

# Роль однонуклеотидных замен В ГЕНЕ ВИТЕЛЛОГЕНИНА ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ темной лесной пчелы

Ген вителлогенина *Vg*, кодирующий основной белок-предшественник яичного желтка, обнаружен у большинства яйцекладущих животных [2, 6, 8]. У пчел вителлогенин синтезируется в жировом теле, секретируется в гемолимфу и изолируется ооцитами, обеспечивая питание будущего эмбриона [8].

Ранее было показано плейотропное\* (множественное) действие вителлогенина; обнаружено несколько различных фенотипических его проявлений у пчелиной матки и рабочих особей медоносной пчелы *Apis mellifera* [1]. Известно, что вителлогенин играет важную роль в развитии кастовой дифференциации у общественных насекомых и тесно связан с плодовитостью; у пчел титр циркулирующего в гемолимфе белка положительно коррелирует со скоростью яйцекладки матки [3, 5, 7]. Некоторые виды насекомых имеют несколько копий гена *Vg*, тогда как у медоносной пчелы — только одна и один тип белка, который обладает уникальной функцией социальной плейотропии [4].

По типу организации вителлогенин медоносной пчелы сходен с белком многих позвоночных и состоит из N-концевого участка, выполняющего сигнальную функцию, за которым следуют липовителлин- (*lipovitellin*) и фосвитин- (*phosvitin*)-подобные регионы, а также

концевой участок C, включающий домен D фактора фон Виллебранда. У медоносной пчелы ген *Vg* состоит из семи экзонов\*\*, нуклеотидные последовательности шести из них опубликованы в генетическом банке GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)): представлены 19 особей медоносной пчелы из Африки, 10 — из Восточной Европы и 12 — из Западной Европы [4].

Для секвенционного анализа отобрали 12 образцов пчел уральской популяции *A. m. mellifera* L. с вариантом PQQ межгенного локуса COI-COII мтДНК, относящихся к эволюционной ветви М (табл.).

Образцы пчел уральской популяции *Apis mellifera mellifera*, использованные в секвенционном анализе гена *Vg*

| № п/п | Регион       | Район           | Населенный пункт |
|-------|--------------|-----------------|------------------|
| 1     | Республика   | Белорецкий      | д. Кагарманово   |
| 2     | Башкортостан |                 | с. Кага          |
| 3     |              |                 | с. Серменево     |
| 4     |              | Бурзянский      | д. Галиакберово  |
| 5     |              |                 | д. Ямашево       |
| 6     |              |                 | д. Иргизлы       |
| 7     |              | Татышлинский    | д. Кустаревка    |
| 8     |              |                 | д. Сабанчи       |
| 9     |              |                 | д. Уядыбаш       |
| 10    | Пермский     | Красновишерский | д. Поршакова 1   |
| 11    | край         | Нытвенский      | д. Нытва         |
| 12    |              | Красновишерский | д. Поршакова 2   |

Нуклеотидные последовательности шести проанализированных экзонов гена *Vg* из 12 образцов медоносной пчелы депонированы в базу данных генетического банка под следующими номерами: *Vg* экзон 2 (KJ572309-KJ572320), *Vg* экзон 3 (KJ645883-KJ645894), *Vg* экзон 4 (KJ572297-KJ572308),

\*Плейотропия (греч. pleiōn — более многочисленный и tropos — поворот, направление) — множественное действие гена, способность гена воздействовать на несколько признаков.

\*\*Экзон [от англ. ex(pression) — выражение, выразительность], — участок гена (ДНК) эукариот, несущий генетическую информацию, кодирующую синтез продукта гена (белка). Соответствующие Э. участки ДНК в отличие от интронов полностью представлены в молекуле информационной РНК, кодирующей первичную структуру белка.

Vg экзон 5 (KJ572285-KJ572296), Vg экзон 6 (KJ532136-KJ532147), Vg экзон 7 (KJ532124-KJ532135).

Полученные нуклеотидные последовательности гена Vg были выровнены в программе MEGA 4.1. При выравнивании полученных нуклеотидных последовательностей в качестве референсной использовали нуклеотидную последовательность гена Vg *Apis mellifera* [(LG4; NC\_007073.3 (4020743–4026919); AADG06005159.1 (56573–62749)], первый нуклеотид стартового кодона\* которого соответствовал положению 4020743 в четвертой хромосоме медоносной пчелы.

При сравнении полученных нами нуклеотидных последовательностей гена Vg с референсной последовательностью нуклеотидов из генетического банка наблюдалось всего 20 однонуклеотидных (SNP) замен, из которых 18 (90%) были транзициями (замена пуриновых азотистых оснований пуриновыми, а пиримидиновых пиримидиновыми) и 2 (или 10%) трансверсиями (замена пуриновых азотистых оснований пиримидиновыми и наоборот). Все трансверсии оказались несинонимичными и приводили к заменам аминокислот. Из 18 транзиций несинонимичной оказалась 1 (6%), а 17 (или 94%) были синонимичными и не приводили к аминокислотным заменам. Таким образом, из 20 замен нуклеотидов только три приводили к заменам аминокислот, что составило 15% всех замен.

Несинонимичные нуклеотидные замены по экзонам были распределены следующим образом: в экзоне 5 гена Vg в позиции 4528 аминокислота Leu (лейцин) заменялась аминокислотой Ile изолейцин (Leu/Ile); в экзоне 5 в позиции 4533 происходила замена Arg/Ser; в экзоне 6 в позиции 5229 отмечена замена Ala/Thr. Также была обнаружена делеция\*\* девяти нуклеотидов в позиции 794–802 в экзоне 2 гена Vg в образце пчелы из д. Уядыбаш Татышлинского района Республики Башкортостан. Сходная делеция встречалась в последовательностях экзона 2 гена Vg пчел из генетическо-

го банка следующих номеров: JN557265, JN557266, JN557273, JN557274, JN557275, JN557276.

Интересно отметить, что трансверсии встречались только в экзоне 5, а все остальные экзоны содержали только транзиции: в экзоне 2 — две транзиции, в экзоне 3 — три транзиции, в экзоне 4 — две транзиции, в экзоне 5 — четыре транзиции, в экзоне 6 — одна транзиция, в экзоне 7 — шесть транзиций. Необходимо отметить, что только в экзоне 6 встречалась несинонимичная транзиция, которая приводила к замене аминокислоты.

При сравнении нуклеотидных последовательностей гена Vg у представителей эволюционных ветвей М и С выявили 24 уникальные однонуклеотидные (SNP) замены, характерные только для представителей эволюционной ветви М, которые и могут быть использованы для идентификации представителей эволюционных ветвей М и С.

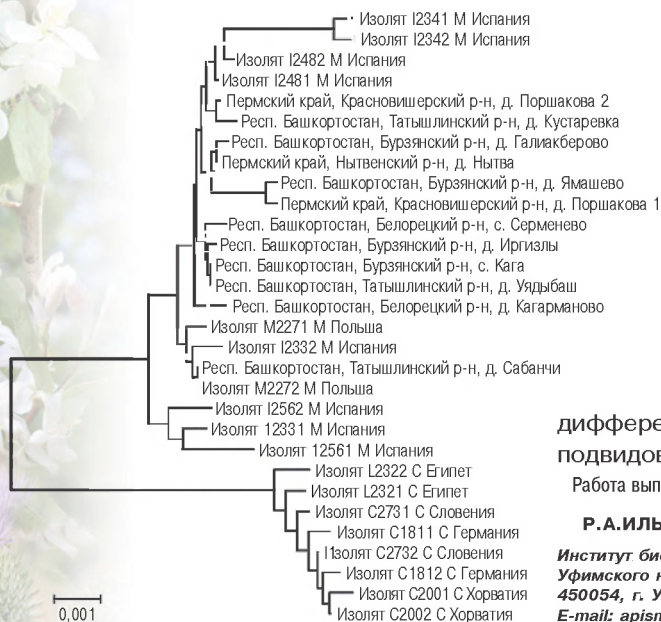
Эти нуклеотидные замены встречались неравномерно в экзонах гена Vg. Так, в экзоне 2 наблюдалось три замены, в экзоне 3 — пять замен, в экзоне 4 — четыре замены, в экзоне 5 — шесть замен, в экзоне 6 — шесть замен, в экзоне 7 замены не встречались. Таким образом, наиболее информативные для подвидовой дифференциации — экзоны 3, 5 и 6, а наименее информативные — экзоны 2 и 4, где меньшее число замен. Экзон 7 очень консервативен среди подвидов *Apis mellifera* и потому не может быть использован в качестве инструмента подвидовой дифференциации, но может быть полезен в филогенетических реконструкциях *A. mellifera*.

Таким образом, обнаруженные нами 24 SNP могут быть использованы в качестве ядерных маркеров для генетической дифференциации представителей эволюционных ветвей М (*A. m. mellifera*) и С (*A. m. caucasica*, *A. m. carnica*, *A. m. carpatica*, *A. m. ligustica*).

По результатам сравнительного кластерного анализа просеквенированных нуклеотидных последовательностей гена Vg образцов пчел из 12 семей с Урала, а так-

\*Кодон (триплет) — единица наследственной информации, состоящая из трех, расположенных в определенной последовательности дезоксирибонуклеотидов, и кодирующая одну аминокислоту.

\*\*Делеция — разновидность нехватки, когда вследствие двух разрывов происходит потеря внутреннего хромосомного сегмента.



**Генетические взаимоотношения представителей пчел эволюционных ветвей М и С по результатам сравнительного кластерного анализа нуклеотидных последовательностей гена *Vg***

же 10 семей пчел эволюционной ветви М европейских популяций (изоляты I2331, I2332, I2341, I2342, I2481, I2482, I2561, I2562 из Испании и M2271 M2272 из Польши) и 8 семей пчел эволюционной ветви С (изоляты C1811, C1812 из Германии, C2001, C2002 из Хорватии, C2731, C2732 из Словении, L2321, L2322 из Египта), просеквенированных С. Kent et al. (2011), была построена дендрограмма, характеризующая генетические взаимоотношения представителей пчел эволюционных ветвей М и С (рис.). Для сравнительного анализа выбирали образцы семей пчел, характеризующихся максимальными долями принадлежности к эволюционным ветвям (более 0,9), рассчитанными С. Kent et al. (2011) в публикации в генетическом банке [4].

На дендрограмме наблюдаем выделение двух больших кластеров, очень четко дифференцирующих представителей пчел эволюционных ветвей М и С. Образцы пчел с Урала образовали кластер с представителями западноевропейских популяций эволюционной ветви М, что может являться доказательством единства происхождения

и тесного генетического родства уральской и западноевропейских популяций темной лесной пчелы *A. m. mellifera*.

Таким образом, сравнительный кластерный анализ нуклеотидной последовательности гена *Vg* может быть использован в филогенетических реконструкциях представителей *A. mellifera*, а обнаруженные 24 SNP могут служить в качестве ядерных маркеров для генетической дифференциации *A. m. mellifera* от других подвидов в условиях России.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 13–04–01802.

**Р.А.ИЛЬЯСОВ, А.В.ПОСКРЯКОВ, А.Г.НИКОЛЕНКО**

Институт биохимии и генетики  
Уфимского научного центра Российской академии наук  
450054, г. Уфа, пр. Октября, д. 71  
E-mail: apismell@hotmail.com

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *Vg* показал значительную генетическую изменчивость у представителей разных подвидов медоносной пчелы *Apis mellifera*. Обнаруженные нами 24 однонуклеотидные замены (SNP) могут быть использованы в качестве ядерных SNP-маркеров для генетической дифференциации представителей пчел эволюционных ветвей М (*Apis mellifera mellifera*) и С (*A. m. caucasica*, *A. m. carnica*, *A. m. carpatica*, *A. m. ligustica*).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Amdam G.V., Norberg K., Hagen A., Omholt S.W. Social exploitation of vitellogenin // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2003. — V. 100.
2. Chen J.S., Sappington T.W., Raikhel A.S. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry // Journal of Molecular Evolution. — 1997. — V. 44.
3. Engels W. Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera // Integrative and Comparative Biology. — 1974. — V. 14.
4. Kent C., Issa A., Bunting A.C., Zayed A. Adaptive evolution of a key gene affecting queen and worker traits in the honey bee, *Apis mellifera* // Molecular Ecology. — 2011. — V. 20.
5. Nelson C.M., Ihle K.E., Fondrk M.K., Page R.E.J., Amdam G.V. The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization // PLoS Biology. — 2007. — V. 5.
6. Sappington T.W., Raikhel A.S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors // Insect Biochemistry and Molecular Biology. — 1998. — V. 28.
7. Seehuus S.C., Norberg K., Gimsa U., Kreckling T., Amdam G.V. Reproductive protein protects sterile honey bee workers from oxidative stress // Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. — 2006. — V. 103.
8. Tufail M., Takeda M. Molecular characteristics of insect vitellogenins // Journal of Insect Physiology. — 2008. — V. 54.