

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ЭВОЛЮЦИЯ
УССУРИЙСКОЙ ВОСКОВОЙ ПЧЕЛЫ *Apis cerana ussuriensis*
ИЗ ПРИМОРСКОГО КРАЯ РОССИИ

© 2021 г. Р. А. Ильясов^{1,2,*}, Г. Ю. Хан², М. Л. Ли², К. В. Ким², М. Ю. Прощалькин³,
А. С. Лелей³, Д. Х. Парк^{2,4}, Д. И. Такахаша⁵, Х. В. Квон^{2,**}, А. Г. Николенко¹

¹Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Отделение наук о жизни и Исследовательский центр насекомых-переносчиков болезней,
Инчхонский национальный университет, Инчхон, 22012 Корея

³Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

⁴Биоинформатическая компания 3BIGS CO. LTD, Хвасон-си, 18454 Корея

⁵Факультет естественных наук, Университет Киото Сангё, Киото, 603-8555 Япония

*e-mail: apismell@hotmail.com

**e-mail: hwkwon@inu.ac.kr

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

После доработки 04.09.2020 г.

Принята к публикации 09.10.2020 г.

Apis cerana ussuriensis Piyasov et al., 2019 — самый северный подвид восковой пчелы *A. cerana* Fabricius, 1793, распространенный в лесах Приморского и Хабаровского краев до 47°54' с.ш. Генетические исследования этого подвида представляют большой интерес для науки и пчеловодства, поскольку все адаптивные признаки сформировались под действием окружающей среды без участия человека. Мы секвенировали и аннотировали последовательности полной митохондриальной ДНК (мтДНК) пчел подвидов *Apis cerana ussuriensis* Piyasov et al., 2019 (номер в Генбанке AP018450) из Приморского края и *Apis cerana koreana* Piyasov et al., 2019 (AP018431) из Южной Кореи и шести экзонов гена вителлогенина *VG E2–E7* ядерной ДНК (ядДНК) подвидов пчел *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica* Radoszkowski, 1887, *A. c. cerana* и *A. c. indica* Fabricius, 1798. Методом кластерного анализа последовательностей мтДНК и гена *VG* яДНК было показано разделение пчел на две группы, включающие южный подвид *A. c. indica* и северные подвиды *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*. На основе генетической дивергенции было показано, что подвид *A. c. ussuriensis* генетически ближе к подвидам *A. c. japonica*, *A. c. koreana* и *A. c. cerana* чем к подвиду *A. c. indica*. Значения генетической дивергенции (0.80–8.00%) и генетической дистанции Jukes–Cantor (0.005–0.100) по мтДНК и гену *VG* яДНК между подвидами *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica* находятся в пределах внутривидовых различий между подвидами насекомых. Предположительное время возникновения подвидов *A. cerana* — от двух до одного млн лет назад.

Ключевые слова: *Apis cerana*, *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica*, митохондриальный геном, подвид, дивергенция, эволюция, Приморский край, вителлогенин, мтДНК, яДНК.

DOI: 10.31857/S0016675821050039

Восковая пчела *Apis cerana* Fabricius, 1793 является второй по значимости для человека после медоносной пчелы *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Их естественные ареалы не перекрывались до настоящего времени и были ограничены Европой и Африкой у *A. mellifera* и Азией у *A. cerana*. Оба вида пчел приспособлены к обитанию в широком диапазоне климатических поясов — от холодного умеренного до жаркого экваториального [1]. В азиатских странах *A. cerana* разводится на пасеках, а в России встречается только в диком состо-

янии в дальневосточных лесах на территориях Хабаровского и Приморского краев до 47°54' с.ш. и включен в красную книгу [2, 3]. В.Н. Кузнецов [3] обнаружил 80 деревьев, в дуплах которых обитали дикие семьи *A. cerana*, и предположил, что в лесах Приморского и Хабаровского краев до 47°54' с.ш. обитают более 1000 семей китайской восковой пчелы.

Восковая пчела *A. cerana* является важным и известным опылителем сельскохозяйственных

культур в Азии и производителем меда, воска, маточного молочка и пчелиной пыльцы [4], не уступает медоносной пчеле *A. mellifera* по уровню коммерческого использования и обладает высоким потенциалом для генетического улучшения путем селекции на основе молекулярных маркеров. В последнее время численность *A. cerana* резко сократилась в странах Азии в связи с распространением вируса мешотчатого расплода (SBV) и массового импорта *A. mellifera* [5–7].

Согласно опубликованным данным внутри *A. cerana* выделяется более 20 подвидов, большинство из которых не имеют четких таксономических диагнозов [8–19]. Сохранение генофонда локальных подвидов *A. cerana* возможно при маркер-опосредованной идентификации и селекции. Молекулярно-генетические исследования позволяют разработать базовые стратегии сохранения *A. cerana*. Маркеры митохондриальной ДНК (мтДНК) являются эффективными инструментами в исследовании эволюции и межвидовых и внутривидовых филогенетических взаимоотношений медоносных пчел [18, 20–25].

В настоящей работе мы секвенировали и аннотировали последовательности полной митохондриальной ДНК (мтДНК) пчел подвидов *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 (GenBank/DBJ AP018450) (ZooBank 06874b0a-029b-40e2-b4a8-1a20f7692ed3) из Приморского края и *Apis cerana koreana* Ilyasov et al., 2019 (GenBank/DBJ AP018431) (ZooBank 290e12ba-fc5f-4907-ae50-ef0fa8dc8d9c) из Южной Кореи и шести экзонов гена вителлогенина *VG E2–E7* ядерной ДНК (ядНК) подвидов пчел *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana* и *A. c. indica*. Была проведена оценка филогенетических взаимоотношений *A. c. ussuriensis* с другими подвидами из Южной Кореи, Китая, Японии, Тайваня и Индонезии на основе полной мтДНК и гена *VG* яДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было отобрано по 10 взрослых особей рабочих пчел из следующих семей: *A. c. ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 из дупла в лесном массиве пригорода Владивостока, Приморский край, Россия (43°11' с.ш. 132°55' в.д.); *A. c. koreana* Ilyasov et al., 2019 с пасеки Gokseong-gun, Gokseong-eup, Nakjung-ri, Jeollanam-do, Южная Корея (35°24' с.ш., 127°27' в.д.), с пасеки Sangju-si, Gyeongsangbuk-do, Южная Корея (36°42' с.ш., 128°18' в.д.), с пасеки Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do, Южная Корея (35°36' с.ш., 128°88' в.д.); *A. c. japonica* с пасеки Kitahiroshima, Hokkaido, Япония (42°95' с.ш., 141°53' в.д.); *A. c. indica* с пасеки Taichung, Тайвань (24°04' с.ш., 120°73' в.д.). Видовая принадлежность пчел *A. cerana* была определена морфометрически согласно В.Н. Кузнецову [3].

Тотальную ДНК экстрагировали из грудной мышечной ткани каждой пчелы 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. Полимеразную цепную реакцию экзонов 2–7 гена вителлогенина (*VG*) проводили на 96-луночном термоциклере Applied Biosystems Veriti HiD на основе уже разработанных праймеров [26] с набором для ПЦР TaKaRa (100 мкл ПЦР × 100 реакций) (TAKARA BIO INC., Shiga, Япония) в соответствии с инструкциями производителя. Все продукты ПЦР были очищены с помощью набора для очистки ПЦР QIAquick (250) (QIAGEN, Hilden, Германия), следуя инструкциям производителя.

По одной рабочей особи из каждой семьи пчел было использовано для секвенирования мтДНК с помощью набора NextSeq 500/550 High Output Kit v. 2 (75 циклов) (ILLUMINA, США) и парных циклов считывания (2 × 150 пн), следуя инструкции производителя, на секвенаторе Illumina NextSeq 500 (ILLUMINA, США) в Университете Киото Сангё (Kyoto, Япония). Геномные библиотеки были приготовлены с помощью набора для подготовки ДНК-библиотеки Nextera (ILLUMINA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Сборка геномов проводилась на основе 1662000 прочтений со средним покрытием 75 с помощью Geneious R9 (BIOMATTERS, Новая Зеландия). Аннотация геномов выполнена на MITOS (Германия) [27] и tRNAscan-SE (СА, США) [28]. По одной рабочей особи из каждой семьи пчел было использовано для секвенирования экзонов гена вителлогенина *VG* яДНК с обоих концов с помощью дидезокси-метода Sanger [29] с использованием набора ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 на секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, США) в Инчхонском национальном университете (Incheon, Южная Корея).

Нуклеотидные последовательности полной мтДНК были депонированы в базы данных GenBank/DBJ под номерами AP018431 для *A. c. koreana* (15925 пн) (ZooBank 290e12ba-fc5f-4907-ae50-ef0fa8dc8d9c) (Gokseong-gun, Jeollanam-do, Южная Корея) и AP018450 для *A. c. ussuriensis* (15919 пн) (ZooBank 06874b0a-029b-40e2-b4a8-1a20f7692ed3) (Приморский край, Россия). Нуклеотидные последовательности экзонов 2–7 гена *VG* были депонированы под номерами MH755745, MH755780, MH755815, MH755850, MH755885, MH755920 (4125 пн) и MH755746, MH755781, MH755816, MH755851, MH755886, MH755921 (4125 пн) для двух представителей *A. c. ussuriensis* (Приморский край, Россия); под номерами MH755735, MH755770, MH755805, MH755840, MH755875, MH755910 для *A. c. koreana* (Sancheong,

Gyeongsangnam-do, Южная Корея); МН755741, МН755776, МН755811, МН755846, МН755881, МН755916 (4125 пн) и МН755742, МН755777, МН755812, МН755847, МН755882, МН755917 (4125 пн) для *A. c. japonica* (Kitahiroshima, Hokkaido, Япония); МН755747, МН755782, МН755817, МН755852, МН755887, МН755922 (4128 пн) и МН755748, МН755783, МН755818, МН755853, МН755888, МН755923 (4128 пн) для *A. c. indica* (Taichung, Тайвань).

Сравнительный анализ полной мтДНК был проведен с использованием последовательностей из Генбанка: *A. c. japonica* AP017314 (15917 пн) (Kyoto, Япония), *A. c. japonica* AP017941 (15778 пн) (Amami, Япония), *A. c. cerana* AP017983 (15460 пн) (Jiangsu, Китай), *A. c. cerana* KM244704 (15712 пн) (Yunnan, Китай), *A. c. indica* AP017984 (15376 пн) (Taipei, Тайвань), *A. c. indica* AP018149 (15884 пн) (Sabah, Борнео, Малайзия), *A. c. koreana* AP018431 (15925 пн) (Jeollanam-do, Южная Корея), *A. c. koreana* KX908206 (15904 пн) (Chungcheongbukdo, Южная Корея), *A. m. ligustica* NC 001566 (16324 пн) (внешняя группа, США). Сравнительный анализ гена *VG* мтДНК был проведен с использованием последовательностей из Генбанка: *A. c. cerana* KT725235 (4125 пн) (Yunnan, Китай), *A. c. cerana* ApisCC1.0 (4125 пн, фрагмент 781683–788069 из геномной последовательности KZ288206) (Yunnan, Китай), *A. m. mellifera* JN557295, JN557387, JN557201, JN557573, JN557481, JN557109 (4074 пн) (внешняя группа, изолят M2261, Warsaw, Польша).

Дивергенция нуклеотидных последовательностей и генетические дистанции Jukes–Cantor [30], Tamura–Nei [31] и *p*-distance [32] были рассчитаны с использованием Unipro UGENE 1,28 (UNIPRO, Россия) и CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания). Филогенетический анализ на основе последовательностей ДНК был проведен с использованием MEGA7 [33] 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 [34] на основе дистанций Jukes–Cantor с 1000 бутстреп-репликациями и Reltime [35] метода оценки длины ветвей. 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).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Митохондриальный геном *A. c. ussuriensis* (Приморский край, Россия) содержит 42% А, 42% Т, 6% G, 10% С нуклеотидов, обогащен АТ на 84%, содержит наиболее высокие частоты динуклеотидов АА (19%), АТ (18%), ТТ (18%) и ТА (16%) и наиболее низкие частоты динуклеотидов GG

(1%), GC (1%), CG (1%) и CC (2%), что характерно для большинства перепончатокрылых [25, 36, 37]. Среднее содержание GC в мтДНК *A. c. ussuriensis* составляет 16%, а максимальный уровень не превышает 40%. Значение генетического разнообразия и варибельности зависит прямо пропорционально от GC-состава – чем выше содержание GC, тем выше генетическое разнообразие и варибельность генов. Содержание GC в мтДНК менее 40% считается низкой [38] (табл. 1).

МтДНК *A. c. ussuriensis* (15919 пн) незначительно короче мтДНК *A. mellifera* (16343 пн) и *Drosophila yakuba* (16019 пн). Сумма всех межгенных некодирующих регионов мтДНК *A. c. ussuriensis* (1252 пн) также немного короче *A. mellifera* (1639 пн) и *D. yakuba* (1262 пн) [36].

Митохондриальный геном *A. c. ussuriensis* содержит 30 белок-кодирующих генов (CDS), 22 гена транспортной РНК (tRNA), два гена субъединиц рибосомальной РНК (rRNA) – *16S rRNA* и *12S rRNA*, четыре некодирующих межгенных участка (*NC1–NC4*). Синтения мтДНК *A. c. ussuriensis* сходна с синтением мтДНК большинства перепончатокрылых с небольшими различиями [25, 36]. Большинство генов (*ATP6*, *ATP8*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *CYTB*, *ND2*, *ND3*, *ND6*, *tRNA-Ala*, *tRNA-Asn*, *tRNA-Asp*, *tRNA-Gln*, *tRNA-Glu*, *tRNA-Gly*, *tRNA-Ile*, *tRNA-Leu(UUR)*, *tRNA-Lys*, *tRNA-Met*, *tRNA-Ser(AGN)*, *tRNA-Ser(UCN)*, *tRNA-Thr* и *tRNA-Trp*) расположены на легкой цепи мтДНК, за исключением четырех генов субъединиц (*ND1*, *ND4*, *ND4L* и *ND5*), двух генов rRNA (*12S* и *16S rRNA*) и восьми генов тРНК (*tRNA-Arg*, *tRNA-Cys*, *tRNA-His*, *tRNA-Leu(CUN)*, *tRNA-Phe*, *tRNA-Pro*, *tRNA-Tyr* и *tRNA-Val*), которые расположены на тяжелой цепи мтДНК (табл. 2, рис. 1).

Белок-кодирующие гены *ND3*, *ND4L*, *ND5*, *COX1*, *ND6*, *COX2*, *ND1*, *ND2* имеют стартовый кодон АТТ, гены *COX3*, *ATP6* и *CYTB* – стартовый кодон АТG, ген *ND4* – стартовый кодон АТA, ген *ATP8* – стартовый кодон АТC. Все белок-кодирующие гены мтДНК *A. c. ussuriensis* имеют единый стоп-кодон ТAА. Для некоторых генов мтДНК (*tRNA-Gln* и *tRNA-Ala* (4 пн), *ND2* и *tRNA-Cys* (1 пн), *COX1* и *tRNA-Leu(UUR)* (5 пн), *COX2* и *tRNA-Asp* (1 пн), *ATP8* и *ATP6* (19 пн)) *A. c. ussuriensis* характерно перекрывание, что возможно унаследовано от прокариотического генома с полицистронным типом транскрипции (табл. 2).

Размер всех белок-кодирующих генов мтДНК *A. c. ussuriensis* 11058 пн, они кодируют 3686 аминокислот. Гены rRNA мтДНК *A. c. ussuriensis* имеют суммарный размер 2116 пн (*12S rRNA* – 787 пн и *16S rRNA* – 1329 пн). Размеры генов тРНК мтДНК *A. c. ussuriensis* варьируют от 60 пн (*tRNA-Ser(AGN)*) до 78 пн (*tRNA-Pro*).

МтДНК *A. c. ussuriensis* содержит четыре некодирующих межгенных участка (*NC1–NC4*), что

Таблица 1. Характеристика нуклеотидного состава полной мтДНК *A. c. ussuriensis* Приморского края России

Нуклеотиды	Число (частота)
GC-состав	2540 (0.16)
AT-состав	13373 (0.84)
Аденин А	6729 (0.42)
Цитозин С	1542 (0.10)
Гуанин G	998 (0.06)
Тимин Т	6644 (0.42)
Динуклеотид AA	2973 (0.19)
Динуклеотид AC	475 (0.03)
Динуклеотид AG	358 (0.02)
Динуклеотид AT	2921 (0.18)
Динуклеотид CA	675 (0.04)
Динуклеотид CC	239 (0.02)
Динуклеотид CG	70 (0.01)
Динуклеотид CT	558 (0.04)
Динуклеотид GA	471 (0.03)
Динуклеотид GC	116 (0.01)
Динуклеотид GG	136 (0.01)
Динуклеотид GT	275 (0.02)
Динуклеотид TA	2609 (0.16)
Динуклеотид TC	712 (0.05)
Динуклеотид TG	432 (0.03)
Динуклеотид TT	2886 (0.18)
Нуклеотид А в позиции 1/2/3	240 (0.47)/128 (0.25)/249 (0.48)
Нуклеотид С в позиции 1/2/3	37 (0.07)/70 (0.14)/22 (0.04)
Нуклеотид G в позиции 1/2/3	50 (0.1)/19 (0.04)/11 (0.02)
Нуклеотид Т в позиции 1/2/3	188 (0.37)/298 (0.58)/233 (0.45)
Размер, пн	15919
Вес одной цепи, кДа	4904.98

характерно для всех представителей *A. cerana* [39]. Некодирующий межгенный участок *NC1* (228 пн) расположен между генами *tRNA-Met* и *tRNA-Gln*, *NC2* (89 пн) – между генами *tRNA-Leu* (TAA) и *COX2*, *NC3* (68 пн) – между генами *COX3*, *tRNA-Gly*, *NC4* (51 пн) – между генами *tRNA-Pro* и *ND6*. Все не кодирующие межгенные и AT-богатые участки *A. c. ussuriensis* составляют менее 8% от всего размера мтДНК. Некодирующие межгенные и AT-богатые участки являются регуляторными областями и содержат повторяющиеся мотивы. Мотив ААТГААТТ встречался в мтДНК *A. c. ussuriensis* 48 раз, мотив ААТАААТТ – 74 раза, мотив ТАСТТА (вероятный сайт связывания митохондриального терминатора транскрипции (mtTERM)) – 8 раз [40].

Некодирующий межгенный участок *NC2* *A. c. ussuriensis* идентичен с гаплотипом *Japan01* (последовательности КР064995 и АР018431), он не обладает идентичностью ни с одним из 10 опу-

ликованных гаплотипов (*ACNC101–ACNC110*) [18, 19, 39] и был обозначен как гаплотип *ACNC111* (рис. 2). Гаплотип *ACNC111* наиболее близок к гаплотипу *ACNC101* (последовательности КР064870 и КР064972) и отличается вставкой 31insT относительно начала последовательности *NC1* (рис. 2).

Сравнительный анализ последовательности полной мтДНК позволил рассчитать транзиции и трансверсии между представителями *A. cerana* разных популяций. Сходно с геномами большинства организмов, транзиции у *A. cerana* происходят чаще, чем трансверсии. Были рассчитаны транзиции и трансверсии между представителями *A. cerana* разных популяций для всей мтДНК, а также только для белок-кодирующих генов мтДНК. Это позволяет оценить вклад кодирующей и не кодирующей частей митохондриального генома в генетическую вариабельность. Отмечено, что роль не кодирующей части мтДНК в под-

Таблица 2. Аннотация полной мтДНК *A. c. ussuriensis* Приморского края России

№	Ген	Позиция начала	Позиция конца	Размер, пн
1	<i>tRNA-Ser</i> (AGN)	1	60	60
2	<i>tRNA-Glu</i>	64	129	66
3	<i>tRNA-Met</i>	164	229	66
4	<i>tRNA-Gln</i>	462	527	66
5	<i>tRNA-Ala</i>	524	589	66
6	<i>tRNA-Ile</i>	608	673	66
7	<i>ND2</i>	674	1669	996
8	* <i>tRNA-Cys</i>	1669	1734	66
9	* <i>tRNA-Tyr</i>	1740	1808	69
10	<i>tRNA-Trp</i>	1825	1893	69
11	<i>COX1</i>	1894	3459	1566
12	<i>tRNA-Leu</i> (UUR)	3455	3524	70
13	<i>COX2</i>	3614	4294	681
14	<i>tRNA-Asp</i>	4294	4361	68
15	<i>tRNA-Lys</i>	4368	4439	72
16	<i>ATP8</i>	4446	4607	162
17	<i>ATP6</i>	4589	5266	678
18	<i>COX3</i>	5284	6063	780
19	<i>tRNA-Gly</i>	6136	6202	67
20	<i>ND3</i>	6203	6556	354
21	* <i>tRNA-Arg</i>	6577	6645	69
22	<i>tRNA-Asn</i>	6665	6732	68
23	* <i>tRNA-Phe</i>	6751	6821	71
24	* <i>ND5</i>	6828	8495	1668
25	* <i>tRNA-His</i>	8496	8561	66
26	* <i>ND4</i>	8579	9910	1332
27	* <i>ND4L</i>	9913	10176	264
28	<i>tRNA-Thr</i>	10200	10266	67
29	* <i>tRNA-Pro</i>	10282	10359	78
30	<i>ND6</i>	10411	10923	513
31	<i>CYTB</i>	10936	12084	1149
32	<i>tRNA-Ser</i> (UCN)	12108	12174	67
33	* <i>ND1</i>	12187	13101	915
34	* <i>tRNA-Leu</i> (CUN)	13102	13170	69
35	* <i>16S rRNA</i>	13171	14499	1329
36	* <i>tRNA-Val</i>	14500	14566	67
37	* <i>12S rRNA</i>	14567	15353	787
	Вся мтДНК	1	15919	15919

* Гены, транскрибирующиеся с тяжелой цепи мтДНК.

держании генетической вариабельности выше кодирующей (табл. 3).

Дивергенция (%) и генетические дистанции между *A. c. japonica* и *A. c. cerana* – 2.85 и 0.80 по мтДНК и гену *VG* яДНК соответственно; между

A. c. japonica и *A. c. indica* – 5.26 и 0.85; между *A. c. japonica* и *A. c. koreana* – 1.33 и 0.80; между *A. c. cerana* и *A. c. indica* 4.95 и 0.80; между *A. c. cerana* и *A. c. koreana* – 2.85 и 0.80; между *A. c. koreana* и *A. c. indica* – 5.45 и 0.88; между *A. c. ussuriensis* и *A. c. cerana* – 2.55 и 1.25; между *A. c. ussuriensis* и

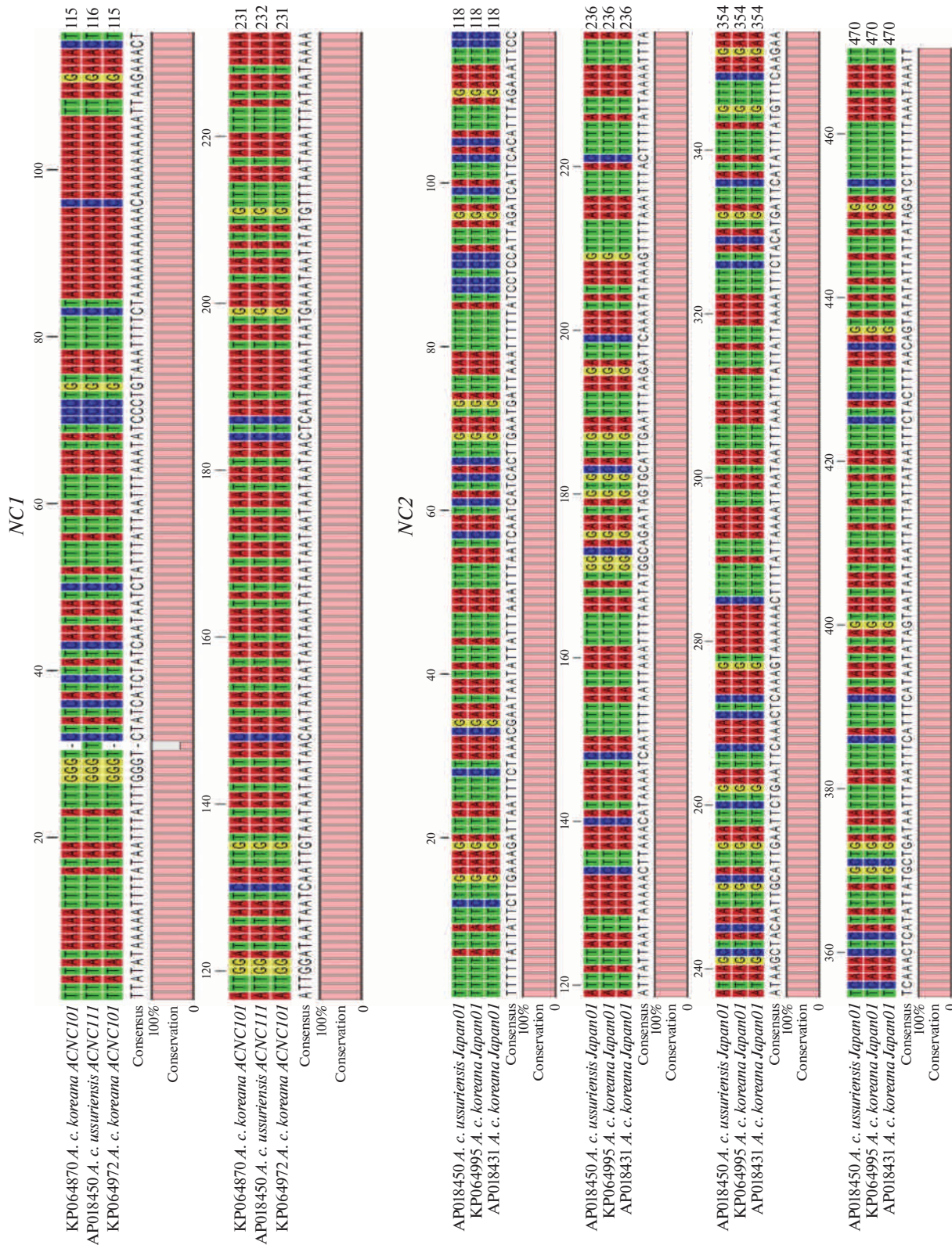


Рис. 2. Выравнивание последовательностей двух некодирующих межгенных областей NC1 и NC2 *Apis c. ussuriensis* Приморского края России с гаплотипами ACNC101 и Japan01.

Таблица 3. Транзиции и трансверсии последовательности полной мтДНК между представителями *A. segeta* разных популяций

Представители <i>A. segeta</i>	Транзиции полной мтДНК/белок-кодирующих генов мтДНК									
	AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия	KM244704, <i>A. c. segeta</i> , Yunnan, Китай	AP017983, <i>A. c. segeta</i> , Jiangsu, Китай	AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	AP017984, <i>A. c. indica</i> Taipei, Тайвань	AP018149, <i>A. c. indica</i> Sabah, Borneo, Малайзия	NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США
AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия	29/12	26/15	15/5	14/5	18/8	42/10	99/65	308/138	1506/957	
KM244704, <i>A. c. segeta</i> , Yunnan, Китай		9/3	17/9	17/9	21/12	53/18	88/59	274/130	1438/950	
AP017983, <i>A. c. segeta</i> , Jiangsu, Китай	64/52		14/12	14/12	18/15	50/21	85/58	225/131	1367/951	
AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	29/21	70/60		2/1	9/5	43/13	89/62	311/135	1492/953	
AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	30/23	61/51	9/8		6/5	45/13	89/62	285/135	1452/952	
KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	38/25	73/54	30/18	31/20		48/16	92/65	316/136	1498/955	
AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	40/24	63/48	45/33	45/35	39/23		122/71	317/142	1510/959	
AP017984, <i>A. c. indica</i> , Taipei, Тайвань	237/197	251/209	244/206	242/204	253/207	245/204		228/139	1320/947	
AP018149, <i>A. c. indica</i> , Sabah, Borneo, Малайзия	339/272	337/273	338/278	342/280	355/281	337/274	345/294		1492/931	
NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США	715/550	713/554	718/557	710/554	725/558	709/546	691/543	694/539		

Таблица 4. Генетические дистанции (выше диагонали) и генетические различия (ниже диагонали) между последовательностями полной мтДНК образцов *A. cerana*

Представители <i>A. cerana</i>	AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия	KM244704, <i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	AP017983, <i>A. c. cerana</i> , Jiangsu, Китай	AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	AP017984, <i>A. c. indica</i> Taipei, Тайвань	AP018149, <i>A. c. indica</i> Sabah, Borneo, Малайзия	NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США
AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия		0.006/ 0.002/ 0.002	0.006/ 0.002/ 0.002	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.006/ 0.006	0.042/ 0.013/ 0.013	0.159/ 0.097/ 0.088
KM244704, <i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	1.8/ 85/ 13		0.002/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.007/ 0.003/ 0.003	0.022/ 0.005/ 0.005	0.040/ 0.013/ 0.013	0.155/ 0.096/ 0.087
AP017983, <i>A. c. cerana</i> , Jiangsu, Китай	3.3/ 90/ 16	1.5/ 35/ 5		0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.008/ 0.003/ 0.003	0.022/ 0.005/ 0.005	0.037/ 0.013/ 0.013	0.152/ 0.096/ 0.087
AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	0.9/ 44/ 7	2.8/ 77/ 13	3.5/ 84/ 16		0.002/ 0.001/ 0.001	0.003/ 0.001/ 0.001	0.003/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.005/ 0.005	0.042/ 0.014/ 0.014	0.158/ 0.096/ 0.087
AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	1.2/ 44/ 8	2.2/ 78/ 14	2.9/ 85/ 17	0.7/ 11/ 3		0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.005/ 0.005	0.041/ 0.014/ 0.014	0.156/ 0.096/ 0.087
KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	1.1/ 56/ 13	1.9/ 94/ 19	3.4/ 98/ 22	0.9/ 39/ 12	1.2/ 37/ 13		0.003/ 0.003/ 0.003	0.023/ 0.006/ 0.006	0.044/ 0.014/ 0.014	0.159/ 0.096/ 0.087
AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	1.5/ 82/ 12	2.4/ 116/ 19	3.9/ 123/ 22	1.3/ 88/ 15	1.9/ 90/ 16	1.1/ 87/ 17		0.024/ 0.007/ 0.008	0.043/ 0.014/ 0.014	0.159/ 0.097/ 0.088
AP017984, <i>A. c. indica</i> , Taipei, Тайвань	5.5/ 336/ 46	4.5/ 339/ 48	3.1/ 338/ 47	5.7/ 333/ 45	5.12/ 331/ 44	5.6/ 345/ 51	6.1/ 367/ 52		0.038/ 0.014/ 0.014	0.148/ 0.095/ 0.087
AP018149, <i>A. c. indica</i> , Sabah, Borneo, Малайзия	4.8/ 647/ 89	5.5/ 611/ 88	6.7/ 559/ 85	4.9/ 649/ 87	5.3/ 627/ 90	4.9/ 671/ 93	5.2/ 654/ 95	6.9/ 573/ 93		0.156/ 0.095/ 0.087
NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США	20.6/ 2221/ 585	21.2/ 2151/ 585	22.2/ 2071/ 583	20.5/ 2210/ 581	20.9/ 2162/ 580	20.5/ 2223/ 588	20.6/ 2219/ 587	22.2/ 2011/ 584	20.5/ 2186/ 590	

ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание АТ-нуклеотидов в полной последовательности мтДНК *A. c. ussuriensis* 84% было сходно с другими насекомыми: *A. c. cerana* – 84%, *A. c. koreana* – 84.1%, *A. mellifera* – 84.9%, *Bombus hypocrita* – 85.3%, *B. ignitus* – 86.8%, *Cephus cinctus* – 82%, *Enicospilus* sp. – 85.2%, *Melipona bicolor* – 86.7%, *Polistes humilis* – 84.7% и *Spathius agrili* – 84% [18, 25].

Филогенетический анализ последовательности некодирующего межгенного участка *NC1* выявил девять гаплотипов *A. cerana* (*ACNC101*, *ACNC102*, *ACNC103*, *ACNC104*, *ACNC105*, *ACNC106*, *ACNC107*, *ACNC108*, *ACNC109*), подразделенных на две группы – А и В [39]. Гаплотип *ACNC110* был обнаружен у *A. c. koreana* [18]. В настоящем исследовании у *A. c. ussuriensis* обнаружен новый гаплотип *ACNC111*, который отличался от *ACNC110* инсерцией 31insT относительно начала последо-

Таблица 5. Генетические дистанции (выше диагонали) и генетические различия (ниже диагонали) между последовательностями гена *VG* яДНК образцов *A. cerana*

Представители <i>A. cerana</i>	Дистанции Jukes–Cantor/Тamura–Nei/ <i>p</i> -distance											
	<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 01	<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 02	<i>A. c. cerana</i> , Jiangxi, Китай	<i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 01	<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 02	<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangbuk-do, Южная Корея	<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangnam-do, Южная Корея	<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 01	<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 02	<i>A. m. mellifera</i> , Warsaw, Польша	
<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 01		0.002/ 0.003/ 0.001	0.013/ 0.013/ 0.005	0.013/ 0.013/ 0.005	0.008/ 0.008/ 0.004	0.009/ 0.009/ 0.004	0.010/ 0.010/ 0.005	0.010/ 0.011/ 0.005	0.014/ 0.014/ 0.005	0.014/ 0.014/ 0.005	0.081/ 0.082/ 0.026	
<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 02	0.3/ 12/ 6		0.012/ 0.012/ 0.004	0.012/ 0.012/ 0.005	0.010/ 0.010/ 0.004	0.010/ 0.010/ 0.005	0.008/ 0.008/ 0.004	0.008/ 0.008/ 0.004	0.013/ 0.012/ 0.004	0.013/ 0.013/ 0.004	0.081/ 0.082/ 0.026	
<i>A. c. cerana</i> , Jiangxi, Китай	1.3/ 52/ 22	1.2/ 48/ 22		0.007/ 0.007/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.006/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.009/ 0.009/ 0.001	0.009/ 0.010/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	1.3/ 53/ 26	1.2/ 49/ 24	0.8/ 27/ 6		0.008/ 0.008/ 0.002	0.006/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 01	0.8/ 32/ 20	1.0/ 40/ 22	0.8/ 30/ 6	0.8/ 31/ 10		0.002/ 0.002/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.002	0.007/ 0.007/ 0.002	0.009/ 0.009/ 0.002	0.008/ 0.008/ 0.002	0.076/ 0.077/ 0.023	
<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 02	0.9/ 37/ 20	1.0/ 41/ 22	0.7/ 25/ 4	0.7/ 26/ 8	0.2/ 7/ 2		0.006/ 0.006/ 0.001	0.005/ 0.005/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.007/ 0.008/ 0.001	0.075/ 0.076/ 0.022	
<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangbuk-do, Южная Корея	1.0/ 42/ 24	0.8/ 32/ 18	0.8/ 30/ 6	0.8/ 27/ 8	0.8/ 28/ 8	0.7/ 25/ 6		0.002/ 0.002/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangnam-do, Южная Корея	1.0/ 43/ 25	0.8/ 31/ 19	0.8/ 27/ 7	0.8/ 28/ 9	0.8/ 27/ 9	0.7/ 24/ 7	0.2/ 7/ 1		0.008/ 0.008/ 0.001	0.009/ 0.009/ 0.001	0.078/ 0.079/ 0.022	
<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 01	1.4/ 56/ 24	1.4/ 54/ 24	0.9/ 36/ 8	0.8/ 31/ 10	0.9/ 36/ 8	0.8/ 31/ 6	0.8/ 32/ 8	0.9/ 33/ 9		0.001/ 0.001/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 02	1.4/ 56/ 23	1.4/ 54/ 23	1.0/ 38/ 9	0.8/ 31/ 11	0.9/ 34/ 9	0.8/ 29/ 7	0.9/ 34/ 9	0.9/ 35/ 10	0.1/ 4/ 1		0.076/ 0.077/ 0.022	
<i>A. m. mellifera</i> , Warsaw, Польша	9.0/ 311/ 157	9.1/ 312/ 158	8.7/ 296/ 143	8.7/ 297/ 145	8.7/ 295/ 146	8.6/ 292/ 144	8.7/ 298/ 147	8.8/ 300/ 148	8.8/ 297/ 145	8.7/ 295/ 146		

вательности *NC1*. Филогенетический анализ последовательности второго некодирующего межгенного участка *NC2* выявил шесть гаплотипов *A. cerana* (*Japan1*, *Nepal1*, *ThaiS1*, *BurmaN1*, *BurmaN2* и *BurmaN3*), подразделенных на две группы – материковая Азия и Sundaland [41]. По нуклеотидной последовательности *NC2* *A. c. ussuriensis* относится к гаплотипу материковой Азии *Japan1*. Вероятно, что присутствие гаплотипа *Japan1* во всех

популяциях *A. cerana* в Азии свидетельствует об общем происхождении всей популяции *A. cerana* и последующем распространении по всей Азии. Таким образом, по некодирующим межгенным участкам *NC1* и *NC2* *A. c. ussuriensis* относится к континентальной азиатской группе *A. cerana* и отличается от популяций *A. c. cerana*, *A. c. koreana* и *A. c. japonica*. Предполагается, что генетические различия *A. c. ussuriensis* являются результатом

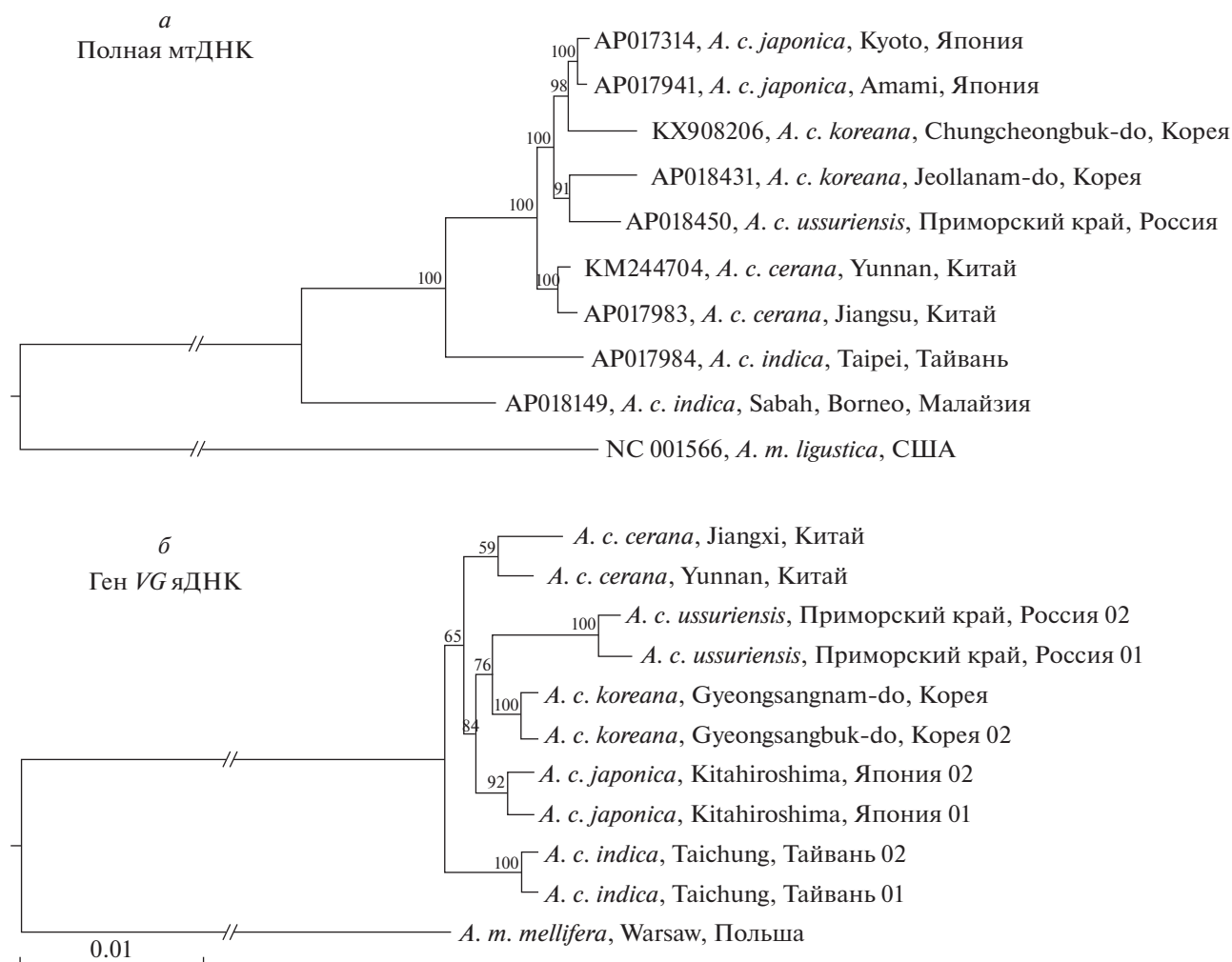


Рис. 3. Филогенетические взаимоотношения представителей *A. cerana* разных популяций на основе кластерного анализа методом ближайшего соседа и генетических дистанций Jukes–Cantor. *а* – на основе последовательности полной мтДНК; *б* – на основе последовательности гена *VG* яДНК.

естественного отбора и адаптивной эволюции *A. cerana* в условиях резко континентального климата Приморского края.

Локальные свойства мутационного процесса можно описывать не только вероятностью однонуклеотидных мутаций на сайт, но и соотношением транзиций (tr) к трансверсиям (tv). Отношение tr/tv считается базовой характеристикой мутационного процесса и является широко употребляемой однопараметрической характеристикой мутационного спектра. Для большинства известных эукариот в норме отношение tr/tv > 1, в то время как tr/tv < 1 свидетельствует о том, что повысилась частота однонуклеотидных мутаций, инсерций или делеций (инделов) или понизилась эффективность репарации ДНК. Изменчивость отношения tr/tv в геноме может свидетельствовать в пользу локальной смены мутационного механиз-

ма в ходе адаптации к сменяющимся условиям окружающей среды [42–44].

Отношение транзиций к трансверсиям полной мтДНК было 2.46 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. cerana*; 2.14 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. japonica*; 2.11 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. koreana*; 2.39 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. indica*; 0.47 между *A. c. ussuriensis* и *A. m. ligustica* (табл. 3), что сходно с соотношением tr/tv мтДНК 2.06 между *Drosophila melanogaster* и *D. yakuba* [45]. Наименьшее значение отношения tr/tv между *A. cerana* и *A. mellifera* 0.47 является свидетельством смены мутационного механизма в ходе приспособления к сменяющимся условиям окружающей среды в результате дивергенции и аллопатрического видообразования.

Генетические дистанции Jukes–Cantor, Tamura–Nei, *p*-distance по полной мтДНК и *VG* яДНК показали, что их абсолютные значения не расходятся сильно и могут быть успешно использованы в

кластерном анализе. По каждому из дистанций можно получить сходный паттерн кластеризации. Было выявлено, что подвид *A. c. ussuriensis* генетически более близок к *A. c. japonica* (дивергенция 1.10% по мтДНК и 0.93% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.005 по мтДНК и 0.009 по гену *VG* яДНК) и *A. c. koreana* (дивергенция 1.30% по мтДНК и 0.90% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.005 по мтДНК и 0.012 по гену *VG* яДНК), *A. c. cerana* (дивергенция 2.55% по мтДНК и 1.25% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.006 по мтДНК и 0.012 по гену *VG* яДНК), чем к *A. c. indica* (дивергенция 5.15% по мтДНК и 1.50% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.032 по мтДНК и 0.013 по гену *VG* яДНК) (табл. 4, 5). Таким образом, по генетическим дистанциям и дивергенции наблюдается подразделение подвидов на две группы – Северной и Южной Азии.

Филогенетические деревья, построенные по полной мтДНК и гену *VG* яДНК, показали сходство в кластеризации на две группы – Южной и Северной Азии (рис. 3). Образцы *A. mellifera* располагаются отдельно и служат в качестве внешней группы. Все подвиды *A. cerana*, за исключением *A. c. koreana*, группируются в отдельные кластеры по полной мтДНК и гену *VG* яДНК, что свидетельствует о том, что отцовская и материнская составляющие генома географически распространялись совместно. Это возможно при естественной миграции, а также при перемещении пчеловодом семей пчел. В случае с *A. c. koreana* представители этого подвида группировались по мтДНК как с *A. c. japonica*, так и с *A. c. ussuriensis*, что может быть следствием потока генов по материнской линии от этих подвидов в популяцию *A. c. koreana*, ареал которой расположен географически между ними. Такое может произойти в результате импорта маток *A. c. japonica* и *A. c. ussuriensis* в Южную Корею, где они в дальнейшем скрещивались с местными трутнями *A. c. koreana*.

Как известно, диапазон генетической дивергенции 0.80–8.00% и генетическая дистанция Jukes–Cantor 0.005–0.100 соответствовали диапазону внутривидовых уровней различий у насекомых [19, 25, 46, 47]. Значения генетической дивергенции и генетической дистанции по мтДНК и гену *VG* яДНК между *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica* находятся в пределах внутривидовых различий между подвидами.

Поскольку дивергенция мтДНК идет со скоростью 2.3% на 1 млн лет [48, 49], можно рассчитать, что возраст изоляции и последующей дивергенции *A. c. ussuriensis* может составлять 0.50 млн лет (1.10%) с *A. c. japonica*, 0.56 млн лет (1.30%) с *A. c. koreana*, 1.1 млн лет (2.55%) с *A. c. cerana*, 2.2 млн лет (5.15%) с *A. c. indica* (табл. 4, 5). Можно предполо-

жить, что вероятное время возникновения подвидов *A. cerana* около 2–1 млн лет назад.

Таким образом, *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 наименее изученный из всех подвидов в связи с тем, что встречается редко и только в диком виде в лесах Приморского и Хабаровского краев до 47°54' с.ш. Генетические исследования подвида представляют большой интерес для науки, поскольку подвид подвержен естественному отбору и адаптивной эволюции, где все признаки пчел должны формироваться критическими условиями Северной Азии. Мы секвенировали и аннотировали последовательности полной мтДНК пчел подвидов *A. c. ussuriensis* (AP018450) и *A. c. koreana* (AP018431) и шести экзонов гена вителлогенина *VG* яДНК подвидов *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica*. Последовательность мтДНК имеет длину 15919 пн, содержит АТ 84% и GC 16%, включает 22 гена тРНК, 13 белок-кодирующих генов, два гена рибосомной РНК *16S* и *12S rRNA*, один АТ-богатый регион и четыре некодирующие межгенные области *NC1–4*. Все белок-кодирующие гены начинаются с кодонов АТТ и АТГ, за исключением гена *ATP8* со стартовым кодоном АТС, а заканчивается стоп-кодонами ТАА и TAG. Было показано, что по *NC1* участку *A. c. koreana* относится к гаплотипу *ACNC110*, а *A. c. ussuriensis* – к гаплотипу *ACNC111*, тогда как по участку *NC2* оба подвида относятся к гаплотипу *Japan1*. Методом кластерного анализа последовательностей мтДНК и гена *VG* яДНК было показано разделение подвидов пчел на две группы – южных регионов (*A. c. indica*) и северных регионов (*A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*). Было показано, что подвид *A. c. ussuriensis* генетически более сходен с *A. c. japonica*, *A. c. koreana* и *A. c. cerana*, чем с *A. c. indica*. Значения генетической дивергенции (0.80–8.00%) и генетической дистанции Jukes–Cantor (0.005–0.100) по мтДНК и гену *VG* яДНК между подвидами *A. c. ussuriensis* Ilyasov et al., 2019, *A. c. koreana* Ilyasov et al., 2019, *A. c. japonica* Radoszkowski, 1887, *A. c. cerana* Fabricius, 1793, *A. c. indica* Fabricius, 1798 находятся в пределах внутривидовых различий между подвидами.

Авторы благодарны доктору Hisashi Okuyama за помощь в секвенировании, а также фонду e-ASIA JRP (The East Asia Science and Innovation Area Joint Research Program) за поддержку в выполнении проекта (<https://www.the-easia.org>).

Работа выполнена при поддержке государственного задания (регистрационный номер АААА-А21-121011990120-7) (И.Р.), гранта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (№ 19-54-70002 e-Asia_t) (Н.А.) и программ постдокторских исследований в Инчхонском Национальном университете за 2017–2019 годы (И.Р.).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ruttner F.* Breeding Techniques and Selection for Breeding of the Honeybee. Derby, UK: British Isles Bee Breeders Association, 1988. 150 p.
2. *Прощалькин М.Ю., Новомодный Е.В., Безбородов В.Г., Кошкин Е.С.* Первые современные находки восковой пчелы *Apis cerana* Fabricius, 1793 (Hymenoptera, Apidae) в Хабаровском крае // Евразийский энтомолог. журн. 2014. Т. 13. № 3. С. 295–298.
3. *Кузнецов В.Н.* Китайская восковая пчела *Apis cerana* F. (Hymenoptera, Apidae) на Дальнем Востоке России. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2005. 112 с.
4. *Behura S.K.* Analysis of nuclear copies of mitochondrial sequences in honeybee (*Apis mellifera*) genome // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. № 7. P. 1492–1505. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm068>
5. *Choi Y.S., Lee M.Y., Hong I.P. et al.* Occurrence of sacbrood virus in Korean apiaries from *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) // J. Apiculture. 2010. V. 25. № 3. P. 187–191.
6. *Koetz A.H.* Ecology, behaviour and control of *Apis cerana* with a focus on relevance to the Australian incursion // Insects. 2013. V. 4. № 4. P. 558–592. <https://doi.org/10.3390/insects4040558>
7. *Vung N., Lee M.-L., Lee M.-Y. et al.* Breeding and selection for resistance to sacbrood virus for *Apis cerana* // J. Apiculture. 2017. V. 32. P. 345–352. <https://doi.org/10.17519/apiculture.2017.11.32.4.345>
8. *Песенко Ю.А., Лелей А.С., Радченко В.Г., Филаткин Г.Н.* Китайская восковая пчела *Apis cerana cerana* F. (Hymenoptera, Apidae) на Дальнем Востоке СССР // Энтомолог. обозрение. 1989. Т. 68. № 3. С. 527–548.
9. *Zhuang D.* New subspecies of *Apis cerana* (in Chinese) // Southwest China J. Agricultural Sci. 1989. V. 2. P. 61–65.
10. *Zhen-ming J., Yang G., Huang S. et al.* The advancement of beekeeping science and technology in China // Honeybees in Mountain Agriculture / Ed. Verma L.R. New Delhi: Oxford and IBH Publ. Co., 1992. 274 p.
11. *Diniz-Filho J.A.F., Malapsina O., Pignata M.I.B.* Geographic variation in *Apis cerana indica* F.: A spatial autocorrelation analysis of morphometric patterns // J. Apicultural Res. 1993. V. 32. № P. 65–72. <https://doi.org/10.1080/00218839.1993.11101289>
12. *Engel M.S.* The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera, Apidae, Apis) // J. Hymenoptera Res. 1999. V. 8. № 2. P. 165–196. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-718>
13. *Sugawara M.* Feral colonies of Japanese honey bees, *Apis cerana japonica* and their life history. 2. Natural nests and swarming // Mitsubachi Kagaku (Honeybee Science). 2000. V. 21. № 1. P. 35–39.
14. *Hepburn H.R., Smith D.R., Radloff S.E., Otis G.W.* Intraspecific categories of *Apis cerana*: morphometric, allozymal and mtDNA diversity // Apidologie. 2001. V. 32. № 1. P. 3–23. <https://doi.org/10.1051/apido:2001108>
15. *Takahashi J., Yoshida T.* The origin of Japanese honey bee *Apis cerana japonica* inferred from mitochondrial DNA // Mitsubachi Kagaku (Honeybee Science). 2003. V. 24. № 2. P. 71–76.
16. *Radloff S.E., Hepburn C., Hepburn R.H. et al.* Population structure and classification of *Apis cerana* // Apidologie. 2010. V. 41. № 6. P. 589–601. <https://doi.org/10.1051/apido/2010008>
17. *Takahashi J., Wakamiya T., Kiyoshi T. et al.* The complete mitochondrial genome of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA Part B. 2016. V. 1. № 1. P. 156–157. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1144108>
18. *Ilyasov R.A., Park J., Takahashi J., Kwon H.W.* Phylogenetic uniqueness of honeybee *Apis cerana* from the Korean peninsula inferred from the mitochondrial, nuclear, and morphological data // J. Apicultural Sci. 2018. V. 62. № 2. P. 189–214. <https://doi.org/10.2478/Jas-2018-0018>
19. *Ilyasov R.A., Han G.Y., Lee M.L. et al.* Phylogenetic relationships of Russian Far-East *Apis cerana* with other north Asian populations // J. Apicultural Sci. 2019. V. 63. № 2. P. 297–322. <https://doi.org/10.2478/JAS-2019-0024>
20. *Cornuet J.-M., Garnery L., Solignac M.* Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA // Genetics. 1991. V. 128. № 2. P. 393–403.
21. *Garnery L., Cornuet J.-M., Solignac M.* Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis // Mol. Ecol. 1992. V. 1. № 3. P. 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1992.tb00170.x>
22. *Garnery L., Mosshine E.H., Oldroyd B.P., Cornuet J.-M.* Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations // Mol. Ecol. 1995. V. 4. P. 465–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1995.tb00240.x>
23. *Arias M.C., Sheppard W.S.* Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence // Molecular Phylogenet. Evol. 1996. V. 5. № 3. P. 557–566. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0050>
24. *Songrarn O., Sittipraneed S., Klinbunga S.* Mitochondrial DNA diversity and genetic differentiation of the honeybee (*Apis cerana*) in Thailand // Biochem. Genet. 2006. V. 44. № 5–6. P. 256–269. <https://doi.org/10.1007/s10528-006-9030-5>
25. *Tan H.W., Liu G.H., Dong X. et al.* The complete mitochondrial genome of the Asiatic cavity-nesting honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) // PLoS One.

2011. V. 6. № 8. P. e23008.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023008>
26. Kent C.F., Issa A., Bunting A.C., Zayed A. Adaptive evolution of a key gene affecting queen and worker traits in the honey bee, *Apis mellifera* // Mol. Ecol. 2011. V. 20. № 24. P. 5226–5235.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05299.x>
27. Bernt M., Donath A., Jühling F. et al. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. V. 69. № 2. P. 313–319.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023>
28. Lowe T.M., Eddy S.R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence // Nucl. Ac. Res. 1997. V. 25. № 5. P. 955–964.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.5.0955>
29. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with Chain-terminating inhibitors // PNAS USA 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
30. Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of protein molecules // Mammalian Protein Metabolism / Ed. Munro H.N. N. Y.: Acad. Press, 1969. P. 21–132.
31. Tamura K., Battistuzzi F.U., Billings-Ross P. et al. Estimating divergence times in large molecular phylogenies // PNAS USA. 2012. V. 109. № 47. P. 19333–19338.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1213199109>
32. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000. 333 p.
33. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
34. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. № 4. P. 406–425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
35. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. № 3. P. 512–526.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
36. Crozier R.H., Crozier Y.C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and genome organization // Genetics. 1993. V. 133. № 1. P. 97–117.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x>
37. Okuyama H., Tingek S., Takahashi J. The complete mitochondrial genome of the cavity-nesting honeybee, *Apis cerana* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) from Borneo // Mitochondrial DNA Part B. 2017. V. 2. № 2. P. 475–476.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1361344>
38. Kent C.F., Minaei S., Harpur B.A., Zayed A. Recombination is associated with the evolution of genome structure and worker behavior in honey bees // PNAS USA. 2012. V. 109. № 44. P. 18012–18017.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1208094109>
39. Lee J.Y., Wang A.R., Choi Y.S. et al. Mitochondrial DNA variations in Korean *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) and development of another potential marker // Apidologie. 2016. V. 47. № 1. P. 123–134.
<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0381-y>
40. Tan Y.D., Wan C.L., Zhu Y.F. et al. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm // Genetics. 2001. V. 157. № 3. P. 1277–1284.
41. Smith C.R., Smith C.D., Robertson H.M. et al. Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus* // PNAS USA. 2011. V. 108. № 14. P. 5667–5672.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007901108>
42. Tian D., Wang Q., Zhang P. et al. Single-nucleotide mutation rate increases close to insertions/deletions in eukaryotes // Nature. 2008. V. 455. № 7209. P. 105–108.
<https://doi.org/10.1038/nature07175>
43. McDonald M.J., Wang W.C., Huang H.D., Leu J.Y. Clusters of nucleotide substitutions and insertion/deletion mutations are associated with repeat sequences // PLoS Biology. 2011. V. 9. № 6. P. e1000622.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000622>
44. Koren A., Polak P., Nemesh J. et al. Differential relationship of DNA replication timing to different forms of human mutation and variation // Am. J. Hum. Genet. 2012. V. 91. № 6. P. 1033–1040.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.10.018>
45. Seplyarskiy V.B., Kharchenko P., Kondrashov A.S., Bazzykin G.A. Heterogeneity of the transition/transversion ratio in *Drosophila* and Hominidae genomes // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. № 8. P. 1943–1955.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mss071>
46. Han T., Lee W., Lee S. et al. Reassessment of species diversity of the subfamily Denticollinae (Coleoptera: Elateridae) through DNA barcoding // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. P. e0148602.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148602>
47. Eimanifar A., Kimball R.T., Braun E.L. et al. The complete mitochondrial genome of the Egyptian honey bee, *Apis mellifera* lamarckii (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA Part B. 2017. V. 2. № 1. P. 270–272.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1325343>
48. DeSalle R., Freedman T., Prager E.M., Wilson A.C. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila* // J. Mol. Evol. 1987. V. 26. № 1–2. P. 157–164.
<https://doi.org/10.1007/BF02111289>
49. Johns G.C., Avise J.C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial Cytochrome B gene // Mol. Biol. Evol. 1998. V. 15. P. 1481–1490.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025875>

**Genetic Properties and Evolution of Ussurian Wax Bee
Apis cerana ussuriensis from the Primorsky Territory of Russia**

**R. A. Ilyasov^{a, b, *}, G. Y. Han^b, M. L. Lee^b, K. W. Kim^b, M. Y. Proshchalykin^c, A. S. Lelej^c,
J. H. Park^{b, d}, J. I. Takahashi^e, H. W. Kwon^{b, **}, and A. G. Nikolenko^a**

^aUfa Federal Research Center, Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^bDivision of Life Sciences, Major of Biological Sciences, Incheon National University Convergence Research Center for Insect Vectors, Incheon National University, Incheon, 22012 Korea

^cFederal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

^dBioinformatics Company 3BIGS CO.LTD, Hwaseong-si, 18454 Korea

^eFaculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Kyoto, 603-8555 Japan

*e-mail: apismell@hotmail.com

**e-mail: hwkwon@inu.ac.kr

A. c. ussuriensis is the most northern subspecies of the honey bee *A. cerana*, distributed in the taiga of Primorsky and Khabarovsk territories up to 47°54' N. Genetic studies of this subspecies are of great interest for science and beekeeping, since all adaptive characters were formed under the influence of the environment without human intervention. We sequenced and annotated the complete mitochondrial DNA (*mtDNA*) sequences of honey bee subspecies *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 (*AP018450*) from Primorsky Territory and *Apis cerana koreana* Ilyasov et al., 2019 (*AP018431*) from South Korea and six exons of the gene vitellogenin *VG E2–E7* of nuclear DNA (nDNA) of honey bee subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, and *A. c. indica* Fabricius, 1798. The method of cluster analysis of the sequences of *mtDNA* and the gene *VG* of nDNA showed the separation of bees into two groups, including the southern subspecies *A. c. indica* and northern subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*. Based on genetic divergence, it was shown that the subspecies *A. c. ussuriensis* is genetically close to *A. c. japonica*, *A. c. koreana* and *A. c. cerana* than with a subspecies *A. c. indica*. Values of genetic divergence (0.80–8.00%) and Jukes-Cantor genetic distance (0.005–0.100) for *mtDNA* and gene *VG* of nDNA between *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica* are within intraspecies differences between insect subspecies. The estimated time of origin of *A. cerana* subspecies was rated about 2–1 million years ago.

Keywords: *Apis cerana*, *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica*, mitochondrial genome, subspecies, divergence, evolution, Primorsky Territory, vitellogenin, *mtDNA*, nDNA.