

гусеницы не могут окуклиться и погибают. После этой даты гусеницы на древесно-кустарниковой растительности города Мозыря больше не обнаруживались.

Согласно литературным данным [1] куколки американской белой бабочки темно-коричневого цвета, размещаются обычно в почве, листовом опаде, трещинах коры деревьев, а также на несанкционированных свалках. Нами куколки обнаружены не были.

**Заключение.** Американская белая бабочка постепенно завоевывает новые территории. Она обнаружена на 13 улицах города Мозыря, на которых полностью либо частично поврежденными оказались 9 видов древесно-кустарниковой растительности: клен остролистный или платановидный, клен ясенелистный или американский, липа сердцелистная, груша обыкновенная, яблоня домашняя, шелковица белая, слива колючая, акация белая и облепиха жестеровидная. Чаще всего среди поврежденных деревьев встречались клены остролистный и ясенелистный – по 9 деревьев, реже всего – слива колючая, акация белая и облепиха – по 1 дереву. Дальнейшее проведение мониторинга на улицах города Мозыря позволит получить полную картину повреждения древесно-кустарниковой растительности, своевременно выявить вредителя и эффективно провести мероприятия по ликвидации очага американской белой бабочки.

#### Список использованной литературы

1. Кулак, А.В. Некоторые особенности зимовки американской белой бабочки (*Huphantia cunea* (Drury, 1773)) в условиях Беларуси / А.В. Кулак // Актуальные проблемы охраны животного мира в Беларуси и сопредельных регионах: материалы II Междунар. науч.-практ. конф. (Минск, 11–14 октября 2022 г.) / редкол.: А.В. Кулак [и др.]. – Минск : А.Н. Вараксин, 2022. – С. 224–229.

2. На Гомельщине вводят карантинные меры по борьбе с опасными вредителями растений [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.mazyr.by/2022/04/nagomelshhine-vvodyat-karantinnye-mery-po-borbe-s-opasnymi-vreditelyami-rastenij>. – Дата доступа: 23.09.2022.

УДК 575+577+595.7

### ПЦР-ПДРФ-АНАЛИЗ ВИДОВ ШМЕЛЕЙ

### PCR-RFLP-ANALYSIS OF BUMBLEBEE SPECIES

С.А. Зяцьков, Г.Г. Гончаренко, А.В. Крук, Е.М. Курак

S.A. Zyatkov, G.G. Goncharenko, A.V. Kruk, E.M. Kurak

УО «Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины»,  
г. Гомель, Республика Беларусь

В статье описан ПЦР-ПДРФ-анализ, позволяющий идентифицировать и различать сходные виды шмелей, таких как комплекс *Bombus lucorum* (*B. lucorum*, *B. magnus* и *B. cryptarum*) и *B. terrestris*,

поскольку чрезвычайно трудно надежно идентифицировать перечисленные виды, используя только морфологические признаки.

Ключевые слова: *Bombus*, ПЦР, ПДРФ, сходные виды.

The article describes a PCR-PDRF-analysis that allows identifying and distinguishing similar bumblebee species such as the *Bombus lucorum* complex (*B. lucorum*, *B. magnus* and *B. cryptarum*) and *B. terrestris*, since it is extremely difficult to reliably identify the listed species using only morphological features.

Keywords: *Bombus*, PCR, RFLP, similar species.

**Введение.** Шмели (*Bombus spp.*), несмотря на то, что существуют в природе лишь один сезон, в отличие от медоносных пчел, муравьев и термитов, являются одними из основных опылителей как дикорастущих растений, так и сельскохозяйственных культур, поскольку они хорошо приспособляются к различным климатическим условиям и эффективно размножаются в искусственных популяциях [1–3]. Шмели рода *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) являются общественными насекомыми с полным циклом превращения (рисунок 1).

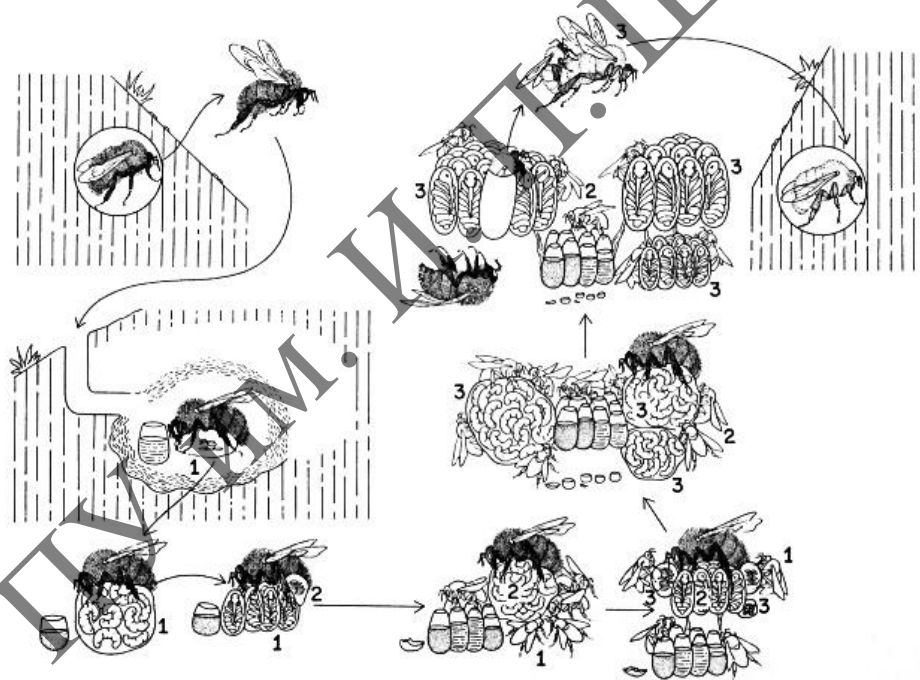


Рисунок 1 – Жизненный цикл земляного шмеля *B. terrestris* [4]:

- а – в начале весны матка покидает свою норку в земле, в которой она находилась в стадии диапаузы, и начинает поиск другой норки, подходящей для постройки гнезда;
- б – в гнезде матка готовит резервуар для нектара, собирает цветочную пыльцу и откладывает первые яйца;
- в – матка кормит личинки и обогревает их до стадии окукливания;
- г – после появления первых рабочих особей матка концентрируется только на откладке яиц, а рабочие особи на кормлении и сборе пищи;
- д – гнездо развивается и растет до этапа появления новых маток и самцов;
- е – старая матка умирает, а молодые матки покидают гнездо;
- ж – после спаривания матки ищут подходящее для зимовки место, где впадают в спячку до конца зимы

Необходимо отметить, что пчелиные являются важнейшими, а зачастую и единственными опылителями цветковых растений. Они опыляют 85 % всей цветковой флоры и до 90 % культурной, причем некоторые виды растений могут опыляться только специализированными видами одиночных пчел. Во всем мире около 300 видов растений используется в питании человека и еще больше видов служит кормом для домашних животных. Их подавляющее большинство, как и около 95 % из более 500 видов возделываемых растений, является энтомофильным, т. е. их урожай (или только семеноводство) непосредственно зависит от опылительной деятельности насекомых, прежде всего представителей надсемейства Apoidea. Энтомофильными культурами занято более 1/2 обрабатываемых площадей, и они дают около 1/3 продуктов растениеводства. При насыщенном опылении увеличиваются масса семян, энергия прорастания, всхожесть, интенсивность начального роста, количество цветков растений [5]. Кроме того, растения, у которых цветки с длинными воронковидными венчиками (многие бобовые, яснотковые, гвоздичные), опыляются преимущественно шмелями [6]. Проведенные исследования показали, что недавнее сокращение численности шмелей и локальное вымирание некоторых видов по всему миру [7–8] выявили необходимость в точных инструментах видовой идентификации для сохранения и управления популяционными генофондами *Bombus spp.* Это особенно важно для криптических (морфологически сходных) таксонов, таких как комплекс *B. lucorum* (включающий *B. lucorum* – малый земляной шмель, *B. magnus* – северный белохвостый шмель и *B. cryptarum* – загадочный шмель) голарктического подрода *Bombus sensu stricto* (s. str.), поскольку чрезвычайно трудно надежно идентифицировать виды внутри этой группы, используя только морфологические признаки, например, окраску тела [9], а также *B. terrestris* (большой земляной шмель), широко используемый в коммерческом опылении, практически неотличимый от близкородственных видов, принадлежащих к комплексу *B. lucorum*. Это особенно актуально в областях, где *B. terrestris* не встречается в природе и его коммерческие штаммы в этой связи могут конкурировать с местными видами, а также передавать патогены местным опылителям [10].

**Цель работы** – провести ПЦР-ПДРФ-анализ, позволяющий идентифицировать и различать криптические виды шмелей.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Ярким примером молекулярно-генетических методов, применяемых для видовой идентификации шмелей, является метод, основанный на полиморфизме длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ, RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism). Этот метод был разработан в 1974 г., а эффективно стал использоваться в 1980 г. Д. Ботштейном с сотрудниками при построении генетических карт сцепления человека [11]. За данной пионерской работой последовало создание RFLP-карт для многих видов животных и растений [12].

ПДРФ – это способ исследования геномной ДНК путем ее разрезания рестриктазами с последующим анализом размеров образующихся фрагментов путем гель-электрофореза. Кроме того, проведению ПЦР-ПДРФ-анализа обычно предшествует полимеразная цепная реакция, позволяющая размножить интересующий фрагмент ДНК.

Для проведения молекулярно-генетического анализа шмелей юга Беларуси в качестве маркера были использованы фрагменты мтДНК COI (1064 п. н.) и праймеры, первоначально разработанные для ДНК-дактилоскопии *Apis mellifera*. Однако в виду большого размера фрагмента данный способ был модернизирован специально для работы с деградированными образцами ДНК, поскольку последующая амплификация длинных фрагментов ДНК часто терпит неудачу. Необходимо отметить, что ДНК деградирует, когда биологический материал очень старый или поврежден, из-за неправильных условий хранения (например, когда образцы находятся в течение нескольких недель в соленой воде или моющем средстве) [10].

Было установлено, что для эффективной идентификации четырех видов шмелей из подрода *Bombus s. str.* (*B. lucorum*, *B. terrestris*, *B. magnus* и *B. cryptarum*) из деградированного биологического материала хорошо подходит короткий фрагмент мтДНК COI (446 п. н.) в комплексе с тремя диагностическими рестриктазами (Hinf I, Hinc II и Hae III). Полученные результаты приведены в таблице.

Таблица – Размеры гаплотипов для различных видов *Bombus*

Виды	Гаплотипы [13]	Размер фрагментов, полученных рестриктазами		
		Hinf I	Hinc II	Hae III
<i>B. lucorum</i>	A	446	446	446
<i>B. cryptarum</i>	B	446	446	118/328
	C	47/399	446	446
<i>B. magnus</i>	E, F, G	47/399	170/276	446
<i>B. terrestris</i>	H, I	53/180/213	446	446
	J, M	213/233	446	446
	K, L	53/393	446	446

Из таблицы видно, что гаплотипы [13] использованного фрагмента мтДНК COI различаются по месту расположения сайтов рестрикции. Для трех взятых рестриктаз размеры получаемых после инкубации продуктов различаются, что позволяют четко идентифицировать исследуемые виды с помощью этого метода.

**Заключение.** Таким образом, ПЦР-ПДРФ-анализ позволяет идентифицировать и различать сходные виды шмелей, таких как комплекс *Bombus lucorum* (*B. lucorum*, *B. magnus* и *B. cryptarum*) и *B. terrestris*, поскольку чрезвычайно трудно надежно идентифицировать перечисленные виды, используя только морфологические признаки. Кроме того, ПЦР-ПДРФ является быстрым, дешевым и надежным инструментом для идентификации многих видов насекомых, особенно когда морфологических признаков недостаточно или когда полученные для ДНК-анализа образцы низкого качества.

Работа проводилась в рамках базового задания 5, НИР № 5.6, ГИНИ «Природные ресурсы и окружающая среда».

#### Список использованной литературы

1. Importation of non-native bumblebees into North America: potential consequences of using *Bombus terrestris* and other non-native bumble bees for greenhouse crop pollination in Canada, Mexico, and the United States / K. Winter [et al.]. – San Francisco : North American Pollinator Protection Campaign (NAPPC), 2006. – 33 p.
2. Goulson, D. Bumblebees, behaviour, ecology, and conservation / D. Goulson. – New York : Oxford University Press, 2010. – 336 p.
3. Гребенников, В.С. Разведение и использование шмелей на красном клевере : метод. рекомендации / В.С. Гребенников. – Новосибирск : СО ВАСХНИЛ, 1982. – 52 с.
4. Heinrich, B. Bumblebee Economics / B. Heinrich. – Cambridge U.K : Harvard University Press, 1979. – P. 252.
5. Прищепчик, О.В. Фауна и экология пчелиных (Hymenoptera, Apoidea) Минской возвышенности : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.09 / О.В. Прищепчик; Бел. НИИ защиты растений. – Прилуки, 2000. – 20 с.
6. Лакотко, А.А. Анализ фауны пчелиных (Hymenoptera, Apidae) Белорусского Поозерья. III. Топические и трофические связи / А.А. Лакотко // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта імя П.М. Машэрава. – 1997. – № 4 (6). – С. 89–94.
7. Goulson, D. Decline and conservation of bumblebees / D. Goulson // Annual Review of Entomology. – 2008. – Vol. 53. – P. 191–208.
8. Rarity and decline of bumblebees – a test of causes and correlates / U. Fitzpatrick [et al.] // Biological Conservation. – 2007. – Vol. 136. – P. 185–194.
9. 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. – P. 1–10.
10. Vesterlund, S.-R. Molecular identification of cryptic bumblebee species from degraded samples using PCR–RFLP approach / S.-R. Vesterlund, J. Sorvari, A. Vasemagi // Molecular Ecology Resources. – Vol. 14(1). – P. 122–126.
11. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms / D. Botstein [et al.] // Am. J. Hum. Genet. – 1980. – Vol. 32. – P. 314–331.
12. Хлесткина, Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4/2. – P. 1044–1054.
13. 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.