

УДК 638.12:631.523.5

ИНФОРМАТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

30 подвидов пчелы медоносной (*A. mellifera*) в Европе, на Ближнем Востоке и в Африке, сформировавшихся под влиянием окружающей среды, подразделяются на шесть эволюционных ветвей: А, М, С, О, Y, Z [10]. Внутривидовое таксономическое разнообразие представлено среди них неравномерно: ветвь М содержит два подвида, ветвь О — четыре, ветви А и С — по одиннадцати подвидов, ветви Y и Z — по одному.

Деятельность человека привела к нарушению естественных ареалов этих подвидов. Для стабильного пчеловодства важно разведение пчел чистых линий. В результате межрегиональных транспортировок аборигенный генофонд темной лесной пчелы (*Apis mellifera mellifera*) в европейских странах практически не сохранился [2]. На конференции SICAMM в 2014 г. сообщалось, что в самом чистом генофонде темной лесной пчелы в Европе — 10% генетического материала южных подвидов *A. m. carnica* и *A. m. ligustica*.

Известно, что в странах Европы наиболее распространена гибридизация подвидов пчел эволюционных ветвей М и С, тогда как в странах Южной и Центральной Америки — подвидов эволюционных ветвей А и С. Идентификация принадлежности пчел к эволюционным ветвям позволит решить проблемы массовой гибридизации и сохранения генофонда темной лесной пчелы в регионах ее чистопородного разведения [1].

Популярные морфометрические методы, применяемые для идентификации пчел, не всегда бывают информативными в условиях гибридизации между несколькими подвидами. Наиболее эффективны в этом плане молекулярные маркеры, такие как полиморфные локусы ДНК.

Ген ND2 мтДНК медоносной пчелы изу-

чают наиболее активно: в Генбанке содержится генетический материал почти всех известных подвидов пчел с характерными для них нуклеотидными последовательностями этого гена. Сравнительный анализ представленных вариантов показал возможность использования гена ND2 мтДНК в филогенетических исследованиях [3, 9].

Другой активно изучаемый ген — ген COI, используемый в генетическом штрихкодировании насекомых. У медоносной пчелы этот ген с прилегающим к нему межгенным локусом COI-COII нашел широкое применение при изучении рестрикционного полиморфизма эндонуклеазой DraI. Филогенетические исследования пчелы на основе других митохондриальных генов, по литературным данным, не проводились.

В геногеографических и филогенетических исследованиях постоянно приходится сталкиваться с информативными и неинформативными генетическими маркерами. Цель нашей работы — поиск и оценка генетических маркеров митохондриального генома, позволяющих корректно дифференцировать подвиды пчел эволюционных ветвей А, М, С, О.

Нуклеотидная последовательность гена ND2 мтДНК была определена у пчел 18 семей эволюционной ветви М: десяти семей *A. m. mellifera* из Республики Башкортостан, шести семей из Пермского края, двух семей из Швейцарии. Также была определена нуклеотидная последовательность гена ND2 мтДНК у пчел 21 семьи эволюционной ветви С: девяти семей *A. m. caucasica* из Краснодарского края; семи семей *A. m. carpatica* из Республики Адыгея, трех семей *A. m. macedonica* из Закарпатской области Украины, двух семей *A. m. carnica* из Литвы. Всего мы проанализировали генетический материал пчел 39 семей.

Анализ полученных нуклеотидных последовательностей гена ND2 мтДНК провели в сравнении с данными Генбанка, полученными от 31 образца пчел эволюционной ветви А, от 37 образцов ветви С, от 4 образцов ветви М и 6 образцов ветви О: всего от 78 образцов пчел. Пчелы эволюционных ветвей Y и Z в Генбанке по гену ND2 мтДНК не представлены.

Таким образом, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена ND2 мтДНК был проведен для 117 образцов пчел 20 подвидов всех четырех эволюционных ветвей, где ветвь А представлена шестью подвидами (*A. m. scutellata*, *A. m. sahariensis*, *A. m. intermissa*, *A. m. adansonii*, *A. m. monticola*, *A. m. capensis*), ветвь С — восемью подвидами (*A. m. sicula*, *A. m. macedonica*, *A. m. caucasica*, *A. m. carpatica*, *A. m. carnica*, *A. m. cecropia*, *A. m. ligustica*, *A. m. pomonella*), ветвь О — тремя подвидами (*A. m. adami*, *A. m. supria*, *A. m. anatoliaca*), ветвь М — двумя подвидами (*A. m. iberica*, *A. m. mellifera*). В качестве референсной последовательности при сравнении использовали нуклеотидную последовательность полного митохондриального генома пчелы подвида *A. m. ligustica* (Nc001566) размером 16343 п.н. [4], относительно начала которой велся отсчет всех SNP (однонуклеотидных замен).

Сравнительный анализ 12 генов мтДНК (ND2, COII, COI, ATP8, ATP6, COIII, ND3, ND5, ND4, ND4L, ND6, ND1) был выполнен на основе нуклеотидных последовательностей в полных митохондриальных геномах пчел двух образцов эволюционной ветви М: KJ396188 и KJ396189 (*A. m. mellifera*) [5]; двух образцов эволюционной ветви А: KJ601784 (*A. m. scutellata*) [6] и KM458618 (*A. m. intermissa*) [8]; одного образца эволюционной ветви О: KP163643 (*A. m. syriaca*) [7] относительно референсной последовательности образца эволюционной ветви С: Nc001566

(*A. m. ligustica*) [4].

Полимеразная цепная реакция гена ND2 была проведена с использованием следующих праймеров: F: 5'-TGATAAAAGAAATATTTTGA-3' и R: 5' GAATCTAATTAATAAAAAA-3' [3].

Определение нуклеотидной последовательности гена ND2 мтДНК выполнили на автоматическом анализаторе нуклеиновых кислот Applied Biosystems (США) в компании «Синтол» (Москва).

Дендрограммы построены с использованием программ MEGA 6.0 и DNASTar 5.05 методом ближайшего соседа с применением бутстреп-анализа.

Медианная сеть была построена с использованием программ netViz Professional и CorelDRAW Graphics Suite X7.

На основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального генома пчел, являющихся представителями четырех эволюционных ветвей А, М, С, О, построена дендрограмма

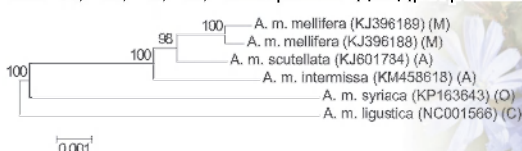


Рис. 1. Дендрограмма генетических взаимоотношений представителей пчел четырех эволюционных ветвей, построенная на основе сравнительного анализа полных митохондриальных геномов

(рис. 1).

На дендрограмме наблюдается разделение представителей эволюционных ветвей А, М, С, О на четыре группы. Отмечается генетическая близость на уровне митохондриального генома между представителями эволюционных ветвей А и М, а также О и С. На основании сравнения нуклеотидных последовательностей 12 генов исследуемых образцов с референсной последовательностью обнаружены SNP для каждого гена (табл.).

Однонуклеотидные (SNP) замены в 12 генах мтДНК медоносной пчелы

Образец пчел	ND2 (1000 п.н.)	COII (676 п.н.)	COI (1564 п.н.)	ATP8 (157 п.н.)	ATP6 (679 п.н.)	COIII (778 п.н.)	ND3 (352 п.н.)	ND5 (1663 п.н.)	ND4 (1342 п.н.)	ND4L (282 п.н.)	ND6 (502 п.н.)	ND1 (916 п.н.)
Nc001566 <i>A. m. ligustica</i> (C) (референсная)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	13	12	19	2	1	8	4	18	20	3	8	13
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)	13	11	19	2	1	7	5	20	18	3	9	12
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)	13	8	27	5	2	8	9	21	17	6	7	18
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)	13	12	18	2	1	7	68	20	22	3	8	14
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)	14	14	18	2	3	6	6	21	20	4	9	15

Данные по SNP для 12 генов мтДНК использовали для построения дендрограмм каждого гена. На основании сравнительного анализа полученных дендрограмм для представителей пчел эволюционных ветвей А, М, С, О с совокупной для всех 12 генов дендрограммой (рис. 1) можно заключить, что семь генов митохондриального генома — ND2, ND4, ND4L, ND5, ND6, COI, COIII — корректно отражают филогению и могут применяться для дифференциации подвидов. Остальные пять генов — COII, ATP6, ATP8, ND1, ND3 — искажают филогению и не позволяют дифференцировать подвиды пчел эволюционных ветвей А, М, С, О. Предполагаем, что филогенетические исследования на основе перечисленных семи генов, взятых как в отдельности, так и вместе, послужат для четкой дифференциации подвидов медоносной пчелы эволюционных ветвей А, М, С, О.

Для подтверждения предположения провели анализ информативности гена ND2 для 117 представителей пчел 20 подвидов 4 эволюционных ветвей. Сравнение выровненных нуклеотидных последовательностей гена ND2 мтДНК относительно референсной последовательности позволило выявить однонукле-

отидные замены SNP для каждого образца пчел. Учитывали только информативные SNP, которые встречаются среди всех образцов более одного раза.

Для наглядного отображения филогенетических связей и процесса возникновения нуклеотидных замен у 117 представителей пчел 20 подвидов четырех эволюционных ветвей А, М, С, О построили медианную сеть на основе информативных однонуклеотидных замен гена ND2 мтДНК (рис. 2).

На рисунке — картина четкой дифференциации представителей пчел на четыре группы, соответствующие эволюционным ветвям А, М, С, О. Наиболее близки между собой ветви А и М, С и О. Возможно, что это связано с особенностями эволюции вида *A. mellifera*. Согласно современной гипотезе, построенной с учетом большого числа SNP (1136), расселение пчел шло из Африки тремя отдельными потоками миграции на север в Европу и Западную Азию [11].

Необходимо отметить представителя подвида *A. m. iberica* эволюционной ветви М, а также представителей подвида *A. m. sicula* эволюционной ветви С, которые попали в одну группу с пчелами африканского происхожде-

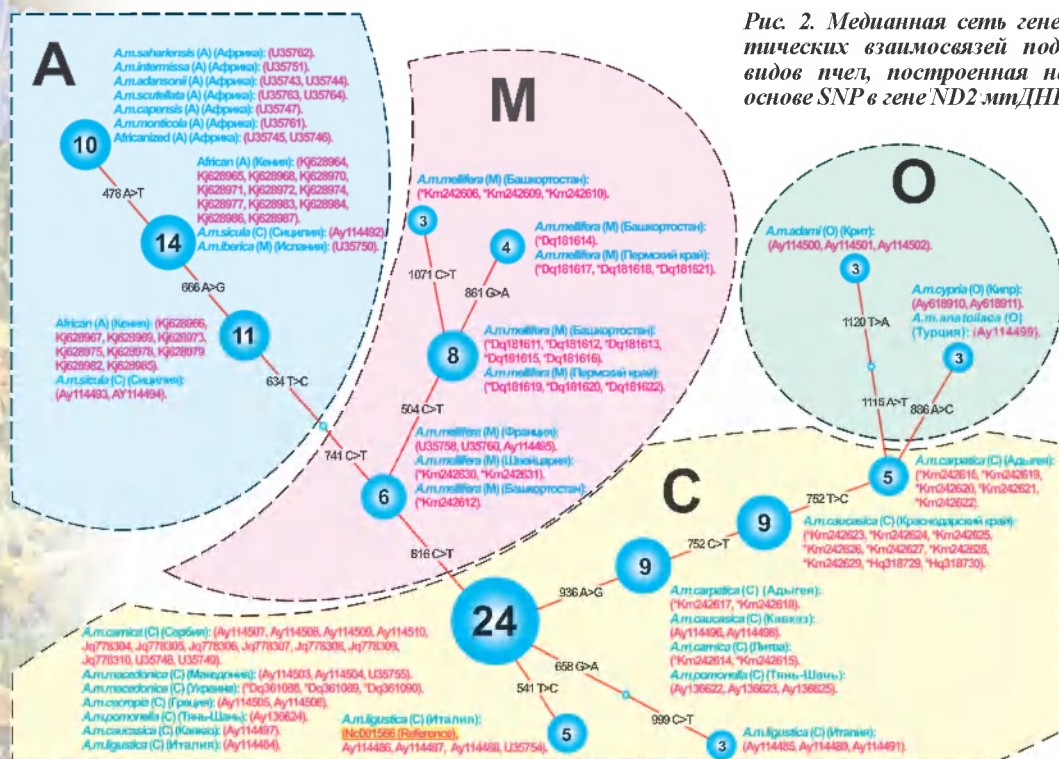


Рис. 2. Медианная сеть генетических взаимосвязей подвидов пчел, построенная на основе SNP в гене ND2 мтДНК

ния эволюционной ветви А. Такое положение можно объяснить следующим образом. Возможно, подвиды *A. m. iberica* и *A. m. sicula* — переходные формы между эволюционными ветвями А, М и С согласно гипотезе африканской экспансии на север.

Таким образом, в результате проведенного исследования нам удалось выделить семь информативных генов (ND2, ND4, ND4L, ND5, ND6, COI, COIII), позволяющих четко дифференцировать подвиды медоносной пчелы четырех эволюционных ветвей А, М, С, О. Анализ нуклеотидной последовательности гена ND2 мтДНК 117 образцов пчел 20 подвидов подтвердил его высокую информативность при дифференциации подвидов пчел четырех эволюционных ветвей. На примере сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена ND2 мтДНК мы показали высокий уровень дифференцирующей способности последнего и предполагаем возможность индивидуального использования каждого из семи генов для дифференциации подвидов пчел четырех эволюционных ветвей. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 13–04–01802 и 14–04–97084 р.поволжье.а.

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

Институт биохимии и генетики, Уфа

Анализ SNP 12 генов митохондриального генома медоносной пчелы позволил выделить 7 информативных генов, способных дифференцировать подвиды пчел эволюционных ветвей А, М, С, О. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена ND2 мтДНК 117 образцов пчел 20 подвидов подтвердил его высокую информативность при дифференциации пчел четырех эволюционных ветвей.

Ключевые слова: темная лесная пчела, подвиды пчел, митохондриальный геном, мтДНК, ген ND2, однонуклеотидные замены.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Методы идентификации подвидов *A. m. mellifera* пчелы медоносной // Пчеловодство. — 2008. — №8.
2. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Генетическая дифференциация локальных популяций темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // Генетика. — 2015. — Т. 51. — №7.
3. Arias M.C., Sheppard W.S. Molecular phylogenetics of honeybee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence // Mol. Phylogenet. Evol. — 1996. — V. 5.
4. Crozier R.H., Crozier Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization // Genetics. — 1993. — V. 133 (1).

5. Fuller Z.L., Nino E.L., Patch H.M. et al. Genome-wide analysis of signatures of selection in populations of African honey bees (*Apis mellifera*) using new web-based tools // BMC Genomics. — 2015. — V. 16 (518). DOI: 10.1186/s12864-015-1712-0.
6. Gibson J.D., Hunt G.J. The complete mitochondrial genome of the invasive Africanized Honey Bee, *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA. — 2014. DOI: 10.3109/19401736.2014.905858.
7. Haddad N.J. Mitochondrial genome of the Levant Region honeybee, *Apis mellifera syriaca* (Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA. — 2015. DOI: 10.3109/19401736.2014.1003846.
8. Hu P., Lu Z.X., Wang Y.Z. et al. Complete mitochondrial genome of the Algerian honeybee, *Apis mellifera intermissa* (Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA. — 2014. DOI: 10.3109/19401736.2014.963815.
9. Ilyasov R.A., Kutuev I.A., Petukhov A.V., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Phylogenetic relationships of dark European honeybees *Apis mellifera mellifera* L. from the Russian Ural and West European populations // Journal of Apicultural Science. — 2011. — V. 55 (1).
10. Pentek-Zakar E., Oleksa A., Borowik T., Kusza S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies // Ecology and Evolution. — 2015. doi: 10.1002/ece3.1781.
11. Whitfield C.W., Behura S.K., Berlocher et al. Thrive out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. Science. — 2006. — V. 314. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1132772>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ: Ильясов Руслан Абузарович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биохимии адаптивности насекомых Уфимского научного центра РАН, тел. (347) 235-60-88, e-mail: apismell@hotmail.com; Поскряков Александр Витальевич, канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории биохимии адаптивности насекомых Уфимского научного центра РАН, тел. (347) 235-60-88, e-mail: possash@yandex.ru; Николенко Алексей Геннадьевич, д-р биол. наук, проф., заведующий лабораторией биохимии адаптивности насекомых Уфимского научного центра РАН, тел. (347) 235-60-88, e-mail: a-nikolenko@yandex.ru.

THE INFORMATIVENESS OF THE MITOCHONDRIAL GENES OF THE HONEY BEE *APIS MELLIFERA*

R.A.Ilyasov, A.V.Poskryakov, A.G.Nikolenko

The SNP analysis of the 12 genes mitochondrial genome honey bee allow to find 7 informative genes which capable to differentiating subspecies from evolutionary lineages А, М, С, О. A comparative analysis of the nucleotide sequence the gene ND2 mtDNA of 117 samples honey bees of 20 subspecies confirmed his highly informative for differentiating the bees from four evolutionary lineages.

Keywords: dark European bees, subspecies of the honey bees, mitochondrial genome, gene ND2, single nucleotide polymorphism.