : Basel, 1993. – P. 21–28.
2. Estoup, A. Characterization of (GT) n and (CT) n microsatellites in two insect species : *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* / A. Estoup [et al.] // Nucleic Acids Research. – 1993. – Vol. 21, № 6. – P. 1427–1431.
3. Hughes, C. R. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism / C. R. Hughes, D. C. Queller // Mol. Ecol. – 1993. – Vol. 2 (3). – P. 131–137.
4. Queller, D. C. Microsatellites and kinship / D. C. Queller, J. E. Strassmann, C. R. Hughes // Mol. Ecol. – 1993. – Vol. 8 (8). – P. 285–8.
5. Estoup, A. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae) / A. Estoup [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 1995. – Vol. 12 (6). – P. 1074–84.
6. Wintero, A. K. Variable (dG-dT) n (dC-dA) n Sequences in the Porcine Genome / A. K. Wintero, M. Fredholm, P. D. Thomsen // Genomics. – 1992. – Vol. 12. – P. 281–288.

7. Симоненко, В. Н. Структурно-функциональные особенности микросателлитных последовательностей и их использование в изучении генома сельскохозяйственных животных / В. Н. Симоненко, Н. П. Корохов, В. Г. Шевченко // Современные проблемы биотехнологии и биологии продуктивных животных. Сборник научных трудов. – Боровск, 1999. – Т. XXXVIII. – С. 546.
8. Weber, J. L. Mutation of human short tandem repeats / J. L. Weber, C. Wrong // Human Molecular Genetics. – 1993. – Vol. 2. – P. 1123–1128.
9. Sambrook, J. Molecular Cloning : a Laboratory Manual / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. – New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 270 p.
10. Гончаренко, Г. Г. Видовая идентификация особей близких видов шмелей с использованием митохондриального гена COI / Г. Г. Гончаренко, С. А. Зятков // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины. – 2023. – № 3 (138). – С. 116–117.
11. Walter, B. The Mss4 protein is to regulate stress response and apoptosis / B. Walter, C. Nordhoft, G. Goncharenko, S. Ludwig, V. Wixler // Cell Death and Disease. – 2012. – № 3. – e297.
12. NCBI [Electronic resource] // National Center for Biotechnology Information Search database. – Mode of access : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_063280.1/. – Date of access : 14.02.2025.
13. Peakall, R. GenAlEx 6.5 : genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P. E. Smouse // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28 (19). – P. 2537–9.
14. Estoup, A. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe / A. Estoup [et al.] // Mol. Ecol. – 1996. – Vol. 5. – P. 19–31.