

Эволюционные взаимоотношения КОРЕЙСКОЙ И УССУРИЙСКОЙ популяций восковой пчелы

Восковая пчела (*Apis cerana* Fabricius, 1793) вторая по значимости для человека после медоносной (*A. mellifera* L., 1758). До настоящего времени их естественные ареалы не перекрывались и были ограничены Европой и Африкой у *A. mellifera* и Азией у *A. cerana*. Оба вида приспособлены к обитанию в широком диапазоне климатических поясов от холодного умеренного до жаркого экваториального (Ruttner, 1988). В азиатских странах *A. cerana* разводят на пасеках, а в России она встречается только в диком состоянии в лесах Хабаровского и Приморского краев до 47°54' с.ш. [2].

В Азии восковая пчела — важный опылитель сельскохозяйственных культур и производитель меда, воска, маточного молочка и обножки (Behura, 2007). Она не уступает медоносной пчеле 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 связи с распространением вируса мешотчатого расплода (SBV) и массового импорта *A. mellifera* (Choi et al., 2010; Vung et al., 2017) [6].

Внутри *A. cerana* выделено более 20 подвидов, большинство из которых не имеют четких таксономических диагнозов (Zhuang, 1989; Zhen-ming et al., 1992; Diniz-Filho, Malapsina, Pignata, 1993; Engel, 1999; Sugawara, 2000; Hepburn et al., 2001; Radloff et al., 2010) [1, 4, 5, 9, 10]. 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) — эффективные инструменты в исследовании эволюции и межвидовых и внутривидовых филогенетических взаимоотношений медоносных пчел (Cornuet, Garnery, Solignac, 1991, 1992; Garnery et al., 1995; Arias, Sheppard, 1996; Songrarn, Sittipraneed, Klinbunga, 2006; Tan et al., 2011) [5].

Мы секвенировали и аннотировали последовательности полной мтДНК пчел

подвидов *A. c. ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 [GenBank/DDBJ AP018450 (ZooBank O6874b0a-029b-40e2-b4a8-1a20f7692ed3)] из Приморского края, *A. c. koreana* Ilyasov et al., 2019 [GenBank/DDBJ AP018431 (ZooBank 290E12BA-FC5F-4907-AE50-EF0FA8DC8D9C)] из Южной Кореи и шести экзонов гена вителлогенина *VG E2-E7* ядерной ДНК (ядНК) подвидов *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana* и *A. c. indica*. Оценивали филогенетические взаимоотношения *A. c. ussuriensis* с другими подвидами из Южной Кореи, Китая, Японии, Тайваня и Индонезии на основе полной мтДНК и гена *VG* яДНК.

Взрослые рабочие особи *A. c. ussuriensis* Ilyasov et al. были отобраны в лесном массиве пригорода Владивостока (Приморский край, Россия; 43°11' с.ш. 132°55' в.д.), *A. c. koreana* Ilyasov et al. — в Южной Корее на пасеках Gokseong-gun, Gokseong-eup, Hakjung-ri, Jeollanam-do (35°24' с.ш. 127°27' в.д.), Sangju-si, Gyeongsangbuk-do (36°42' с.ш., 128°18' в.д.), Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do (35°36' с.ш., 128°88' в.д.), *A. c. japonica* — в Японии, Hokkaido, на пасеке Kitahiroshima (42°95' с.ш., 141°53' в.д.), *A. c. indica* - в Тайване на пасеке Taichung (24°04' с.ш., 120°73' в.д.).

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. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) экзонов 2-7 гена вителлогенина (VG) проводили на 96-луночном термочиклере Applied Biosystems Veriti HID, 0,2 мл на основе уже разработанных праймеров (Kent et al., 2011) и наборе для ПЦР TaKaRa [100 мкл ПЦР x 100 реакций (TAKARA BIO INC., Shiga, Япония)] в соответствии с инструкциями производителя. Все продукты ПЦР очищали с помощью набора QIAquick [250 (QIAGEN, Hilden, Германия)], следуя инструкциям производителя.

Секвенирование мтДНК провели с помощью набора NextSeq 500/550 High Output

Kit v. 2 [75 циклов (ILLUMINA, США)] парными циклами считывания (2 Ч 150 п.н.) с использованием секвенатора Illumina Next Seq 500 (ILLUMINA, США) в Университете Киото Сангё (Япония), следуя инструкции производителя. Геномные библиотеки приготовили с помощью набора для подготовки ДНК-библиотеки Nextera (ILLUMINA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Сборку геномов проводили на основе 1 662 000 прочтений с средним покрытием 75 с помощью Geneious R9 (BIOMATTERS, Новая Зеландия). Аннотацию геномов выполняли на MITOS (Германия) (Bernt et al., 2013) и tRNAscan-SE (CA, США) (Lowe, Eddy, 1997). Секвенирование экзонов гена вителлогенина VG яДНК выполнили с обоих концов дидезокси-методом Sanger (Sanger, Nicklen, Coulson, 1977) на секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, США) с помощью набора ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 в Инчхонском национальном университете (Южная Корея).

Нуклеотидные последовательности полной мтДНК депонировали в базы данных GenBank/DDBJ под номерами AP018431 для *A. c. koreana* (15925 п.н.) [ZooBank 290E12BA-FC5F-4907-AE50-EF0FA8DC8D9C (Gokseong-gun, Jeollanam-do)] и AP018450 для *A. c. ussuriensis* (15919 п.н.) [ZooBank 06874b0a-029b-40e2-b4a8-1a20f7692ed3 (Приморский край)]. Нуклеотидные последовательности экзонов 2-7 гена VG были депонированы под номерами MH755745, MH755780, MH755815, MH755850, MH755885, MH755920 (4125 п.н.) и MH755746, MH755781, MH755816, MH755851, MH755886, MH755921 (4125 п.н.) для двух представителей *A. c. ussuriensis* (Приморский край); MH755735, MH755770, MH755805, MH755840, MH755875, MH755910 для *A. c. koreana* (Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do); MH755741, MH755776, MH755811, MH755846, MH755881, MH755916 (4125 п.н.) и MH755742, MH755777, MH755812, MH755847, MH755882, MH755917 (4125 п.н.) для *A. c. japonica* (Kitahiroshima); MH755747, MH755782, MH755817, MH755852, MH755887, MH755922 (4128 п.н.) и MH755748, MH755783, MH755818, MH755853, MH755888, MH755923 (4128 п.н.) для *A. c. indica* (Taichung).

Сравнительный анализ полной мтДНК провели с использованием последовательностей из Генбанка: *A. c. japonica* AP017314 [15917 п.н. (Киото, Япония)], *A. c. japonica* AP017941 [15778 п.н. (Amami, Япония)], *A. c. cerana* AP017983 [15460 п.н. (Jiangsu, Китай)], *A. c. cerana* KM244704 [15712 п.н. (Yunnan, Китай)], *A. c. indica* AP017984 [15376 п.н. (Taipei, Тайвань)], *A. c. indica* AP018149 [15884 п.н. (Sabah, Борнео, Малайзия)], *A. c. koreana* AP018431 [15925 п.н. (Jeollanam-do, Южная Корея)], *A. c. koreana* KX908206 [15904 п.н.

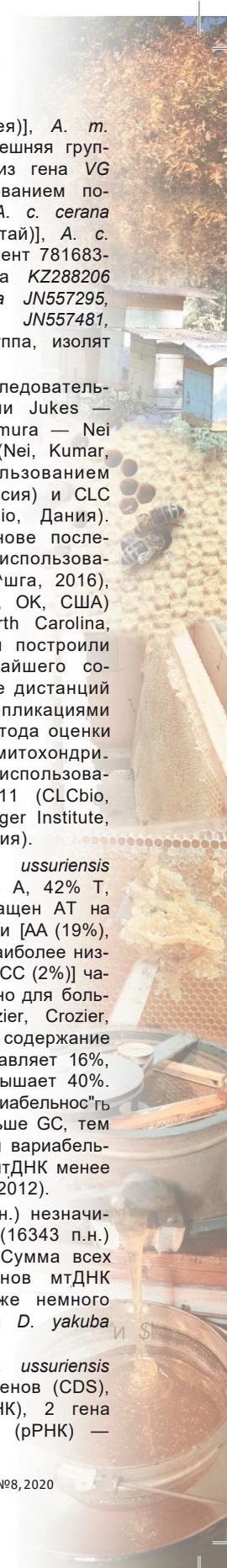
(Chungcheongbukdo, Южная Корея)], *A. m. ligustica* NC 001566 [16324 п.н. (внешняя группа, США)]. Сравнительный анализ гена VG яДНК также провели с использованием последовательностей из Генбанка: *A. c. cerana* KT725235 [4125 п.н. (Yunnan, Китай)], *A. c. cerana* ApisCC1.0 [4125 п.н., фрагмент 781683-788069 из геномного скаффолда KZ288206 (Yunnan, Китай)], *A. m. mellifera* JN557295, JN557387, JN557201, JN557573, JN557481, JN557109 [4074 п.н. (внешняя группа, изолят M2261, Warsaw, Польша)].

Дивергенция нуклеотидных последовательностей и генетические дистанции Jukes — Cantor (Jukes, Cantor, 1969), Tamura — Nei (Tamura, Nei, 1993) и p-distance (Nei, Kumar, 2000) рассчитывали с использованием Unipro UGENE 1.28 (UNIPRO, Россия) и CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания). Филогенетический анализ на основе последовательностей ДНК провели с использованием MEGA7 (Kumar, Stecher, Tamura, 2016), Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, США) и JMP14 (SAS Institute Inc., North Carolina, США). Филогенетические деревья построили с использованием метода ближайшего соседа (Saitou, Nei, 1987) на основе дистанций Jukes-Cantor с 1000 бутстреп репликациями и Reltime (Tamura et al., 2012) метода оценки длины ветвей. Физическая карта митохондриального генома была создана с использованием CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания) и Artemis 17.0.1 (The Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, Великобритания).

Митохондриальный геном *A. c. ussuriensis* (Приморский край) содержит 42% А, 42% Т, 6% Г, 10% С нуклеотидов, обогащен АТ на 84%, отличается наиболее высокими [AA (19%), AT (18%), TT (18%) и TA (16%)] и наиболее низкими [GG (1%), GC (1%), CG (1%) и CC (2%)] частотами динуклеотидов, что характерно для большинства перепончатокрылых (Crozier, Crozier, 1993; Tan et al., 2011) [8]. Среднее содержание GC в мтДНК *A. c. ussuriensis* составляет 16%, а максимальный уровень не превышает 40%. Генетическое разнообразие и вариативность зависит от GC состава — чем больше GC, тем выше генетическое разнообразие и вариативность генов. Концентрация GC в мтДНК менее 40% считается низкой (Kent et al., 2012).

МтДНК *A. c. ussuriensis* (15919 п.н.) незначительно короче мтДНК *A. mellifera* (16343 п.н.) и *Drosophila yakuba* (16019 п.н.). Сумма всех межгенных некодирующих регионов мтДНК *A. c. ussuriensis* (1252 п.н.) также немного короче *A. mellifera* (1639 п.н.) и *D. yakuba* (1262 п.н.) (Crozier, Crozier, 1993).

Митохондриальный геном *A. c. ussuriensis* содержит 30 белок кодирующих генов (CDS), 22 гена транспортной РНК (тРНК), 2 гена субъединиц рибосомальной РНК (рРНК) —



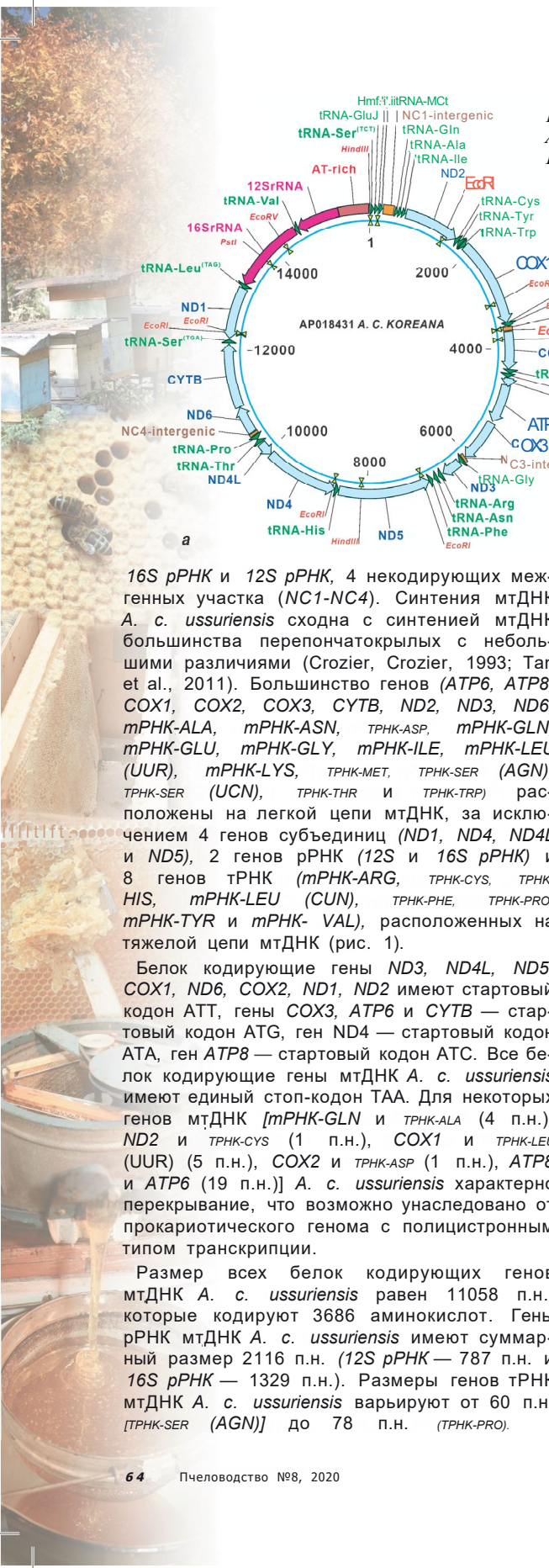


Рис. 1. Кольцевая физическая карта полной мтДНК *A. c. koreana* Jeollanam-do (а) и *A. c. ussuriensis* Приморский край (б)

16S *pPHK* и 12S *pPHK*, 4 некодирующих меж-
генных участка (*NC1-NC4*). Синтения мтДНК
A. c. ussuriensis сходна с синтением мтДНК
большинства перепончатокрылых с неболь-
шими различиями (Crozier, Crozier, 1993; Tan
et al., 2011). Большинство генов (*ATP6*, *ATP8*,
COX1, *COX2*, *COX3*, *CYTB*, *ND2*, *ND3*, *ND6*,
mPHK-ALA, *mPHK-ASN*, *TPHK-ASP*, *mPHK-GLN*,
mPHK-GLU, *mPHK-GLY*, *mPHK-ILE*, *mPHK-LEU*
(*UUR*), *mPHK-LYS*, *TPHK-MET*, *TPHK-SER* (*AGN*),
TPHK-SER (*UCN*), *TPHK-THR* и *TPHK-TRP*) рас-
положены на легкой цепи мтДНК, за исклю-
чением 4 генов субъединиц (*ND1*, *ND4*, *ND4L*
и *ND5*), 2 генов *pPHK* (12S и 16S *pPHK*) и
8 генов *TPHK* (*mPHK-ARG*, *TPHK-CYS*, *TPHK-*
HIS, *mPHK-LEU* (*CUN*), *TPHK-PHE*, *TPHK-PRO*,
mPHK-TYR и *mPHK- VAL*), расположенных на
тяжелой цепи мтДНК (рис. 1).

Белок кодирующие гены *ND3*, *ND4L*, *ND5*, *COX1*, *ND6*, *COX2*, *ND1*, *ND2* имеют стартовый кодон АТТ, гены *COX3*, *ATP6* и *CYTB* — стартовый кодон АТГ, ген *ND4* — стартовый кодон АТА, ген *ATP8* — стартовый кодон АТС. Все белок кодирующие гены мтДНК *A. c. ussuriensis* имеют единый стоп-кодон ТАА. Для некоторых генов мтДНК [*mPHK-GLN* и *TPHK-ALA* (4 п.н.), *ND2* и *TPHK-CYS* (1 п.н.), *COX1* и *TPHK-LEU* (UUR) (5 п.н.), *COX2* и *TPHK-ASP* (1 п.н.), *ATP8* и *ATP6* (19 п.н.)] *A. c. ussuriensis* характерно перекрывание, что возможно унаследовано от прокариотического генома с полицистронным типом транскрипции.

Размер всех белок кодирующих генов мтДНК *A. c. ussuriensis* равен 11058 п.н. которые кодируют 3686 аминокислот. Гены рРНК мтДНК *A. c. ussuriensis* имеют суммарный размер 2116 п.н. (12S рРНК — 787 п.н. и 16S рРНК — 1329 п.н.). Размеры генов тРНК мтДНК *A. c. ussuriensis* варьируют от 60 п.н. (TRNK-SER (AGN)) до 78 п.н. (TRNK-PRO).

МтДНК *A. c. ussuriensis* содержит 4 некодирующих межгенных участка (*NC1-NC4*), что характерно для всех представителей *A. cerana* [7]. Некодирующая межгенный участок *NC1* (228 п.н.) расположена между генами *tRNA-MET* и *tRNA-GLN*; *NC2* (89 п.н.) — между генами *tRNA-LEU* (TAA) и *COX2*; *NC3* (68 п.н.) — между генами *COX3* и *tRNA-GLY*; *NC4* (51 п.н.) — между генами *тРНК-PRO* и *ND6*. Все некодирующие межгенные и АТ-богатые участки *A. c. ussuriensis* составляют менее 8% от всего размера мтДНК. Некодирующие межгенные и АТ богатые участки являются регуляторными областями и содержат повторяющиеся мотивы. Мотив ААТТААТТ встречался в мтДНК 48 раз, мотив ААТАААТТ — 74 раза, ТАСТТА — вероятный сайт связывания митохондриального терминатора транскрипции (*mtTERM*) — 8 раз (Tan et al., 2001).

Некодирующий межгенный участок *NC2 A. c. ussuriensis* идентичен с гаплотипом *Japan01* (последовательности *KP064995* и *AP018431*). Некодирующий межгенный участок *NC2* не обладает идентичностью ни с одним из 10 опубликованных гаплотипов (*ACNC101* — *ACNC110*) и был обозначен как гаплотип *ACNC111* [1, 7, 9]. Гаплотип *ACNC111* наиболее близок к гаплотипу *ACNC101* (последовательности *KP064870* и *KP064972*) и отличается вставкой 31insT относительно начала последовательности *NC1*.

Окончание следует

Р.А.ИЛЬЯСОВ¹, Г.Ю.ХАН², М.Л.ЛИ², К.В.КИМ²,
М.Ю.ПРОЩАЛЫКИН³, А.С.ЛЕЛЕЙ³,

Д.И. ТАКАХАШИ⁴, Х.В. КВОН², А.Г. НИКОЛЕНКО¹

¹Уфимский федеральный исследовательский центр РАН

²Отделение наук о жизни и Исследовательский центр

насекомых переносчиков болезней,

Инчхонский национальный университет

³Федеральный научный центр биоразнообразия

⁴Факультет естественных наук, Университет Киото, Сангё