

## ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ ПОДВИДОВ ПЧЕЛ *Apis mellifera caucasia* И *Apis mellifera carpathica* ПО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА

© 2021 г. 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. Такахаша<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, Уфа, 450054 Россия

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

<sup>3</sup>Биоинформатическая компания 3BIGS CO. LTD, Хвасон-си, 18454 Корея

<sup>4</sup>Факультет естественных наук, Университет Киото Сангё, Киото, 603-8555 Япония

\*e-mail: apismell@hotmail.com

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

Поступила в редакцию 13.07.2020 г.

После доработки 04.09.2020 г.

Принята к публикации 18.10.2020 г.

Последовательности полного митохондриального генома медоносной пчелы *Apis mellifera* L. подвидов *Apis mellifera caucasia* Pollmann, 1889 (AP018404, 16341 пн) и *Apis mellifera carpathica* Foti et al., 1965 (AP018403, 16336 пн) были впервые секвенированы. Митохондриальные ДНК (мтДНК) обоих подвидов содержат 13 кодирующих белок генов, 22 гена тРНК, два гена рРНК и АТ-обогащенную регуляторную область. Отношение транзиций к трансверсиям полной мтДНК между *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* было 2.05, что характеризует формирование адаптаций к сменяющимся условиям среды обитания. Гены с наибольшим содержанием GC – *COX1* (24%), *COX2* (19.6%), *CYTB* (19.1%), *COX3* (17.2%) и *ND1* (17.2%) могут быть высокополиморфны и использованы в филогенетических и популяционных исследованиях пчел. Большинство генов мтДНК обоих подвидов расположены на тяжелой цепи (девять кодирующих белок генов и 14 генов тРНК), и меньшее число генов (четыре кодирующих белок гена, два гена рРНК и восемь генов тРНК) расположено на легкой цепи. Кластерный анализ последовательности полной мтДНК и оценка структуры межгенной области *tRNA-Leu(UUR)*–*COX2* с единственным элементом Q размером 192 пн показали, что оба подвида являются представителями линии C с гаплотипами C2 и C2j соответственно. Подвиды медоносной пчелы *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* могут быть дифференцированы друг от друга по 34 уникальным SNP в 11 генах мтДНК и маркеру рестрикции *XbaI* в гене *ND5*. Эти генетические маркеры могут способствовать сохранению чистопородных генофондов пчел подвидов *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* в пределах их естественного ареала.

**Ключевые слова:** *Apis mellifera*, подвиды пчел, *A. m. caucasia*, *A. m. carpathica*, митохондриальный геном, мтДНК, гаплотипы, консервативная генетика.

DOI: 10.31857/S0016675821060047

Медоносная пчела используется человеком для производства специфических продуктов пчеловодства и опыления сельскохозяйственных растений [1–3]. В результате эволюции сформировалось около 30 подвидов медоносной пчелы, распространенных в широком спектре климатических условий Старого Света [4, 5]. Способность пчел хорошо приспосабливаться позволила человеку распространить их практически во всех странах мира [6–8].

Несмотря на широкую экологическую пластичность, большую численность и широкое рас-

пространение, численность популяций пчел ежегодно сокращается во всем мире [9, 10]. Сокращение популяции пчел происходит по разным причинам: применение пестицидов и инсектицидов в сельском хозяйстве, неконтролируемые массовые транспортировки пчел, внутривидовая гибридизация, распространение новых болезней, глобальные климатические изменения [11–17]. Показано, что сокращение численности популяций медоносной пчелы будет вести к сокращению генетического разнообразия и адаптивности популяции, а также к снижению биоразнообразия экосистем [18–23].

Подвиды медоносной пчелы подразделяются как минимум на пять эволюционных линий: линия А во всей Африке, линия М в Западной Европе, линия С в Восточной Европе, линия О в Западной Азии и линия У в Северо-Восточной Африке и Юго-Западной Азии. Подвиды пчел разных линий различаются существенно подвидов из одной линии. Гибридизация подвидов пчел разных линий может иметь такие последствия, как снижение численности популяции, приспособленности и адаптивности, а также потеря хозяйственно полезных признаков [9, 10, 24].

Географически ареалы подвидов разных эволюционных линий имеют смежные границы и часто перекрываются, что привело к формированию гибридных зон на границах ареалов. Деятельность человека усилила формирование гибридных популяций пчел [9, 10, 24]. В мировом коммерческом пчеловодстве наиболее востребованными являются пчелы подвидов эволюционной линии С — *A. m. ligustica* Spinola, 1806 [25], *A. m. carnica* Pollmann, 1889 [26], *A. m. caucasia* Pollmann, 1889 [26], *A. m. carpathica* Foti et al., 1965 [27]. 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 являются наиболее распространенными в пчеловодстве после темной лесной пчелы *A. m. mellifera* [18–24].

Естественный ареал кавказской пчелы *A. m. caucasia* охватывает хребты и долины Кавказских гор и Восточную Анатолию [28]. Естественный ареал карпатской пчелы *A. m. carpathica* охватывает хребты и долины Карпатских гор и Западную Трансильванию [29]. Эти пчелы идеально приспособлены к жаркому лету и умеренной зиме и являются незаменимыми компонентами природных экосистем Кавказских и Карпатских гор [30–33]. В результате массовых транспортировок эти подвиды были распространены на территориях Армении, Австрии, Азербайджана, Белоруссии, Болгарии, Чехии, Грузии, Венгрии, Польши, Румынии, Словакии, юга России, Турции, Украины и Узбекистана [28]. Следствием такого широкого искусственного распространения подвидов *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* стала массовая гибридизация и интрогрессия с локальными для каждой местности подвидами, а также друг с другом [29, 34, 35].

Кавказская *A. m. caucasia* и карпатская *A. m. carpathica* пчелы — наименее изученные с научной точки зрения подвиды, несмотря на востребованность и активное использование их в пчеловодстве. Часто подвиды *A. m. carpathica* и *A. m. caucasia* упускаются и не упоминаются в списках подвидов [18, 36–39].

Подвид *A. m. carpathica* долгое время считался экотипом подвида *A. m. carnica* в Западной Румы-

нии или *A. m. macedonica* в Восточной Румынии [29, 37]. Другие работы, на основе морфометрии [27, 40–43] и мтДНК [24, 29, 44–47], признают таксономическую самостоятельность подвида *A. m. carpathica*. Существует неоднозначность в определении принадлежности подвида *A. m. caucasia* к эволюционной линии, который на основе морфометрии [39, 48–50] и аллозимов [28] был отнесен к линии О, а на основе мтДНК [18, 19, 23, 38, 45, 51–54] — к линии С.

Идентификация подвида и выявление уровня интрогрессии являются основой для сохранения генофонда популяций пчел [29, 35]. Нами определены нуклеотидные последовательности полной мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* с целью уточнения их таксономического статуса и определения их филогенетических отношений. На основе анализа мтДНК мы показали, что подвиды пчел *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* относятся к эволюционной линии С и взаимодействуют между собой как два самостоятельных подвида.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Взрослые особи рабочих пчел *A. m. caucasia* были отобраны на пасеке в Сочинском районе Краснодарского края, Россия (43°45' с.ш., 39°95' в.д.), взрослые особи *A. m. carpathica* — на пасеке в Майкопском районе Республики Адыгея, Россия (44°61' с.ш., 40°07' в.д.). Принадлежность семей пчел к подвидам *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* была предварительно подтверждена морфометрическим методом [55]. 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 было проведено с помощью набора NextSeq 500/550 High Output Kit v. 2 (75 циклов) (ILLUMINA, США) на основе парных циклов считывания (2 × 150 пн) с использованием секвенатора Illumina Next Seq 500 (ILLUMINA, США) в Университете Киото Сангё (Kyoto, Япония), следуя инструкции производителя. Геномные библиотеки были приготовлены с помощью набора для подготовки ДНК-библиотеки Nextera (ILLUMINA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Сборка геномов *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* проводилась на основе 1662186 и 1541213 прочтений соответственно, с средним покрытием 75 с помощью Geneious R9 (BIOMATTERS, Новая Зеландия). Аннотация геномов выполнена с использованием MITOS (Universität Leipzig, Германия) [56], Geneious R9 (BIOMATTERS, Новая Зеландия), Unipro UGENE 1.28 (UNIPRO, Россия), CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Denmark) и tRNAscan-SE (CA, США) [57].

Нуклеотидные последовательности полной мтДНК были депонированы в базы данных Генбанка GenBank/DBJ под номерами AP018404 для *A. m. caucasia* (16341 пн) и AP018403 для *A. m. carpathica* (16336 пн). Сравнительный анализ полной мтДНК был проведен в MEGA7 [58] с использованием последовательностей из Генбанка: NC\_001566 (*A. m. ligustica*, Maryland, США) [59], KX908209 (*A. m. ligustica*, Gwangju, Корея) [60], KP163643 (*A. m. syriaca* Skorikov, 1929 [61], Ваqa, Иордания) [62], KY926882 (*A. m. syriaca*, Yunnan, Китай) [63], *A. m. ligustica* NC\_001566 (16324 пн) (Bethesda, США) (референсная последовательность), *A. c. cerana* F.GQ162109 (Yunnan, Китай) (15895 пн) [64] (внешняя группа).

Выравнивание последовательностей межгенной области *tRNA-Leu(UUR)–COX2* *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* проводилось 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 C2j, *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. lamarkii* Cockerell, 1906 (FJ477994) [65] гаплотип O1c, *A. m. syriaca* (FJ477997) гаплотип O3.

Дивергенция нуклеотидных последовательностей и генетические дистанции Jukes–Cantor [66] были рассчитаны с использованием UNIPRO UGENE 1.28 (Россия) и CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания). Филогенетический анализ на основе последовательностей ДНК был проведен с использованием MEGA7 [58] 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 [67] 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).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Размеры полной последовательности мтДНК *A. m. caucasia* (AP018404) 16341 пн и *A. m. carpathica* (AP018403) 16336 пн были немного длиннее последовательности мтДНК *Drosophila yakuba* (NC\_001322) 16019 пн (рис. 1). Были рассчитаны соотношения нуклеотидов А, Т, G и С и наиболее

**Таблица 1.** Характеристика нуклеотидного состава полной мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica*

Нуклеотиды	<i>A. m. caucasia/A. m. carpathica</i>	
	число	содержание, %
Аденин (А)	7067/7066	43.2/43.3
Цитозин (С)	1560/1562	9.5/9.6
Гуанин (G)	908/906	5.6/5.5
Тимин (Т)	6806/6800	41.6/41.6
GC	2468/2468	15.1/15.1
AT	13873/13866	84.9/84.9

важных пар AT и GC полной мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* (табл. 1). Среднее содержание нуклеотидов AT – 84.9% и GC – 15.1% сходно с содержанием у *Drosophila melanogaster* (U37541) и подвидов пчел *A. m. ligustica* и *A. m. syriaca*. Это может быть результатом частых замен пар CG на AT в ходе эволюции [59].

Аналогично референсной последовательности *A. m. ligustica* (NC\_001566) последовательности мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* содержали 13 белок-кодирующих генов (*ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND5, ND4, ND4L, ND6, CYTB, NDI*), 22 гена тРНК (*tRNA-Glu, tRNA-Ser(AGN), tRNA-Met, tRNA-Gln, tRNA-Ala, tRNA-Ile, tRNA-Cys, tRNA-Tyr, tRNA-Trp, tRNA-Leu(UUR), tRNA-Asp, tRNA-Lys, tRNA-Gly, tRNA-Arg, tRNA-Asn, tRNA-Phe, tRNA-His, tRNA-Thr, tRNA-Pro, tRNA-Ser(UCN), tRNA-Leu(CUN), tRNA-Val*), два гена рРНК (*16S rRNA, 12S rRNA*) и AT-богатую регуляторную область (табл. 2).

Тяжелая цепь мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* содержит девять белок-кодирующих генов (*ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND6* и *CYTB*) и 14 генов тРНК (*tRNA-Glu, tRNA-Ser(AGN), tRNA-Met, tRNA-Gln, tRNA-Ala, tRNA-Ile, tRNA-Trp, tRNA-Leu(UUR), tRNA-Asp, tRNA-Lys, tRNA-Gly, tRNA-Asn, tRNA-Thr* и *tRNA-Ser(UCN)*), а легкая цепь мтДНК содержит четыре белок-кодирующих гена (*ND1, ND4, ND4L* и *ND5*), восемь генов тРНК (*tRNA-Cys, tRNA-Tyr, tRNA-Arg, tRNA-Phe, tRNA-His, tRNA-Pro, tRNA-Leu(CUN)* и *tRNA-Val*) и два гена рРНК (*16S rRNA, 12S rRNA*) (рис. 2).

Известно, что значение генетического разнообразия и вариабельности зависит от содержания GC – чем выше содержание GC, тем выше вариабельность генов [68]. Было рассчитано содержание GC во всех генах мтДНК. Возможно, что наиболее вариабельные белок-кодирующие гены – *COX1, COX2, CYTB, COX3, NDI*, а наименее вариабельные белок-кодирующие гены – *ND4, ND3, ND2, ND6, ATP8*. Поскольку содержание GC в мтДНК менее 40% считается низким [69], вероятно, что

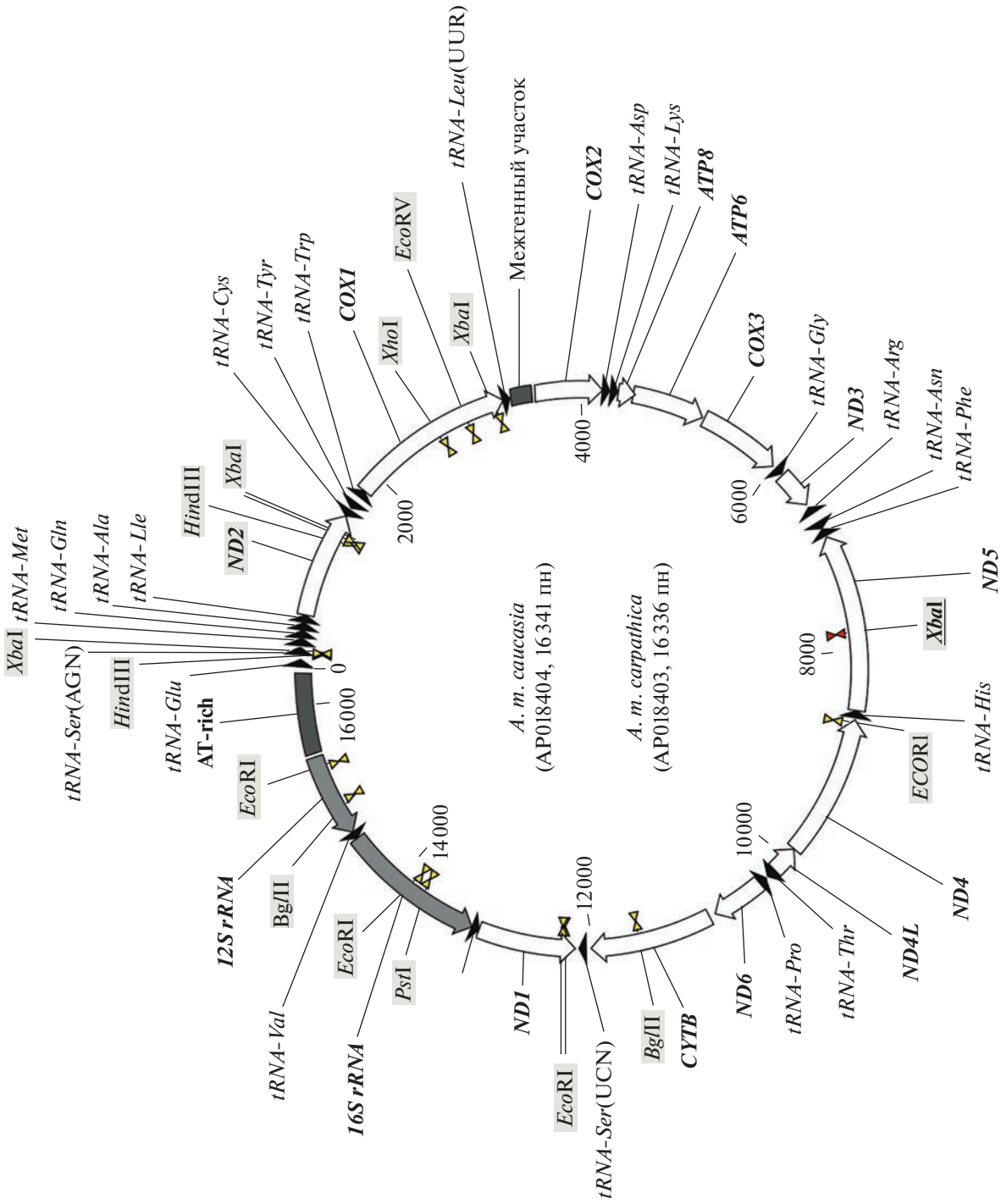


Рис. 1. Кольцевая физическая карта полной мтДНК *A. m. saucasia* и *A. m. carpathica*. Сайты распознавания рестриционных ферментов выделены фоном, а уникальный сайт рестрикции, характерный только для *A. m. saucasia*, подчеркнут.

большинство генов мтДНК высококонсервативны (табл. 2).

Была построена физическая карта полной мтДНК пчел *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica*. Не было обнаружено различий в синтении полной мтДНК *A. m. caucasia*, *A. m. carpathica* с референсной последовательностью *A. m. ligustica*. Четыре пары генов *ND2* и *tRNA-Cys*, *ATP6* и *ATP8*, *COX1* и *tRNA-Leu(UUR)*, *COX2* и *tRNA-Asp* имели небольшие перекрывающиеся участки у обоих подвидов пчел (рис. 1).

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

В мтДНК *A. m. caucasia*, *A. m. carpathica* и референсной последовательности *A. m. ligustica* имеются по два гена изоакцепторных тРНК для аминокислот серин (Ser) и лейцин (Leu). Первая *tRNA-Ser(AGN)* распознает кодон AGN по антикодону TCT, расположенному на тяжелой цепи в положении 138–140, а вторая *tRNA-Ser(UCN)* распознает кодон UCN по антикодону TGA, расположенному на тяжелой цепи в положении 12230–12232 относительно референсной последовательности *A. m. ligustica*. Первая *tRNA-Leu(UUR)* распознает кодон UUR по антикодону TAA, расположенному на тяжелой цепи в положении 3388–3390, а вторая *tRNA-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 тРНК в одной мтДНК является результатом адаптивной эволюции медоносных пчел, которая обеспечивает гарантированную бесперебойную трансляцию наиболее важных белков и пептидов.

15 сайтов рестрикции – общие для полной мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica*, 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. caucasia*, но не для *A. m. carpathica*. Данный сайт рестрикции мтДНК появился у *A. m. caucasia* благодаря SNP 7830C>A, которая изменила последовательность TCTAGC в TCTAGA – сайт распознавания *XbaI*.

В мтДНК медоносной пчелы подвидов *A. caucasia* и *A. carpathica* имеются 24 межгенных спейсера с общим размером 813 пн. Самый большой межгенный спейсер длиной 192 пн расположен между генами *tRNA-Leu(UUR)* и *COX2*. Размер этого межгенного спейсера варьируется среди подвидов медоносной пчелы *A. mellifera* из разных

**Таблица 2.** Характеристика генов полной мтДНК пчел *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica*

Типы генов	Ген	Размер, пн	Содержание GC, %
Белок-кодирующие	<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
	тРНК	<i>tRNA-Glu</i>	66
<i>tRNA-Ser(AGN)</i>		61	19.7
<i>tRNA-Met</i>		66	21.2
<i>tRNA-Gln</i>		55	12.7
<i>tRNA-Ala</i>		70	10.0
<i>tRNA-Ile</i>		69	13.0
<i>tRNA-Cys*</i>		69	13.0
<i>tRNA-Tyr*</i>		68	11.8
<i>tRNA-Trp</i>		72	8.3
<i>tRNA-Leu(UUR)</i>		70	18.6
<i>tRNA-Asp</i>		69	10.1
<i>tRNA-Lys</i>		69	20.3
<i>tRNA-Gly</i>		66	7.6
<i>tRNA-Arg*</i>		67	13.4
<i>tRNA-Asn</i>		69	14.5
<i>tRNA-Phe*</i>		69	11.6
<i>tRNA-His*</i>		68	14.7
<i>tRNA-Thr</i>	59	8.5	
<i>tRNA-Pro*</i>	69	14.5	
<i>tRNA-Ser(UCN)</i>	67	13.4	
<i>tRNA-Leu(CUN)*</i>	71	12.7	
<i>tRNA-Val*</i>	70	11.4	
рРНК	<i>16S rRNA*</i>	1362	15.6
	<i>12S rRNA*</i>	818	3.4

\* Гены, расположенные на легкой цепи мтДНК.

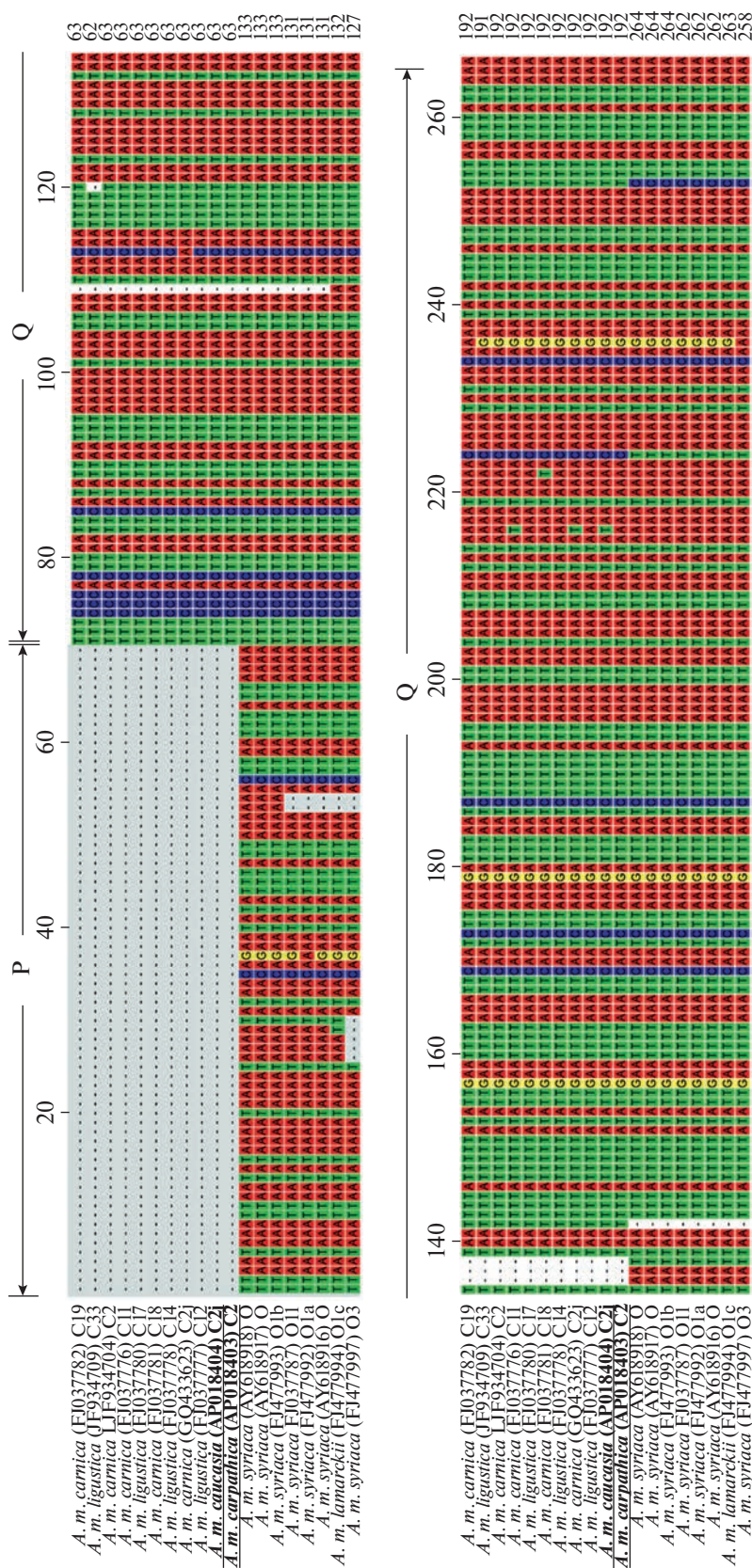


Рис. 2. Сравнительный анализ вариабельной некодирующей межгенной области между *tRNA-Leu*(UUR) и *COX2* *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* с подвидыми линиями СиО.

**Таблица 3.** Генетические различия и дистанции (выше диагонали) и число замен нуклеотидов (ниже диагонали) между последовательностями полной мтДНК образцов *A. m. caucasia*, *A. m. carpathica*, *A. m. ligustica* и *A. m. syriaca* и внешней группы *A. cerana*

Образцы	NC001566 <i>A. m. ligustica</i> (C)	KX908209 <i>A. m. ligustica</i> (C)	AP018404 <i>A. m. caucasia</i> (C)	AP018403 <i>A. m. carpathica</i> (C)	KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)	KY926882 <i>A. m. syriaca</i> (O)	GQ162109 <i>Apis cerana</i>
	генетические различия, % (генетические дистанции Jukes–Cantor)						
NC 001566 <i>A. m. ligustica</i> (C)	***	0.7 (0.001)	0.8 (0.005)	0.8 (0.005)	2.7 (0.014)	1.4 (0.012)	19.9 (0.164)
KX908209 <i>A. m. ligustica</i> (C)	137	***	1.3 (0.005)	1.3 (0.005)	3.4 (0.015)	2.1 (0.012)	20.6 (0.164)
AP018404 <i>A. m. caucasia</i> (C)	89	216	***	0.8 (0.005)	2.8 (0.015)	1.6 (0.012)	19.9 (0.164)
AP018403 <i>A. m. carpathica</i> (C)	104	221	127	***	3.0 (0.014)	1.8 (0.012)	20 (0.164)
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)	454	565	477	503	***	2.1 (0.006)	19.3 (0.162)
KY926882 <i>A. m. syriaca</i> (O)	218	331	247	279	322	***	19.8 (0.160)
GQ162109 <i>Apis cerana</i>	3342	3459	3336	3357	3245	3300	***

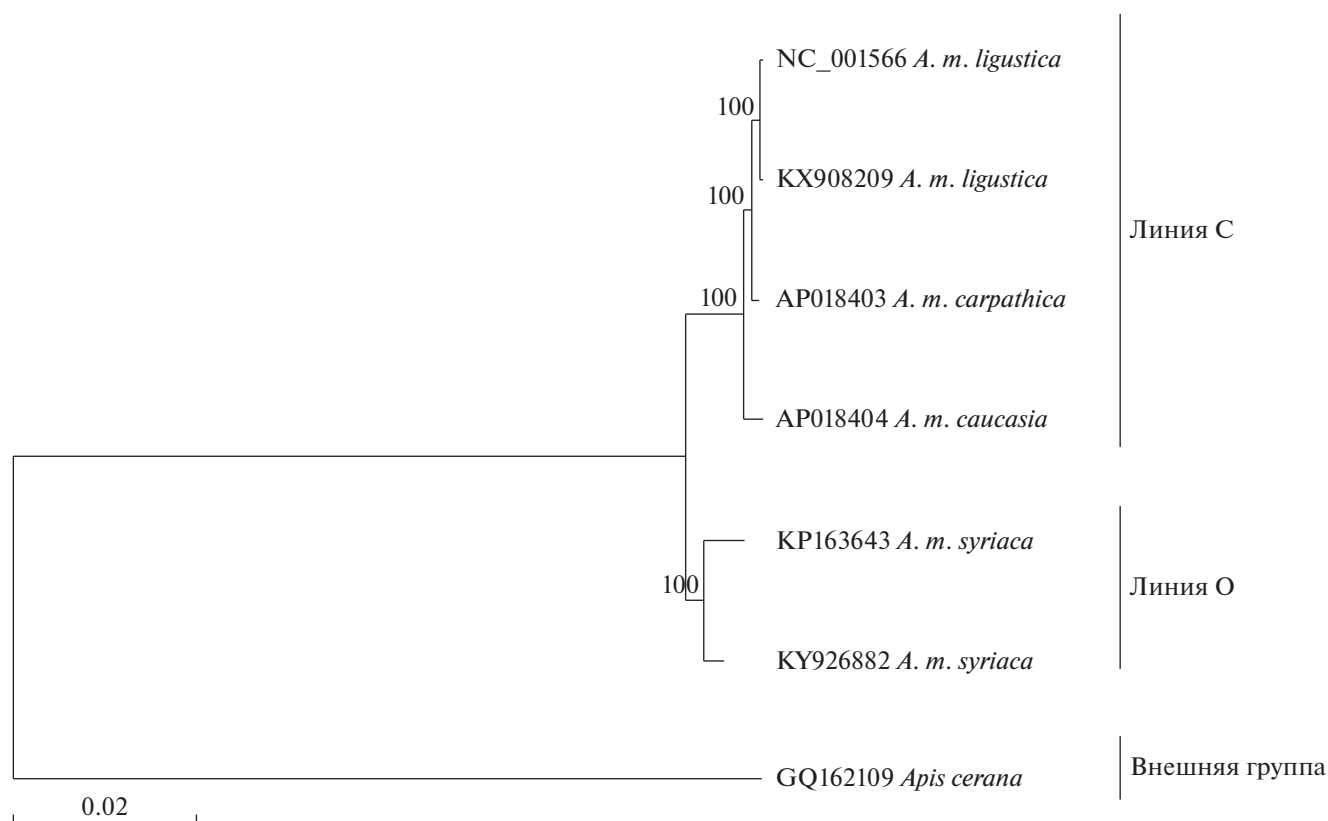
линий: подвиды линии С имеют наименьший размер 191–192 пн, а подвиды линии О имеет больший размер 258–264 пн (рис. 2). Для сравнения, мтДНК *A. cerana* имеет 22 межгенных спейсера с общим размером 705 пн, где наиболее длинный межгенный спейсер размером 231 пн расположен между генами *tRNA-Met* и *tRNA-Gln* [64].

Сравнительный анализ выровненных последовательностей полной мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* показал 17 инделов, 54 SNP, из которых 36 транзиций, 18 трансверсий. Кодированные белок гены полной мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* отличались друг от друга одним инделом, 33 SNP, из которых 27 транзиций (шесть приводили к аминокислотным заменам), шесть трансверсий (пять приводили к аминокислотным заменам). Была отмечена одна трансверсия в гене *COX1*, две трансверсии в гене *COX2*, одна трансверсия в *COX3*, две трансверсии в гене *CYTB*, четыре транзиции и одна трансверсия в гене *ND1*, три трансверсии в гене *ND2*, одна трансверсия в *ND3*, семь транзиций и одна трансверсия в гене *ND4*, две транзиции и две трансверсии в гене *ND5*, четыре транзиции и одна трансверсия в гене *ND6*. Гены рРНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* различались 17 инделами и одной транзицией. Гены тРНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* различа-

лись 10 инделами, двумя транзициями и одной трансверсией. Все межгенные некодирующие области *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* различались 27 инделами, шестью транзициями и 11 трансверсиями.

Для сравнения *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* с представителями *A. m. ligustica* (линия С) и *A. m. syriaca* (линия О) были рассчитаны % генетических различий, генетические дистанции Jukes–Cantor и число однонуклеотидных замен (SNP) полной последовательности мтДНК (табл. 3). Наибольшие различия *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* наблюдались с представителями внешней группы – *A. cerana* (20.3% генетических различий и 3346 SNP) и линии О – *A. m. syriaca* (2.3% генетических различий и 376 SNP). Наименьшие различия *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* наблюдались с представителями линии С – *A. m. ligustica* (1.1% генетических различий и 157 SNP). Пчелы *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* различались 127 SNP и содержали 0.8% генетических различий.

На основе попарных генетических дистанций Jukes–Cantor между последовательностями полной мтДНК была построена дендрограмма, отражающая филогенетические взаимоотношения представителей *A. m. caucasia*, *A. m. carpathica*, *A. m. ligustica* (линия С), *A. m. syriaca* (линия О) и внешней груп-



**Рис. 3.** Филогенетические отношения представителей *A. m. caucasia*, *A. m. carpathica*, *A. m. ligustica* и *A. m. syriaca* и внешней группы *A. cerana* на основе кластерного анализа полной мтДНК методом ближайшего соседа и генетических дистанций Jukes–Cantor. Цифрами обозначены значения бутстреп-анализа.

пы *A. cerana* (рис. 3). На дендрограмме представители подвидов линий С и О четко группируются отдельно, а *A. cerana* располагается во внешней группе.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Генофонд популяции складывается из совокупности геномов всех особей, состояние которого оценивается с использованием маркеров ядерной и митохондриальной ДНК [29, 35]. Нуклеотидные последовательности полной мтДНК могут быть использованы для идентификации подвидов и филогенетических реконструкций [18, 19, 37, 54, 59, 70]. Сейчас полные последовательности мтДНК доступны в базе данных Генбанка для пяти видов пчел рода *Apis*: *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata*, *A. florea* и *A. koschevnikovi* [24, 37, 64, 71, 72]. Сравнительный анализ полной мтДНК уже стал эффективным средством таксономической идентификации и может быть использован в сохранении генофонда локальных подвидов пчел [10, 24, 72].

Митохондриальные геномы *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica*, сходно с мтДНК других перепончатокрылых, содержат 43% нуклеотида А, 41% – Т, 6% – G, 10% – С, обогащены нуклеотидами АТ на

85%, содержат 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%) [24, 59, 64, 72, 73]. Среднее содержание GC в мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* составляет 15%. Значение генетического разнообразия и вариабельности зависит прямо пропорционально от содержания GC – чем выше содержание GC, тем выше генетическое разнообразие и вариабельность генов. Содержание GC в мтДНК менее 40% считается низким [69]. В мтДНК *A. m. caucasia* и *A. m. carpathica* нет ни одного кодирующего белок гена с содержанием GC более 40%. Гены с наибольшим содержанием GC – *COX1* (24%), *COX2* (19.6%), *CYTB* (19.1%), *COX3* (17.2%) и *ND1* (17.2%) – могут стать информативными маркерами в филогенетических и популяционных исследованиях пчел (табл. 1).

Отношение транзиций к трансверсиям tr/tv является важнейшей характеристикой мутационного процесса. В мтДНК большинства животных транзиции происходят чаще трансверсий [68, 74]. Для большинства известных эукариот в норме отношение tr/tv > 1, в то время как tr/tv < 1 указывает на высокую частоту однонуклеотидных мутаций и



инделов или низкую эффективность процесса репарации ДНК. Изменчивость отношения tr/tv в геноме может указывать в пользу локальной сменной мутационного механизма в ходе адаптации к сменяющимся условиям среды обитания [75–77].

Отношение tr/tv полной мтДНК было 2.05 между *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*, что сходно с соотношением tr/tv мтДНК 2.06 между *Drosophila melanogaster* и *D. yakuba* [78, 79]. Следовательно, мтДНК подвидов пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* отражает процесс непрерывной адаптации к сменяющимся условиям среды обитания.

АТ-обогащенная (содержание АТ 96%) некодирующая область между генами *12S rRNA* и *tRNA-Ser* мтДНК у *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* имеет размер 832 и 849 пн соответственно, что немного больше, чем у референсной последовательности *A. m. ligustica* размером 826 пн. Благодаря присутствию ТАТА, Poly-T и [TA(A)]<sub>n</sub>-подобных мотивов АТ-обогащенная некодирующая область выполняет регуляторную функцию и участвует в инициации транскрипции и репликации генов мтДНК у медоносной пчелы [64].

Большинство эукариот имеют повторяющиеся мотивы в своих геномах, которые могут повторяться сотни раз и участвовать в регуляции в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов через микроРНК. В полной мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* были обнаружены два повторяющихся 8-нуклеотидных мотива: мотив ААТТААТТ, повторяющийся 23 раза, и мотив ААТАААТТ, повторяющийся 50 раз, который может выполнять функцию транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Эти два повторяющихся мотива отличаются друг от друга только одной трансверсией Т > А в четвертой позиции.

Другая большая некодирующая область, расположенная между генами *tRNA-Leu(UUR)* и *COX2*, состоит из двух типов нуклеотидных последовательностей, названных Р (51–69 пн) и Q (194–196 пн) элементами, где Р-элемент может находиться в нескольких вариантах – Р (52–54 пн), Р0 (62–69 пн) и Р1 (50–51 пн) (рис. 2). Межгенная область *tRNA-Leu(UUR)–COX2* пчел эволюционных линий А, М и О включает Р-элемент в сочетании с различным числом копий Q-элемента, что приводит к полиморфизму длины этого региона мтДНК. Подвиды пчел линии А содержат варианты Р0 или Р1 и 1–4 Q-элемента (размер 244–853 пн); подвиды пчел линии М содержат вариант Р и 1–4 Q-элемента (размер 246–838 пн); подвиды пчел линии О содержат вариант Р и 1–4 Q-элемента (размер 256–853 пн); подвиды пчел линии С не содержат Р-элемента, а содержат только одну копию Q-элемента (размер 194–196 пн) [52]. Последовательности межгенной области *tRNA-Leu(UUR)–COX2* *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* не содержали

Р-элемента и имели размер 192 пн, аналогично девяти представителям подвидов пчел *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* линии С. Межгенные области *tRNA-Leu(UUR)–COX2* восьми представителей пчел подвидов *A. m. syriaca*, *A. m. lamarckii* линии О содержали Р-элемент и имели больший размер – 258–264 пн (рис. 2).

Выравнивание последовательностей межгенной области *tRNA-Leu(UUR)–COX2* *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* с образцами из Генбанка показало, что *A. m. carpathica* сходен с образцом *A. m. carnica* (GQ433623) гаплотип С2j, а *A. m. caucasica* сходен с образцом *A. m. carnica* (JF934704) гаплотип С2. Таким образом подвиды пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* являются представителями линии С, гаплотипы С2 и С2j соответственно (рис. 2).

Несмотря на большое сходство полной мтДНК *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*, они различались по 34 SNP в 11 генах: *ND2* (752Т>С, 936G>А, 1134Т>С), *COX1* (1933А>G), *COX2* (3632С>Т, 3767Т>С), *COX3* (5495А>Т, 6040С>Т), *ND3* (6488G>А), *ND5* (7408А>G, 7444Т>С, 7587Т>А, 7830А>С), *ND4* (8660А>Т, 8875А>G, 9394Т>С, 9772Т>С, 9789Т>С, 9906С>Т, 9919С>Т, 9956С>Т), *ND6* (10539Т>С, 10563Т>А, 10596Т>С, 10825С>Т, 10902А>G), *CYTB* (11832Т>С, 11999Т>С), *ND1* (12505G>А, 12620G>А, 12674С>Т, 12971Т>А, 13181С>Т) и *12S rRNA* (14996С>Т). Позиции SNP были пронумерованы относительно референсной последовательности *A. m. ligustica*. Более того, сайт рестрикции *XbaI*, обнаруженный в гене *ND5* в положении 7825–7830 относительно референсной последовательности, встречался только у подвида пчел *A. m. caucasica* и отсутствует у подвида пчел *A. m. carpathica*. Эти перечисленные маркеры мтДНК могут быть очень полезными при различении двух подвидов пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*.

Подвиды пчел *A. m. caucasica*, *A. m. carpathica*, *A. m. ligustica* и *A. m. syriaca* между собой имеют 0.80% генетических различий и генетическую дистанцию Jukes–Cantor 0.005 (табл. 3). Было показано, что между подвидами насекомых диапазон генетических различий 0.80–8.00%, а генетических дистанций Jukes–Cantor 0.005–0.100 [24, 63, 64, 72, 80]. Сравнимые образцы пчел между собой имеют генетические дистанции и различия, соответствующие различиям между подвидами насекомых. Следовательно, *A. m. caucasica*, *A. m. carpathica*, *A. m. ligustica* и *A. m. syriaca* – это действительно отдельные подвиды пчел, а не экотипы.

Матрица генетических дистанций Jukes–Cantor по полной последовательности мтДНК была использована в кластерном анализе для построения дендрограммы филогенетических отношений (табл. 3). Представитель внешней группы пчел *A. cerana* расположен на дендрограмме отдельно, как и предполагалось. На дендрограмме наблюдаются два крупных кластера. Первый кластер объ-

единил представителей *A. m. syriaca* (KP163643, KY926882), относящихся к линии О. Второй кластер объединил представителей *A. m. ligustica* (NC\_001566, KX908209), относящихся к линии С. Таким образом, дендрограмма на основе полной мтДНК позволяет четко дифференцировать пчел подвидов линии С и О. Объединение пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* вместе с представителями *A. m. ligustica* в одну группу доказывает их принадлежность к линии С, как и предполагалось ранее некоторыми исследователями [29, 45–47, 70] (рис. 3).

Таким образом, нами были определены нуклеотидные последовательности полной мтДНК пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* размерами 16341 и 16336 пн соответственно. МтДНК обоих подвидов содержат 13 кодирующих белок генов, 22 гена тРНК, два гена рРНК и АТ-обогащенную регуляторную область. Митохондриальные геномы *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* содержат 43% нуклеотида А, 41% – Т, 6% – G, 10% – С нуклеотидов, обогащены АТ на 85%. Отношение tr/tv полной мтДНК было 2.05 между *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*, что отражает процесс непрерывной адаптации к сменяющимся условиям среды обитания.

Большинство генов мтДНК (*ND2*, *COX1*, *COX2*, *ATP8*, *ATP6*, *COX3*, *ND3*, *ND6*, *CYTB* и 14 генов тРНК) расположены на тяжелой цепи, а меньшее число генов (*ND1*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *SrRNA*, *LrRNA* и восемь генов тРНК) расположено на легкой цепи. Гены с наибольшим содержанием GC – *COX1* (24%), *COX2* (19.6%), *CYTB* (19.1%), *COX3* (17.2%) и *ND1* (17.2%) могут быть наиболее полиморфными и успешно использованы в филогенетических и популяционных исследованиях пчел.

По структуре межгенной области *tRNA-Leu(UUR)–COX2* (отсутствие элемента Р) подвиды пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* могут быть отнесены к эволюционной линии С с гаплотипами С2 и С2j соответственно. Подвиды пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* мтДНК могут быть дифференцированы друг от друга по 34 уникальным SNP в 11 генах мтДНК и маркеру рестрикции *XbaI* в гене *ND5*.

Пчелы *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* различаются между собой, а также от пчел *A. m. ligustica* и *A. m. syriaca* по полной мтДНК на 0.8% и имеют генетическую дистанцию Jukes–Cantor 0.005. Данные значения генетических дистанций Jukes–Cantor вписываются в пределы внутривидовых различий между подвидами насекомых. Следовательно, *A. m. caucasica*, *A. m. carpathica* – это действительно отдельные подвиды пчел, а не экотипы.

Несмотря на проведенные исследования, популяции *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* остаются недостаточно изученными как в России, так и странах Европы. Авторы надеются продолжить исследова-

ния пчел подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* в пределах их естественного ареала с целью определения структуры и генетического разнообразия популяций, предотвращения внутривидовой гибридизации и сохранения уникальности их локальных генофондов.

Авторы благодарны доктору Hisashi Okuyama за помощь в секвенировании.

Работа выполнена при поддержке государственного задания (регистрационный номер АААА-А21-121011990120-7) – И.Р., грантов Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (грант № 19-54-70002 e-Asia\_t) Н.А. и программ постдокторских исследований в Инчонском 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. Delaplane K.S., Mayer D.F. Crop Pollination by Bees. CABI Publ., 2000. 344 p.
2. Klein A.M., Vaissière B.E., Cane J.H. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops // Proc. Royal Society B: Biol. Sciences. 2007. V. 274. № 1608. P. 303–313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
3. Ollerton J., Erenler H., Edwards M., Crockett R. Extinctions of aculeate pollinators in Britain and the role of large-scale agricultural changes // Science. 2014. V. 346. № 6215. P. 1360–1362. <https://doi.org/10.1126/science.1257259>
4. Papachristoforou A., Rortais A., Bouga M. et al. Genetic characterization of the cyprian honey bee (*Apis mellifera cypria*) based on microsatellites and mitochondrial DNA polymorphisms // J. Apicultural Sci. 2013. V. 57. № 2. P. 127–134. <https://doi.org/10.2478/jas-2013-0023>
5. Tennant E., Chadwick F. The Bee Book. London: Doring Kindersley Limited, 2016. 221 p.
6. Ma W., Li X., Shen J. et al. Transcriptomic analysis reveals *Apis mellifera* adaptations to high temperature and high humidity // Ecotoxicol. Environm. Safety. 2019. V. 184. P. 109599. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109599>
7. Zhang G., St. Clair A.L., Dolezal A. et al. Honey bee (Hymenoptera: Apidea) pollen forage in a highly cultivated agroecosystem: Limited diet diversity and its relationship to virus resistance // J. Econ. Entomol. 2020. V. 113. № 3. P. 1062–1072. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa055>
8. Scott-Brown A., Koch H. New directions in pollinator research: diversity, conflict and response to global change //

- Emerg. Top. Life Sci. 2020. V. 4. № 1. P. 1–6.  
<https://doi.org/10.1042/etls20200123>
9. *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. С. 792–798.  
<https://doi.org/10.7868/s0016675815070048>
  10. *Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г.* Молекулярно-генетический анализ пяти сохранившихся резерватов темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* Урала и Поволжья // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 931–942.  
<https://doi.org/10.7868/s0016675816060059>
  11. *Iwasa T., Motoyama N., Ambrose J.T., Roe R.M.* Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera* // Crop Protection. 2004. V. 23. № 5. P. 371–378.  
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018>
  12. *Decourtye A., Devillers J., Cluzeau S. et al.* Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions // Ecotoxicol. Environm. Safety. 2004. V. 57. № 3. P. 410–419.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.08.001>
  13. *Aubert M., Ball B., Fries I.* Virology and the Honey Bee. Northern Bee Books, 2008. 458 p. ISBN: 9279005863
  14. *Genersch E., Evans J.D., Fries I.* Honey bee disease overview // J. Invertebrate Pathol. 2010. V. 103. Suppl. 1. P. 2–4.  
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.015>
  15. *Cornman R.S., Tarpy D.R., Chen Y. et al.* Pathogen webs in collapsing honey bee colonies // PLoS One. 2012. V. 7. № 8. P. e43562.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043562>
  16. *van der Zee R., Pisa L., Andonov S. et al.* Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008–9 and 2009–10 // J. Apicultural Res. 2012. V. 51. № 1. P. 100–114.  
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.51.1.12>
  17. *Haddad N.J., Batainh A., Saini D. et al.* Evaluation of *Apis mellifera syriaca* Levant region honeybee conservation using comparative genome hybridization // Genetica. 2016. V. 144. № 3. P. 279–287.  
<https://doi.org/10.1007/s10709-016-9897-y>
  18. *Franck P., Garnery L., Celebrano G. et al.* Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*) // Mol. Ecol. 2000. V. 9. № 7. P. 907–921.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.00945.x>
  19. *Palmer M.R., Smith D.R., Kaftanoğlu O.* Turkish honeybees: Genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA // J. Heredity. 2000. V. 91. № 1. P. 42–46.  
<https://doi.org/10.1093/jhered/91.1.42>
  20. *Uzunov A., Kiprijanovska H., Andonov S. et al.* Morphological diversity and racial determination of the honey bee (*Apis mellifera* L.) population in the Republic of Macedonia // J. Apicultural Res. 2009. V. 48. № 3. P. 196–203.  
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.08>
  21. *Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C. et al.* Global pollinator declines: trends, impacts and drivers // Trends in Ecol. Evol. 2010. V. 25. № 6. P. 345–353.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
  22. *Oleksa A., Chybicki I., Tofilski A., Burczyk J.* Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland // J. Apicultural Res. 2011. V. 50. № 2. P. 116–129.  
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.2.03>
  23. *Özdil F., Aytakin I., Ilhan F., Boztepe S.* Genetic variation in turkish honeybees *Apis mellifera anatoliaca*, *A. m. caucasica*, *A. m. meda* (Hymenoptera: Apidae) inferred from RFLP analysis of three mtDNA regions (16S rDNA-COI-ND5) // Eur. J. Entomol. 2012. V. 109. № 2. P. 161–167.  
<https://doi.org/10.14411/eje.2012.021>
  24. *Ilyasov R., Nikolenko A., Tuktarov V. et al.* Comparative analysis of mitochondrial genomes of the honey bee subspecies *A. m. caucasica* and *A. m. carpathica* and refinement of their evolutionary lineages // J. Apicultural Res. 2019. V. 58. № 4. P. 567–579.  
<https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1622320>
  25. *Spinola S.M.* Insectorum Liguriae. Genoa, Italy: P. Cajetani, 1806. 160 p.
  26. *Pollmann A.* Werth der verschiedenen Bienenrassen und deren Varietäten, bestimmt durch Urtheile namhafter Bienenzüchter. Leipzig, Germany: Voigt, 1889. 100 p.
  27. *Foti N., Lungu M., Pelimon P. et al.* Studies on the morphological characteristics and biological traits of the bee populations in Romania // The 20th Intern. Beekeeping Jubilee Congress Apimondia. Bucharest, Romania: Apimondia, 1965. V. 20. P. 182–188.
  28. *Ivanova E.N., Bienkowska M., Petrov P.P.* Allozyme polymorphism and phylogenetic relationships in *Apis mellifera* subspecies selectively reared in Poland and Bulgaria // Folia Biologica. 2011. V. 59. № 3–4. P. 121–126.  
[https://doi.org/10.3409/fb59\\_3-4.121-126](https://doi.org/10.3409/fb59_3-4.121-126)
  29. *Bouga M., Alaux C., Bienkowska M. et al.* A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping // J. Apicultural Res. 2011. V. 50. № 1. P. 51–84.  
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.06>
  30. *Aizen M.A., Morales C.L., Vázquez D.P. et al.* When mutualism goes bad: Density-dependent impacts of introduced bees on plant reproduction // New Phytologist. 2014. V. 204. № 2. P. 322–328.  
<https://doi.org/10.1111/nph.12924>
  31. *Ollerton J., Winfree R., Tarrant S.* How many flowering plants are pollinated by animals? // Oikos. 2011. V. 120. № 3. P. 321–326.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
  32. *Tandon V., Kumar A., Rana C.* Pollination – its type, threats and role in environment conservation // Intern. J. Current Res. 2016. V. 8. № 8. P. 35744–35751.

- <https://www.journalcra.com/article/pollination-its-type-threats-and-role-environment-conservation>.
33. Natsopoulou M.E., McMahon D.P., Doublet V. et al. The virulent, emerging genotype B of Deformed wing virus is closely linked to overwinter honeybee worker loss // *Sci. Reports*. 2017. V. 7. № 1. P. 5242. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05596-3>
  34. Péntek-Zakar E., Oleksa A., Borowik T., Kusza S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies // *Ecol. Evol.* 2015. V. 5. № 23. P. 5456–5467. <https://doi.org/10.1002/ece3.1781>
  35. Kukrer M., Kence M., Kence A. Genetic evidences for the impact of anthropogenic factors on honey bee diversity // *bioRxiv*. 2017. P. 154195. <https://doi.org/10.1101/154195>
  36. Maa T.C. An inquiry into the systematics of the tribus Apidini or honeybees (Hym.) // *Treubia*. 1953. V. 21. P. 525–640.
  37. Arias M.C., Sheppard W.S. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1996. V. 5. № 3. P. 557–566. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0050>
  38. Smith D.R., Slaymaker A., Palmer M., Kaftanoğlu O. Turkish honey bees belong to the east Mediterranean mitochondrial lineage // *Apidologie*. 1997. V. 28. № 5. P. 269–274. <https://doi.org/10.1051/apido:19970503>
  39. Kandemir I., Özkan A., Fuchs S. Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach // *Apidologie*. 2011. V. 42. № 5. P. 618–627. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0063-3>
  40. 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/10.1007/978-1-4614-4960-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_18)
  41. Cauia E., Usurelu D., Magdalena L.M. et al. Preliminary researches regarding the genetic and morphometric characterization of honeybees (*A. mellifera* L.) from Romania // *Lucrări Științifice Zootehnie Și Biotehnologii*. 2008. V. 41. № 2. P. 278–286.
  42. Mărghitaș L.A., Teleky O., Dezmirean D. et al. Morphometric differences between honey bees *Apis mellifera* carpatica populations from Transylvanian area // *Lucrări Științifice Zootehnie Și Biotehnologii*. 2008. V. 41. P. 309–315.
  43. Teleky O.R., Bojan C., Moise A. et al. Ecotypes differentiation within honeybee (*Apis mellifera carpatica*) from Transylvania // *Bul. Univ. Agricultural Sci. and Veterinary Med. Cluj-Napoca – Animal Sci. and Biotechnol.* 2007. V. 64. № 1–2. P. 195–200. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:64:1-2:2256>
  44. Mărghitaș L.A., Dezmirean D., Teleky O. et al. Biodiversity testing of Transylvanian honeybee populations using mtDNA markers // *Bul. Univ. Agricultural Sci. and Veterinary Med. Cluj-Napoca – Animal Sci. and Biotechnol.* 2009. V. 66. P. 402–406. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:66:1-2:3391>
  45. Mărghitaș L.A., Coroian C., Dezmirean D. et al. Genetic diversity of honeybees from Moldova (Romania) based on mtDNA analysis // *Bul. Univ. Agricultural Sci. and Veterinary Med. Cluj-Napoca – Animal Sci. and Biotechnol.* 2010. V. 67. № 1–2. P. 396–402. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:67:1-2:5330>
  46. Coroian C.O., Muñoz I., Schlüns E.A. et al. Climate rather than geography separates two European honeybee subspecies // *Mol. Ecol.* 2014. V. 23. № 9. P. 2353–2361. <https://doi.org/10.1111/mec.12731>
  47. Syromyatnikov M.Y., Borodachev A.V., Kokina A.V., Popov V.N. A molecular method for the identification of honey bee subspecies used by beekeepers in Russia // *Insects*. 2018. V. 9. № 1. P. 10. <https://doi.org/10.3390/insects9010010>
  48. Ruttner F. *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1988. 288 p. ISBN: 978-3-642-72651-4
  49. Adl M., Gençer H.V., Firatli Ç., Bahreini R. Morphometric characterization of Iranian (*Apis mellifera meda*), Central Anatolian (*Apis mellifera anatoliaca*) and Caucasian (*Apis mellifera caucasica*) honey bee populations // *J. Apicultural Res.* 2007. V. 46. № 4. P. 225–231. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.46.4.03>
  50. Meixner M.D., Worobik M., Wilde J. et al. *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe – morphometric variation and determination of its range limits // *Apidologie*. 2007. V. 38. № 2. P. 191–197. <https://doi.org/10.1051/apido:2006068>
  51. Cornuet J.M., Garnery L. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications // *Apidologie*. 1991. V. 22. № 6. P. 627–642. <https://doi.org/10.1051/apido:19910606>
  52. 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>
  53. Koulianos S., Crozier R.H. Mitochondrial sequence characterisation of Australian commercial and feral honeybee strains, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), in the context of the species worldwide // *Austr. J. Entomol.* 1997. V. 36. № 4. P. 359–364. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.1997.tb01486.x>
  54. Smith D.R., Harris A., Johnson J. et al. Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria // *Proc. Natl Acad. Sci.* 2002. V. 99. № 9. P. 6434–6439.
  55. Алнатов В.В. Породы медоносной пчелы и их использование в сельском хозяйстве. МОИП, 1948. 183 с.

56. *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>
57. *Lowe T.M., Eddy S.R.* TRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 25. № 5. P. 955–964. <https://doi.org/10.1093/nar/25.5.0955>
58. *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>
59. *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>
60. *Kim J.S., Kim M.J., Kim I.* The complete mitochondrial genome of Italian honey bees *Apis mellifera ligustica* (Hymenoptera: Apidae) // GenBank: KX908209. 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX908209>.
61. *Skorikov A.S.* Beitrage zur Kenntnis der Kenntnis der kaukasischen Honigbienenrassen // *Reports of Applied Entomol.* 1929. V. 4. P. 1–59.
62. *Haddad N.J.* Mitochondrial genome of the levant region honeybee, *Apis mellifera syriaca* (Hymenoptera: Apidae) // *Mitochondrial DNA Part A: DNA Mapping, Sequencing, and Analysis.* 2016. V. 27. № 6. P. 4067–4068. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.1003846>
63. *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>
64. *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>
65. *Cockerell T.D.A.* A fossil honey-bee // *Entomologist.* 1906. V. 40. P. 221–229.
66. *Jukes T.H., Cantor C.R.* Evolution of protein molecules // *Mammalian Protein Metabolism* / Ed. Munro H.N. N.Y., USA: Acad. Press, 1969. P. 21–132.
67. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. P. 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
68. *Clary D.O., Wolstenholme D.R.* The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code // *J. Mol. Evol.* 1985. V. 22. № 3. P. 252–271. <https://doi.org/10.1007/BF02099755>
69. *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 // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 44. P. 18012–18017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208094109>
70. *Özgül F., Yıldız M.A.* Molecular characterization of Turkish honey bee populations (*Apis mellifera*) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence results // *Apidologie.* 2009. V. 40. № 5. P. 570–576. <https://doi.org/10.1051/apido/2009032>
71. *Rand D.M., Kann L.M.* Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA // *Genetica.* 1998. V. 102–103. P. 393–407. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-5210-5\\_32](https://doi.org/10.1007/978-94-011-5210-5_32)
72. *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>
73. *Okuyama H., Tingek S., Takahashi J.I.* The complete mitochondrial genome of the cavity-nesting honeybee, *Apis cerana* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) from Borneo // *Mitochondrial DNA Part B: Resources.* 2017. V. 2. № 2. P. 475–476. <https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1361344>
74. *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>
75. *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>
76. *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>
77. *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>
78. *Keightley P.D., Trivedi U., Thomson M. et al.* Analysis of the genome sequences of three *Drosophila melanogaster* spontaneous mutation accumulation lines // *Genome Res.* 2009. V. 19. № 7. P. 1195–1201. <https://doi.org/10.1101/gr.091231.109>
79. *Seplyarskiy V.B., Kharchenko P., Kondrashov A.S., Bazjukin 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>
80. *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>

## Phylogenetic Relationships among Honey Bee Subspecies *Apis mellifera caucasia* and *Apis mellifera carpathica* according to the Sequences of the Mitochondrial Genome

R. A. Ilyasov<sup>a, b, \*</sup>, G. Y. Han<sup>b</sup>, M. L. Lee<sup>b</sup>, K. W. Kim<sup>b</sup>,  
J. H. Park<sup>b, c</sup>, J. I. Takahashi<sup>d</sup>, H. W. Kwon<sup>b, \*\*</sup>, and A. G. Nikolenko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ufa Federal Research Center, Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

<sup>b</sup>Division of Life Sciences, Major of Biological Sciences, Incheon National University, Convergence Research Center for Insect Vectors, Incheon National University, Incheon, 22012 Korea

<sup>c</sup>Bioinformatics Company 3BIGS CO.LTD, Hwaseong-si, 18454 Korea

<sup>d</sup>Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Kyoto, 603-8555 Japan

\*e-mail: apismell@hotmail.com

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

The sequences of the complete mitochondrial genome of the honey bee *Apis mellifera* L. subspecies *Apis mellifera caucasia* Pollmann, 1889 (AP018404, 16341 bp) and *Apis mellifera carpathica* Foti et al., 1965 (AP018403, 16336 bp) were first sequenced. Mitochondrial DNA (mtDNA) of both subspecies contains 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes, 2 rRNA genes and 1 AT-rich regulatory region. The ratio of transitions to transversions tr/tv in complete mtDNA between *A. m. caucasia* and *A. m. carpathica* was 2.05, which characterizes the formation of adaptations to changing environmental conditions. Genes with the highest GC content – *COX1* (24%), *COX2* (19.6%), *CYTB* (19.1%), *COX3* (17.2%) and *ND1* (17.2%) can be highly polymorphic and used in phylogenetic and population studies of bees. Most of mtDNA genes for both subspecies are located on the heavy chain (9 protein coding genes and 14 tRNA genes) and fewer genes (4 protein coding genes, 2 rRNA genes and 8 tRNA genes) are located on the light chain. Cluster analysis of the complete mtDNA sequence and assessment of the structure of the *tRNA-Leu(UUR)*–*COX2* intergenic region with a single Q element of 192 bp showed that both subspecies *A. m. caucasia* and *A. m. carpathica* are representatives of the line C with haplotypes C2 and C2j, respectively. Subspecies of the honey bee *A. m. caucasia* and *A. m. carpathica* can be differentiated from each other by 34 unique SNPs in 11 mtDNA genes and the *XbaI* restriction marker in the *ND5* gene. These genetic markers can contribute to the preservation of purebred gene pools of honey bee subspecies *A. m. caucasia* and *A. m. carpathica* within their natural range.

**Keywords:** *Apis mellifera*, honeybee subspecies, *A. m. caucasia*, *A. m. carpathica*, mitochondrial genome, mtDNA, haplotypes, conservation genetics.