

# Эволюционные взаимоотношения кавказской и карпатской популяций медоносной пчелы

Медоносную пчелу (*Apis mellifera* L.) человек использует для производства продуктов пчеловодства и опыления сельскохозяйственных растений (Delaplane, Mayer, 2000; Klein et al., 2007; Ollerton et al., 2014). В результате эволюции сформировалось около 30 подвидов медоносной пчелы, распространенных в широком спектре климатических условий Старого Света (Papachristoforou et al., 2013; Tennant, Chadwick, 2016). Способность пчел хорошо приспосабливаться позволила человеку распространить их практически во всех странах мира (Ma et al., 2019; Zhang et al., 2020; Scott-Brown, Koch, 2020).

Несмотря на широкую экологическую пластичность, большую численность и широкое распространение, численность популяций пчел в мире ежегодно сокращается [2, 3]. Это происходит по разным причинам: применение пестицидов и инсектицидов в сельском хозяйстве, неконтролируемые массовые транспортировки пчел, внутривидовая гибридизация, распространение новых болезней, глобальные климатические изменения (Iwasa et al., 2004; Decourtye et al., 2004; Aubert et al., 2008; Genersch et al., 2010; Cornman et al., 2012; van der Zee et al., 2012; Haddad et al., 2016). Показано, что сокращение численности популяций медоносной пчелы будет вести к сокращению генетического разнообразия и адаптивности популяции, а также к снижению биоразнообразия экосистем (Franck et al., 2000; Palmer et al., 2000; Uzunov et al., 2009; Potts et al., 2010) [9].

Подвиды медоносной пчелы подразделяются как минимум на пять эволюционных линий: А — во всей Африке, М — в Западной Европе, С — в Восточной Европе, О — в Западной Азии, Y — в Северо-Восточной Африке и Юго-Западной Азии. Подвиды пчел разных линий отличаются между собой существенно подвидов из одной ли-

нии. Гибридизация подвидов пчел разных линий может иметь такие последствия, как сокращение численности популяции, снижение приспособленности и адаптивности, потеря хозяйственно полезных признаков (Özdil et al., 2012) [2, 3, 7].

Географически ареалы подвидов разных эволюционных линий имеют смежные границы и часто перекрываются, что привело к формированию гибридных зон на этих границах. Деятельность человека усилила формирование гибридных популяций пчел (Özdil et al., 2012) [2, 3, 7]. В мировом коммерческом пчеловодстве наиболее востребованы пчелы подвидов эволюционной линии С: *A. m. ligustica* Spinola, 1806; *A. m. carnica* Pollmann, 1889; *A. m. caucasia* Pollmann, 1889; *A. m. carpathica* Foti et al., 1965. Повсеместное использование пчел этих подвидов в пределах естественного распространения локальных подвидов привело к разрушению аборигенных генофондов многих подвидов Европы и Западной Азии. В России серая горная кавказская (*A. m. caucasia*) и карпатская (*A. m. carpathica*) пчелы наиболее распространены на пасеках после темной лесной (*A. m. mellifera*) пчелы (Franck et al., 2000; Palmer et al., 2000; Uzunov et al., 2009; Potts et al., 2010; Özdil et al., 2012) [2, 3, 7, 9].

Естественный ареал кавказской пчелы охватывает хребты и долины Кавказских гор и Восточную Анатолию (Ivanova et al., 2011), карпатской пчелы — хребты и долины Карпатских гор и Западную Трансильванию (Vouga et al., 2011). Эти пчелы идеально приспособлены к жаркому лету и умеренной зиме и являются незаменимыми компонентами природных экосистем Кавказских и Карпатских гор (Aizen et al., 2014; Ollerton et al., 2011; Tandon et al., 2016). В результате массовых транспортировок эти подвиды распростра-

нились на территориях Армении, Австрии, Азербайджана, Белоруссии, Болгарии, Чехии, Грузии, Венгрии, Польши, Румынии, Словакии, юга России, Турции, Украины и Узбекистана (Ivanova et al., 2011). Следствием такого широкого искусственного распространения данных подвидов стала массовая гибридизация и интрогрессия с подвидами, локальными для каждой местности, а также друг с другом (Bouga et al., 2011; Penteck-Zakar et al., 2015; Kukrer et al., 2018).

Кавказская и карпатская пчелы — наименее изученные с научной точки зрения подвиды, несмотря на востребованность и активное их использование. Часто эти подвиды упускаются и не упоминаются в списках подвидов (Franck et al., 2000; Maa, 1953; Smith et al., 1997; Kandemir et al., 2011) [4].

Подвид *A. m. carpathica* долгое время считался экотипом подвида *A. m. carnica* в Западной Румынии или *A. m. macedonica* в Восточной Румынии (Bouga et al., 2011) [4]. Другие авторы на основе морфометрии (Foti et al., 1965; Engel, 1999; Cauia et al., 2008; Mărghitaș et al., 2008; Teleky et al., 2007) [6] и митохондриальной ДНК (мтДНК) (Mărghitaș et al., 2009, 2010; Bouga et al., 2011; Coroian et al., 2014) [7, 11] признают таксономическую самостоятельность подвида *A. m. carpathica*. Существует неоднозначность и в определении принадлежности подвида *A. m. caucasica* к эволюционной линии, который на основе морфометрии (Kandemir et al., 2011; Adl et al., 2007; Meixner et al., 2007) [10] и аллозимов (Ivanova et al., 2011) был отнесен к линии O, а на основе мтДНК (Ivanova et al., 2011; Cornuet, Garnery, 1991; Garnery et al., 1992; Koulianos et al., 1997; Smith et al., 1997; Franck et al., 2000; Palmer et al., 2000; Smith et al., 2002; Mărghitaș et al., 2010; Özdil et al., 2012) — к линии C.

Идентификация подвида и выявление уровня интрогрессии служит основой для сохранения генофонда популяций пчел (Bouga et al., 2011; Kukrer et al., 2017). Нами определены нуклеотидные последовательности полной мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* с целью уточнения таксономического статуса и определения их филогенетических отношений. На основе анализа мтДНК мы показали, что данные подвиды относятся к эволюционной линии C и взаимодействуют между собой как два самостоятельных подвида.

Для исследования взрослых рабочих особей *A. m. caucasica* отобрали на пасеке в Сочинском районе Краснодарского края (43°45' с.ш.,

39°95' в.д), *A. m. carpathica* — на пасеке в Майкопском районе Республики Адыгея (44°61' с.ш. 40°07' в.д.). Принадлежность семей к указанным подвидам была предварительно подтверждена морфометрическим методом [1]. Тотальную ДНК экстрагировали из грудной мышечной ткани с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, Madison, WI, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы ДНК хранили при –20°C до дальнейшего использования.

Секвенирование мтДНК провели с помощью набора NextSeq 500/550 High Output Kit v. 2 (75 циклов) (ILLUMINA, США) с применением парных циклов считывания (2 x 150 п.н.) и использованием секвенатора Illumina Next Seq 500 (ILLUMINA, США) в Университете Киото Сангё (Япония), следуя инструкции производителя. Геномные библиотеки приготовили с помощью набора для подготовки ДНК-библиотеки Nextera (ILLUMINA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Сборку геномов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* проводили на основе 1662186 и 1541213 прочтений соответственно с средним покрытием 75 с помощью Geneious R9 (BIOMATTERS, Новая Зеландия). Аннотацию геномов выполнили с использованием MITOS (Universität Leipzig, Германия) (Bernt et al., 2013), Geneious R9 (BIOMATTERS, Новая Зеландия), Unipro UGENE 1.28 (UNIPRO, Россия), CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Denmark) и tRNAscan-SE (CA, США) (Lowe, Eddy, 1996).

Нуклеотидные последовательности полной мтДНК депонировали в базы данных генбанка GenBank/DBJ под номерами AP018404 для *A. m. caucasica* (16341 п.н.) и AP018403 для *A. m. carpathica* (16336 п.н.). Сравнительный анализ полной мтДНК провели в MEGA7 (Kumar et al., 2016) с использованием следующих последовательностей из генбанка: NC\_001566 (*A. m. ligustica*, Maryland, США) [5], KX908209 (*A. m. ligustica*, Gwangju, Корея) (Kim et al., 2016), KP163643 (*A. m. syriaca* Skorikov 1929) (Eimanifar et al., 2017), Ваqa (Иордания) (Haddad, 2016) и KY926882 (*A. m. syriaca*, Yunnan, Китай) (Eimanifar et al., 2017), *A. m. ligustica* NC\_001566 (16324 п.н.) (Bethesda, США) (референсная последовательность), *A. c. cerana* F. GQ162109 (15895 п.н.) (Yunnan, Китай) (Tan et al., 2011) (внешняя группа).

Выравнивание последовательностей межгеномной области *тPHK-Leu(UUR)-COX2* *A. m.*

*caucasia* и *A. m. carpathica* проводили с образцами нуклеотидных последовательностей из генбанка: *A. m. carnica* (FJ037782) гаплотип C19, *A. m. ligustica* (JF934709) гаплотип C33, *A. m. carnica* (JF934704) гаплотип C2, *A. m. carnica* (FJ037776) гаплотип C11, *A. m. ligustica* (FJ037780) гаплотип C17, *A. m. carnica* (FJ037781) гаплотип C18, *A. m. ligustica* (FJ037778) гаплотип C14, *A. m. carnica* (GQ433623) гаплотип C2], *A. m. ligustica* (FJ037777) гаплотип C12, *A. m. syriaca* (AY618918) гаплотип O, *A. m. syriaca* (AY618917) гаплотип O, *A. m. syriaca* (FJ477993) гаплотип O1b, *A. m. syriaca* (FJ037787) гаплотип O11, *A. m. syriaca* (FJ477992) гаплотип O1a, *A. m. syriaca* (AY618916) гаплотип O, *A. m. lamarckii* Cockerell 1906 (FJ477994) (Cockerell, 1906) гаплотип O1c, *A. m. syriaca* (FJ477997) гаплотип O3.

Дивергенцию нуклеотидных последовательностей и генетические дистанции Jukes-Cantor (Jukes, Cantor, 1969) рассчитывали с использованием *Unipro* UGENE 1.28 (UNIPRO, Россия) и CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания). Филогенетический анализ на основе последовательностей ДНК выполняли с применением MEGA7 (Kumar et al., 2016) и Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, США), JMP14 (SAS Institute Inc., North Carolina, США). Филогенетические деревья были построены с использованием метода ближайшего соседа (Saitou, Nei, 1987) на основе дистанций Jukes-Cantor с 1000 бутстреп репликациями. Физическая карта полного митохондриального генома была построена с использованием CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания) и Artemis 17.0.1 (The Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, Великобритания).

Размеры полной последовательности мтДНК *A. m. caucasia* (AP018404) — 16341 п.н. и *A. m. carpathica* (AP018403) — 16336 п.н. оказались немного длиннее последовательности мтДНК *Drosophila yakuba* (NC\_001322) — 16019 п.н. (рис. 1). Были рассчитаны соотношения нуклеотидов А, Т, G и С и наиболее важных пар АТ и GC полной мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica*. Среднее содержание нуклеотидов АТ — 84,9% и GC — 15,1% сходно с содержанием у *Drosophila melanogaster* (U37541) и подвидов *A. m. ligustica* и *A. m. syriaca*. Это может быть результатом частых замен пар CG на АТ в ходе эволюции [5].

Аналогично референсной последовательности *A. m. ligustica* (NC\_001566) последо-

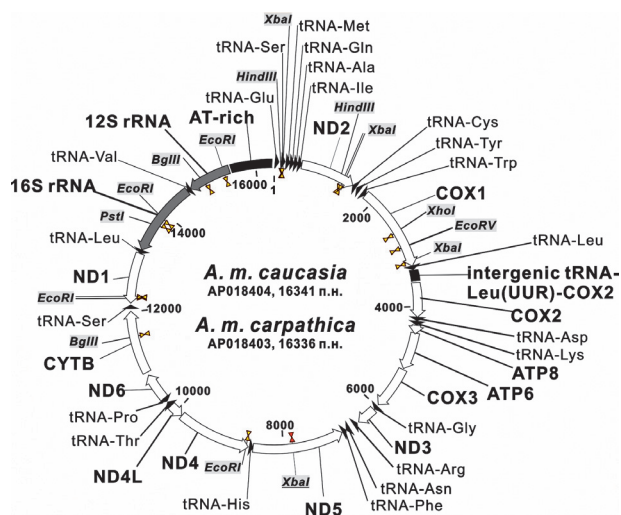


Рис. 1. Кольцевая физическая карта полной мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* (сайты распознавания рестрикционных ферментов выделены фоном, а уникальный сайт рестрикции, характерный только для *A. m. caucasia*, подчеркнут)

вательности мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* содержали 13 кодирующих белок генов, 22 гена тРНК, 2 гена рРНК и АТ-обогащенную контрольную область (табл. 1).

Тяжелая цепь мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* содержит 9 кодирующих белок генов (ND1, ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND4, ND5, ND6 и CYTB) (Авторы, верно? Перечислено 12?) и 14 генов тРНК [тРНК-Glu, тРНК-Ser(AGN), тРНК-Met, тРНК-Gln, тРНК-Ala, тРНК-Ile, тРНК-Trp, тРНК-Leu(UUR), тРНК-Asp, тРНК-Lys, тРНК-Gly, тРНК-Asn, тРНК-Thr и тРНК-Ser(UCN)], а легкая цепь мтДНК — 4 кодирующих белок гена (ND1, ND4, ND4L и ND5), 8 генов тРНК [тРНК-Cys, тРНК-Tyr, тРНК-Arg, тРНК-Phe, тРНК-His, тРНК-Pro, тРНК-Leu(CUN) и тРНК-Val] и 2 гена рРНК (12S рРНК и 16S рРНК).

Известно, что значение генетического разнообразия и варибельности зависит от содержания GC: чем выше содержание GC, тем выше варибельность генов (Kent et al., 2012). Было рассчитано содержание GC во всех генах мтДНК. Возможно, что наиболее варибельные кодирующие белок гены — COX1, COX2, CYTB, COX3, ND1, а наименее варибельные — ND4, ND3, ND2, ND6, ATP8. Поскольку содержание GC в мтДНК менее 40% считается низким (Kent et al., 2012), то, вероятно, большинство генов мтДНК высоко консервативны (см. табл. 1).

Была построена физическая карта полной мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*. При этом различия в синтении полной мтДНК этих подвидов с референсной последовательностью *A. m. ligustica* не обнаружены. Четыре пары генов *ND2* и *tPHK-Cys*, *ATP6* и *ATP8*, *COX1* и *tPHK-Leu(UUR)*, *COX2* и *tPHK-Asp* имели небольшие перекрывающиеся участки у обоих подвидов пчел (см. рис. 1).

### 1. Характеристика генов полной мтДНК пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*

Ген	Размер, п.н.	Содержание GC, %
<i>Кодирующие белок гены</i>		
<i>ND2</i>	1002	13,4
<i>COX1</i>	1566	24
<i>COX2</i>	678	19,6
<i>ATP8</i>	159	11,3
<i>ATP6</i>	681	15,3
<i>COX3</i>	780	17,2
<i>ND3</i>	354	13,6
<i>ND5*</i>	1665	14,2
<i>ND4*</i>	1311	13,7
<i>ND4L*</i>	264	14
<i>ND6</i>	504	12,5
<i>CYTB</i>	1152	19,1
<i>ND1*</i>	918	17,2
<i>tPHK</i>		
<i>tPHK-Glu</i>	66	4,5
<i>tPHK-Ser(AGN)</i>	61	19,7
<i>tPHK-Met</i>	66	21,2
<i>tPHK-Gln</i>	55	12,7
<i>tPHK-Ala</i>	70	10,0
<i>tPHK-Ile</i>	69	13,0
<i>tPHK-Cys*</i>	69	13,0
<i>tPHK-Tyr*</i>	68	11,8
<i>tPHK-Trp</i>	72	8,3
<i>tPHK-Leu(UUR)</i>	70	18,6
<i>tPHK-Asp</i>	69	10,1
<i>tPHK-Lys</i>	69	20,3
<i>tPHK-Gly</i>	66	7,6
<i>tPHK-Arg*</i>	67	13,4
<i>tPHK-Asn</i>	69	14,5
<i>tPHK-Phe*</i>	69	11,6
<i>tPHK-His*</i>	68	14,7
<i>tPHK-Thr</i>	59	8,5
<i>tPHK-Pro*</i>	69	14,5
<i>tPHK-Ser(UCN)</i>	67	13,4
<i>tPHK-Leu(CUN)*</i>	71	12,7
<i>tPHK-Val*</i>	70	11,4
<i>pPHK</i>		
<i>16S pPHK*</i>	1362	15,6
<i>12S pPHK*</i>	818	3,4

\*Гены, расположенные на легкой цепи мтДНК.

Кодирующие белок гены мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* аналогично референсной последовательности *A. m. ligustica* имеют один тип стоп-кодона TAA и четыре типа стартовых кодонов: ATG — гены *ATP6*, *COX3*, *CYTB*; ATA — гены *COX1*, *ND3*, *ND4*; ATT — гены *COX2*, *ATP8*, *ND1*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*; ATC — ген *ND2*.

В мтДНК *A. m. caucasica*, *A. m. carpathica* и референсной последовательности *A. m. ligustica* имеются по два гена изоакцепторных tPHK для аминокислот серин (Ser) и лейцин (Leu). Первая *tPHK-Ser(AGN)* распознает кодон AGN по антикодону TCT, расположенному на тяжелой цепи в положении 138-140, а вторая *tPHK-Ser(UCN)* распознает кодон UCN по антикодону TGA, расположенному на тяжелой цепи в положении 12230-12232 относительно референсной последовательности *A. m. ligustica*. Первая *tPHK-Leu(UUR)* распознает кодон UUR по антикодону TAA, расположенному на тяжелой цепи в положении 3388-3390, а вторая *tPHK-Leu(CUN)* распознает кодон CUN по антикодону TAG, расположенному на легкой цепи в положении 13267-13269 относительно референсной последовательности *A. m. ligustica*. Очевидно, что присутствие этих двух изоакцепторных генов tPHK в одной мтДНК является результатом адаптивной эволюции медоносных пчел, которая обеспечивает гарантированную бесперебойную трансляцию наиболее важных белков и пептидов.

Общими для полной мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* являются 15 сайтов рестрикции, тогда как сайт рестрикции *XbaI* (T↓CTAGA) в гене *ND5* мтДНК в положении 7825 — 7830 относительно референсной последовательности *A. m. ligustica* был характерен только для *A. m. caucasica*, но не для *A. m. carpathica*. Данный сайт рестрикции мтДНК появился у *A. m. caucasica* благодаря SNP 7830C>A, которая изменила последовательность TCTAGC в TCTAGA — сайт распознавания *XbaI*.

Окончание следует

Р.А. ИЛЬЯСОВ<sup>1, 2</sup>, Г.Ю. ХАН<sup>2</sup>, М.Л. ЛИ<sup>2</sup>,  
К.В. КИМ<sup>2</sup>, Д.Х. ПАРК<sup>2, 3</sup>, Д.И. ТАКАХАШИ<sup>4</sup>,  
Х.В. КВОН<sup>2</sup>, А.Г. НИКОЛЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, г. Уфа,

<sup>2</sup>Отделение наук о жизни и Исследовательский центр насекомых переносчиков болезней, Инчхонский национальный университет, Инчхон, Корея

<sup>3</sup>Биоинформатическая компания ZBIGS CO. LTD, Хвасон-си, Корея

<sup>4</sup>Факультет естественных наук, Университет Киото Сангё, Киото, Япония