

БАЛАШЕНКО Н.А.^{1✉}, СЕМЕНЯК А.А.², КОРНИЛКОВА А.С.¹, СЕНЬКЕВИЧ И.А.²,
ПРИЩЕПЧИК О.В.², ДРОМАШКО С.Е.¹

¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: ninabalashenko@gmail.com

² Научно-практический центр НАН Беларуси по биоресурсам,

Беларусь, 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: irynasenkevich@gmail.com

✉ ninabalashenko@gmail.com, +375 (17) 284-21-90, +375 (25) 668-19-87

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ УЧАСТКА мтДНК ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОДСЕМЕЙСТВА CETONIIDAE

Цель. Описание результатов молекулярно-генетического исследования насекомых – представителей подсемейства Cetoniidae (бронзовки). **Методы.** Для анализа использованы методы малотравматичного забора материала для выделения ДНК, метод полимеразной цепной реакции, секвенирования участка мтДНК гена COI. **Результаты.** Предложена методика забора биологического материала для выделения ДНК из задних ног особей, что позволило не изымать из среды обитания особей наиболее ценных видов, собранных на территории Республики Беларусь. Подготовлена коллекция образцов ДНК представителей подсемейства Cetoniidae. Выявлены гаплотипы *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) и *Protaetia aeruginosa* (Linnaeus, 1767) представителей популяций, обитающих на территории Беларуси. **Выводы.** Обнаружены различия гаплотипов у представителей белорусской и европейской части ареала. **Ключевые слова:** молекулярные маркеры, мтДНК, ДНК-штрихкодирование, насекомые, подсемейство Cetoniidae.

Подсемейство Cetoniidae (бронзовки) является таксоном, проведение охранных мероприятий в отношении которого позволяет сохранять комплекс видов, приуроченных к старым широколиственным лесам. Именно поэтому данному таксону уделяется значительное внимание в Европе. На территории Беларуси обитает 13 видов подсемейства Cetoniidae, 6 из которых внесены в Красную книгу Республики Беларусь [1]. Молекулярно-генетические исследования видов подсемейства Cetoniidae помогают оптимизировать проведение охранных мероприятий, а также построить модели внутривидовых изменений в рамках данного таксона. В статье представлено описание результатов мо-

лекулярно-генетического исследования методом ДНК-штрихкодирования ряда видов насекомых – представителей подсемейства Cetoniidae (бронзовки).

Материалы и методы

На территории Беларуси выявлено 13 видов подсемейства Cetoniidae (табл. 1).

Сбор полевого материала проводили на территории Государственного природоохранного учреждения «Березинский биосферный заповедник», Республиканского ландшафтного заказника «Средняя Припять», Республиканского ландшафтного заказника «Озеры», Республиканского ландшафтного заказника «Гродненская пуца», Биологического заказника местного значения «Свислочь», Республиканского ландшафтного заказника «Старица», национального парка «Беловежская Пуца».

Имаго представителей подсемейства Cetoniidae были собраны в основном методом ручного сбора, а также с использованием специальных ловушек. Ручной сбор производился на цветущих растениях и на стволах деревьев с вытекающим соком.

По разработанной нами методике [6] для выделения ДНК у имаго насекомых забирали заднюю конечность и фиксировали в 96 % спирте. Отношение образец/этанол выдерживалось не более 1/5.

Для выделения и очистки образцов ДНК были опробованы две методики: фенол-хлороформная экстракция и выделение ДНК набором NucleoSpin DNA Insect производства MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG. Основная часть образцов получена методом фенол-хлороформной экстракции. В случае выделения ДНК из энтомологических образцов, собранных с помощью оконной ловушки, а также выделе-

© БАЛАШЕНКО Н.А., СЕМЕНЯК А.А., КОРНИЛКОВА А.С., СЕНЬКЕВИЧ И.А.,
ПРИЩЕПЧИК О.В., ДРОМАШКО С.Е.

ния ДНК наиболее ценных представителей подсемейства Cetoniinae использовали набор NucleoSpin DNA Insect производства MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.

Выделение ДНК набором NucleoSpin DNA Insect проводили в соответствии с прилагаемой инструкцией.

Для амплификации целевых участков гена COI (цитохром-с-оксидаза I) использовали специфические олигонуклеотидные праймеры LCO1490 (5' GGT CAACAAATC ATAAAG ATATTG G 3') / HCO2198(5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AATCA 3') [7, 8]. Секвенирование проводили на генетическом анализаторе THERMO FISHER SCIENTIFIC ABI PRISM. Для анализа последовательностей ДНК

использовали программные пакеты SeqScanner, MEGA 7.

Результаты и обсуждение

За период проведения полевых исследований собраны 11 видов жуков подсемейства Cetoniinae из 13 видов, обитающих на территории Беларуси. Проведено выделение общей фракции ДНК из собранного материала. Данные о количестве образцов ДНК, вошедших в состав коллекции, представлены в таблице 2. Часть образцов передана в Республиканский банк ДНК человека, растений, животных и микроорганизмов Института генетики и цитологии НАН Беларуси.

Таблица 1. Распространение видов подсемейства Cetoniinae на территории Республики Беларусь [2–5]

Встречающиеся виды	Геоботанические округа
<i>Oxythyrea funesta</i> (Poda, 1761)	1
<i>Tropinota hirta</i> (Poda, 1761)	1, 2, 4, 5, 6, 7
<i>Cetonia aurata</i> (Linnaeus, 1761)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
<i>Protaetia lugubris</i> (Herbst, 1786)	2, 3, 6, 7
<i>P. metallica</i> (H., 1782)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
<i>P. fieberi</i> (Kraatz, 1880)	6, 7
<i>P. aeruginosa</i> (Linnaeus, 1767)	3, 4, 7
<i>P. affinis</i> (Andesch, 1797)	5, 6, 7
<i>Valgus hemipterus</i> (Linnaeus, 1758)	3, 4, 6, 7
<i>Osmoderma barnabita</i> (Motschulsky, 1845)	2, 3, 4, 7
<i>Gnorimus nobilis</i> (Linnaeus, 1758)	4, 7
<i>G. variabilis</i> (Linnaeus, 1758)	2, 3, 5, 7
<i>Trichius fasciatus</i> (Linnaeus, 1758)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Примечания: 1 – Западно-Двинский; 2 – Ошмянско-Минский; 3 – Оршанско-Могилевский; 4 – Неманско-Предполесский; 5 – Березинско-Предполесский; 6 – Бугско-Полесский; 7 – Полесско-Приднепровский.

Таблица 2. Состав коллекции образцов ДНК представителей подсемейства Cetoniinae

Видовая принадлежность	Количество образцов
<i>Oxythyrea funesta</i> (Poda, 1761)	66
<i>Tropinota hirta</i> (Poda, 1761)	4
<i>Cetonia aurata</i> (Linnaeus, 1761)	47
<i>Protaetia lugubris</i> (Herbst, 1786)	3
<i>P. metallica</i> (Herbst, 1782)	5
<i>P. fieberi</i> (Kraatz, 1880)	2
<i>P. aeruginosa</i> (Linnaeus, 1767)	15
<i>Valgus hemipterus</i> (Linnaeus, 1758)	3
<i>Osmoderma barnabita</i> (Motsch., 1845)	2
<i>Gnorimus nobilis</i> (Linnaeus, 1758)	1
<i>Trichius fasciatus</i> (Linnaeus, 1758)	4

Секвенирование участка гена COI (цитохром-с-оксидаза I) провели для двух видов *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) (4 последовательности) и *Protaetia aeruginosa* (Linnaeus, 1767) (3 последовательности). *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) является распространенным видом, не является охраняемым видом. *Protaetia aeruginosa* (Linnaeus, 1767) занесена в Красную

книгу Беларуси (IV категория национального природоохранного значения), вид включен в Европейский список охраняемых сапроксильных видов (NT), Красную книгу России (II категория, сокращающийся в численности вид). Последовательность ДНК экземпляра, относящегося к виду *Protaetia aeruginosa* (Linnaeus, 1767) представлена на рис. 1.



а

5'-GCTGGAAT AGTAGGAACCTCOCTTAGTCTACTA
ATCCGGGCCGAACCTCGGGAATCCCCTTCTTTA
ATTGGT GATGACCAAATTTATAACGT TATCGTA
ACAGCTCATGCTTTCATCATAATTTTTCATAG
TAATACCGATTATAAT TGGTGGATTTGGAAAT T
GACTT GT CCOCT T GAT GCT TGGAGCT CCGACA
TAGCT TTT CCT CGAAT AAACAACATGAGTTT CT
GACTT CT CCCCCCTTCACTAACAT TACTTCTGAT
AAGAAGAATGGTTGAAAGAGGAGCAGGAACCG
GATGAACAGTCTACCCACCOCTTATCTAGAAATA
TTGCTCATAGTGGAGCTTCAGTTGACTTAGCTA
TTT TTAGATTACACCTAGCTGGAATCTCATCAAT
TTTAGGTGCTGTAAATTTATTACAACCTGTGATT
AACATACGATCAACAGGAATAACATT CGATCGA
ATACCAATTATTTGTTT GAT CTGT CGCTCTTACAG
CTCTTTTATTACTTTTATCACTACCTGTATAGCC
GGGGCAATCACAATACTTTAACTGACCGAAAT
ATCAATACTTCATTTT-3'

б

Рис. 1. Фотография представителя вида *Protaetia aeruginosa* (Linnaeus, 1767) (а) и полученная последовательность участка гена COI (цитохром-с-оксидаза I) (б).

Последовательности ДНК были проанализированы с использованием программ SeqScanner, MEGA 7. Были обнаружены отличия генетических последовательностей представителей белорусской части ареала для *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) и *Protaetia aeruginosa* (Linnaeus, 1767). При сравнении полученных генетических последовательностей с последовательностями, взятыми из международной базы данных BOLD (22 образца, коллектированные в России, Финляндии, Австрии, Германии, Франции, Италии), для *O. funesta* обнаружено 2 нуклеотидные замены, встречающиеся только у особей белорусской части ареала: замена A/G (3 последовательности с генотипом G/G, 1 последовательность с генотипом A/G) и замена G/A (3 последовательности с генотипом G/G, 1 последовательность с генотипом A/A). У представителей *P. aeruginosa* было обнаружено 8 вариантов нуклеотидных замен, однако о различиях последовательностей у особей, собранных в разных частях ареала, сложно говорить, т. к. в базе данных BOLD представлено всего три по-

следовательности гена COI данного вида, приведенные под синонимичными видовыми названиями (*Cetonischema aeruginosa*, *Potosia aeruginosa*). Также следует отметить, что в последовательности участка гена COI *O. funesta* были обнаружены нуклеотиды в гетерозиготном положении, в то время как у *P. aeruginosa* все нуклеотиды полученных последовательностей оказались в гомозиготном положении, что может быть связано с различиями в состоянии популяций данных видов.

Также был проведен анализ последовательности участка гена COI с использованием 175 последовательностей варьирующей длины. В это число входили 7 последовательностей, коллектированных на территории Беларуси, и 168 последовательностей видов, входящих в подсемейство Cetoniinae, полученных из базы данных BOLD [9]. Для анализа брали только последовательности гена COI экземпляров, собранных на территории Европы. На основании анализа была построена филограмма, участок которой представлен на рис. 2.

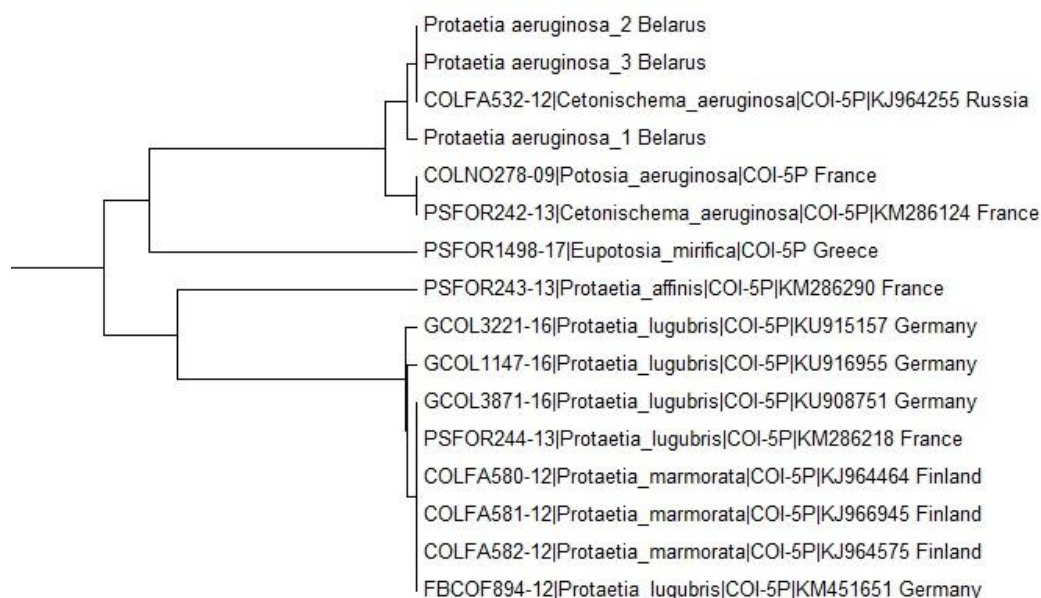


Рис. 2. Участок филограммы, построенной на основе анализа частичной нуклеотидной последовательности гена COI представителей подсемейства Cetoniinae.

На рисунке видно, что проанализированные последовательности ДНК особей *P. aeruginosa*, коллектированных в Беларуси и России, объединены в отдельный кластер, что наглядно показывает наличие значимых отличий этих последовательностей от последовательностей ДНК экземпляров, собранных на территории Франции.

Следует отметить, что шифры образцов приведены в соответствии с базой данных BOLD, где некоторые виды указаны под синонимичными названиями, однако при построении филограммы объединяются как один вид.

Исследования по изучению генетического разнообразия представителей подсемейства Cetoniinae на территории Беларуси будут продолжены. Планируется расширить количество полученных данных. Для выявления уникальных

для Европы популяций планируется получить генетические последовательности для всех видов, обитающих на территории Беларуси.

Выводы

Предложена методика забора биологического материала для выделения ДНК из задних ног особей, что позволило не изымать из среды обитания особей охраняемых и редких видов, собранных на территории Республики Беларусь. Подготовлена коллекция образцов ДНК представителей подсемейства Cetoniinae. Выявлены гаплотипы *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) и *Prottaetia aeruginosa* (Linnaeus, 1767) представителей популяций, обитающих на территории Беларуси. Обнаружены различия гаплотипов у представителей белорусской и европейской части ареала.

Литература

1. Андриевич В.В., Килистратова В.В., Языкович Л.В., Баранов П.В. Жуковская Т.И. Красная книга Республики Беларусь: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды диких животных. 4-е изд. Минск: Беларуская энцыклапедыя, 2015. 317 с.
2. Александрович О.Р., Лопатин И.К., Писаненко А.Д., Цинкевич В.А., Снитко С.М. Каталог жесткокрылых (*Coleoptera, Insecta*) Беларуси. Минск: ФФИ РБ, 1996. 103 с.
3. Рындевич С.К., Парфианович А.А. Жуки-бронзовки (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae) Белорусского Полесья. *Актуальні питання біологічної науки: Збірник статей*. Нежин: НДУ ім. М. Гоголя, 2016. С. 178–180.
4. Цинкевич В.А., Рындевич С.К. Бронзовка Фибера *Prottaetia fieberi* (Kraatz, 1880). Бранзаўка Фібера. Красная книга Республики Беларусь: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды диких животных. 4-е изд. Минск: Беларуская энцыклапедыя, 2015. С. 190–191.
5. Цинкевич В.А. Семейство Scarabaeidae Latreille, 1802. Биологическое разнообразие Березинского биосферного заповедника: ногохвостки (Collembola) и насекомые (Insecta) / под общ. ред. А.О. Лукашука и В.А. Цинкевича. Минск: Белорусский Дом печати, 2016. С. 137.
6. Балашенко Н.А., Сетракова Е.М., Дромашко С.Е. Использование малотравматичных методов генетики для изучения редких видов насекомых. *Молодежь в науке 2017*: тезисы XIV международной научной конференции (Минск, 30 ок-

тября – 2 ноября 2017 г.). Минск, 2017. С. 80.

7. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz L., Vriegenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994. Vol. 3, No. 5. P. 294–299.
8. Simon C. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. of the Entomol. Society of America.* 1994. Vol. 87, iss. 6. P. 651–701.
9. Barcode of Life Data System v 4. URL: <http://boldsystems.org/> (дата обращения: 28.02.2018).

References

1. Andrievich V.V., Kilistratova V.V., Yazykovich L.V., Baranov P.V. Zhukovskaia T.I. Krasnaia kniga Respubliki Belarus: Redkie i nakhodiashchiesia pod ugrozoi ischeznoeniia vidy dikikh zhyvotnykh. 4-e izd. Minsk: Belaruskaja Ėntsyklapedyia, 2015. 317 s.
2. Aleksandrovich O.R., Lopatin I.K., Pisanenko A.D., Tsinkevich V.A., Snitko S.M. Catalog of coleoptera (*Coleoptera, Insecta*) of Belarus. Minsk: FFI RB, 1996. 103 s.
3. Ryndevich S.K., Parfianovich A.A. Bronze beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae) of the Belarusian Polesye. *Aktualni pitannia biologichnoi nauki: Zbirknik statei. Nezhin: NDU im. M. Hoholia*, 2016. S. 178–180.
4. Tsinkevich V.A., Ryndevich S.K. The Fieber bronze *Protaetia fieberi* (Kraatz, 1880). Krasnaia kniga Respubliki Belarus: Redkie i nakhodiashchiesia pod ugrozoi ischeznoeniia vidy dikikh zhyvotnykh. 4-e izd. Minsk: Belaruskaja Ėntsyklapedyia, 2015. S. 190–191.
5. Tsinkevich V.A. Family Scarabaeidae Latreille, 1802. Biologicheskoe raznoobrazie Berezinskogo biosfernogo zapovednika: nogokhvostki (*Collembola*) i nasekomye (*Insecta*): pod obshch. red. A.O. Lukashuka i V.A. Tsinkevicha. Minsk: Belorusskii Dom pečati, 2016. S. 137.
6. Balashenko N.A., Setrakova E.M., Dromashko S.E. Use of low-traumatic methods of genetics to study rare species of insects. *Molodezh v nauke 2017: tezisy XIV mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii* (Minsk, 30 oktiabria – 2 noiabria 2017 g.). Minsk, 2017. S. 80.
7. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz L., Vriegenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1994. Vol. 3, No. 5. P. 294–299.
8. Simon C. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. of the Entomol. Society of America.* 1994. Vol. 87, iss. 6. P. 651–701.
9. Barcode of Life Data System v 4. URL: <http://boldsystems.org/> (last accessed: 28.02.2018).

BALASHENKO N.A.¹, SEMENYAK A.A.², KORNILKOVA A.S.¹, SEN'KEVICH I.A.², PRISHCHPCHIK O.V.², DROMASHKO S.E.¹

¹ Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: ninabalashenko@gmail.com

² Scientific and Practical Center for Bioresources of the National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: irynasenkevich@gmail.com

GENOTYPING OF THE SITE OF THE mtDNA OF REPRESENTATIVES OF THE CETONIINAE SUBFAMILY

Aim. Description of the results of molecular genetic research of insects-representatives of the subfamily Cetoniinae (flower chafer). **Methods.** For the analysis, methods of low-traumatic sampling of material for DNA isolation, polymerase chain reaction method, sequencing of the region of mtDNA COI gene were used. **Results.** A technique for sampling biological material for isolating DNA from the hind legs of individuals was proposed, which allowed not to remove from the habitat the individuals of the most valuable species, collected on the territory of the Republic of Belarus. A collection of DNA samples of representatives of the subfamily Cetoniinae was prepared. The haplotypes *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) and *Protaetia aeruginosa* (Linnaeus, 1767) of representatives of the populations inhabiting the territory of Belarus have been identified. **Conclusions.** There were significant differences in haplotypes among representatives of the Belarusian and European parts of their areal.

Keywords: molecular markers, mtDNA, DNA-barcoding, insects, subfamily Cetoniinae.

БАЛАШЕНКО Н.О.¹, СЕМЕНЯК О.О.², КОРНИЛКОВА А.С.¹, СЕНЬКЕВИЧ І.О.², ПРИЩЕПЧИК О.В.², ДРОМАШКО С.Є.¹

¹ Інститут генетики і цитології НАН Білорусі, Білорусь, 220072, м. Мінськ, вул. Академічна, 27, e-mail: ninabalashenko@gmail.com

² Науково-практичний центр НАН Білорусі з біоресурсів, Білорусь, 220072, м. Мінськ, вул. Академічна, 27, e-mail: irynasenkevich@gmail.com

ГЕНОТИПУВАННЯ САЙТУ мтДНК ПРЕДСТАВНИКІВ ПІДРОДИНИ СЕТОНІІНАЕ

Мета. Опис результатів молекулярно-генетичного дослідження комах-представників підроддини Cetoniinae (бронзовки). **Методи.** Для аналізу використані методи малотравматичного забору матеріалу для виділення

ДНК, метод полімеразної ланцюгової реакції, секвенування ділянки мтДНК гена COI. **Результати.** Запропоновано методику забору біологічного матеріалу для виділення ДНК із задніх ніг особин, що дозволило не вилучати з місця існування особин найбільш цінних видів, зібраних на території Республіки Білорусь. Підготовлена колекція зразків ДНК представників підродини Cetoniinae, виявлено гаплотипи *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) і *Protaetia aeruginosa* (Linnaeus, 1767) представників популяцій, що мешкають на території Білорусі. **Висновки.** Виявлено значні відмінності гаплотипов у представників білоруської та європейської частини ареалу. **Ключові слова:** молекулярні маркери, мтДНК, ДНК-штрихкування, комахи, підродина Cetoniinae.