

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЕРОЙ ГОРНОЙ КАВКАЗСКОЙ ПЧЕЛЫ *Apis mellifera caucasica*

© 2024 г. М. Д. Каскинова¹*, Л. Р. Гайфуллина¹, Е. С. Салтыкова¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

Поступила в редакцию 01.02.2024 г.

После доработки 16.02.2024 г.

Принята к публикации 20.02.2024 г.

В данном исследовании приводятся результаты сравнительного генетического анализа пчел подвита *Apis mellifera caucasica* с подвидами *A. m. carnica* и *A. m. mellifera*. Мы выполнили анализ полиморфизма девяти микросателлитных локусов (*Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28* и *A43*) и установили гаплотипы на основе анализа нуклеотидной изменчивости митохондриального маркера *tRNA_{leu}-COII*. Анализ генетической структуры трех подвидов медоносной пчелы, широко распространенных на территории России, показал значимый уровень их дифференциации даже при использовании небольшого набора микросателлитных локусов. Оценка распространенности гаплотипов *tRNA_{leu}-COII* в трех исследуемых выборках показала, что для *A. m. caucasica* преобладающим гаплотипом является С2j.

Ключевые слова: локус *tRNA_{leu}-COII*, микросателлиты, *Apis mellifera caucasica*, дифференциация подвидов.

DOI: 10.31857/S0016675824080125 **EDN:** BFGGHW

Apis mellifera caucasica Gorb. или серая горная кавказская пчела впервые была описана в 1916 г. [1]. Эта пчела привлекла внимание пчеловодов и ученых своей продуктивностью, незлобивостью и способностью опылять красный клевер [2]. Ареалом *Apis mellifera caucasica* является Кавказ [1–3]. На территории России она обитает в регионах Южного и Северо-Кавказского федеральных округов. Созданная в 1963 г. Краснополянская опытная станция осуществляет свою научную и хозяйственную деятельность по разведению этого подвида медоносной пчелы [4]. В начале XX в. начался массовый экспорт *A. m. caucasica* в другие регионы России и за рубеж [2]. Геном *A. m. caucasica* был расшифрован в 2020 г. китайскими учеными с помощью технологии секвенирования PacBio (Genome assembly ASM1384120v1, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_013841205.1/). Помимо того в Генбанке зарегистрирован полный митохондриальный геном *A. m. caucasica* (GenBank ID: MN714160).

На основании морфометрических и генетических различий все известные подвиды были разделены на четыре эволюционные ветви: африканскую (А), западно- и североευропейскую (М), восточноевропейскую (С) и западно-центральноазиатскую (О) [3, 5, 6]. На основании этой

классификации *A. m. caucasica* принадлежит к эволюционной ветви О наряду с *A. m. anatoliaca*, *A. m. remipes*, *A. m. macedonica*, *A. m. cecropia* и *A. m. cypria* [3, 6]. В 1993 г. Л. Гарнери с соавт. установил, что с помощью полиморфизма межгенного локуса *tRNA_{leu}-COII* (или *COI-COII*) мтДНК можно дифференцировать пчел из эволюционных ветвей А, М и С [7]. Этот метод, получивший название DnaI-тест, основан на анализе длин рестрикционных фрагментов межгенного локуса *tRNA_{leu}-COII*. Подвид *A. m. caucasica* по морфометрическим и полногеномным данным относится к ветви О, но при этом имеет общие гаплотипы *tRNA_{leu}-COII* с подвидами из эволюционной ветви С (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*) [8]. Следовательно, с помощью анализа данного локуса невозможно дифференцировать *A. m. caucasica* от подвидов из ветви С. Однако есть исследования, свидетельствующие о том, что подвиды из ветви С отличаются по частотам гаплотипов *tRNA_{leu}-COII* [9, 10].

Цель настоящей работы – выявить генетические особенности популяции серой горной кавказской пчелы с помощью анализа микросателлитных локусов и межгенного локуса мтДНК *tRNA_{leu}-COII*.

Для анализа полиморфизма микросателлитных локусов (*Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A113*, *A88*, *Ap049*,

A28 и *A43*) и межгенного локуса мтДНК *tRNA_{Leu}-COII* нами были сформированы три выборки. Выборка *A. m. caucasica* ($N = 90$) представлена пчелиными семьями, отобранными на Краснодарской опытной станции пчеловодства (Краснодарский край, Сочинский р-н, п. Красная Поляна) в период 2008–2020 гг. Выборка *A. m. mellifera* ($N = 93$) была отобрана в Бурзянском р-не Башкортостана, а также в Пермском крае. Выборка *A. m. carnica* ($N = 118$) была отобрана из пасек Республики Адыгея, Оренбургской обл., Узбекистана и Казахстана. Из исследуемых выборок нами были отобраны по 20 особей каждого подвида для оценки гаплотипов локуса *tRNA_{Leu}-COII* с помощью секвенирования.

ДНК выделяли из мышц торакса рабочих пчел с использованием набора ДНК-ЭКСТРАН-2 (ООО “СИНТОЛ”, Москва). Качество и количество тотальной ДНК анализировали на спектрофотометре Implen N60. Смесь ПЦР на десять образцов общим объемом 150 мкл включала 120 мкл дистиллированной воды, 15 мкл магниевого буфера, 3 мкл смеси DNTP (концентрация – 10 мкм каждого), по 5 мкл F-прайма и R-прайма (концентрация – 10 пикомоль/мкл) и 3 мкл Taq-полимеразы. Режим ПЦР: 3 мин 94 °С, затем 30 циклов с денатурацией 30 с при 94 °С, отжигом 30 с при 49 °С (для локуса *tRNA_{Leu}-COII*) и 55 °С (для микросателлитных локусов), элонгацией 60 с при 72 °С и конечной элонгацией 3 мин при 72 °С. Для визуализации продуктов амплификации использовали электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей детекцией в фотосистеме Gel Doc™ XR+ (BioRad, США).

Данные по микросателлитным локусам были использованы для определения генетической структуры выборок с помощью программы Structure 2.3.4 с заданным числом кластеров от 1 до 10. Количество предполагаемых групп (K) рассчитывали в Structure Harvester [11, 12]. Анализ был выполнен при помощи модели Admixture с указанием информации о географической локализации выборок (LocPrior) и с Burnin Period и MCMC, равных 10 000 и 100 000 повторов соответственно. Результаты анализа обрабатывали в CLUMPP 1.1.2 с помощью алгоритма FullSearch. Стандартное генетическое расстояние Nei [13] было рассчитано в POPULATION ver.1.2.32.

Секвенирование 60 амплификатов *tRNA_{Leu}-COII* выполнили в ООО “Синтол” (Москва). Последовательности ДНК редактировали и обрезали вручную с помощью программного обеспечения MEGA для получения согласованных последовательностей, которые затем выравнивали с ранее опубликованными последовательностями *tRNA_{Leu}-COII* с использованием алгоритма Clustal W. *In silico* DraI тест последовательностей *tRNA_{Leu}-COII* был выполнен с помощью Unipro UGENE ver. 36.

На первом этапе работы мы выполнили анализ полиморфизма девяти микросателлитных локусов (*Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28* и *A43*) в выборках *A. m. caucasica*, *A. m. carnica* и *A. m. mellifera*. На рис. 1 представлены результаты кластерного анализа исследуемых выборок. DeltaK, используемая для расчета оптимального числа кластеров, достигла пиков при $K = 2$ ($\text{delta}K = 1479.4$) и при $K = 3$ ($\text{delta}K = 276.6$). При $K = 2$ выборки *A. m. caucasica* и *A. m. carnica* вошли в один кластер. Дифференциация трех подвидов наблюдалась при $K = 3$. Стандартное генетическое расстояние Nei между *A. m. caucasica* и *A. m. carnica* составило 0.269. В работе S. Nikolova с соавт. генетическое расстояние Nei между этими двумя подвидами составило 0.384 на основе анализа полиморфизма девяти микросателлитных локусов [14].

Следующим нашим шагом было установление гаплотипов локуса *tRNA_{Leu}-COII*. Последовательности гаплотипов с указанием географических данных доступны по ссылке <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.22348063>. Уникальные последовательности *tRNA_{Leu}-COII* были депонированы в GenBank под номерами OR761847–OR76187.

На территории России обитают подвиды трех эволюционных ветвей: М (*A. m. mellifera*), С (*A. m. carnica*, *A. m. ligustica*) и О (*A. m. caucasica*). С помощью разделения продуктов амплификации локуса *tRNA_{Leu}-COII* в 8%-ном ПААГ было установлено, что все образцы *A. m. caucasica* и *A. m. carnica* имеют аллельный вариант Q, характерный для представителей эволюционной ветви С (фрагмент размером 571 пн), тогда как все образцы *A. m. mellifera* имели вариант PQQ размером 825 пн, характерный для ветви М. Несмотря на то, что мы не можем различать эволюционные ветви С и О с помощью анализа локуса *tRNA_{Leu}-COII*, нам было интересно узнать, существуют ли различия в частотах гаплотипов между *A. m. caucasica* и *A. m. carnica*. Секвенирование амплификатов локуса *tRNA_{Leu}-COII* показало, что из 20 семей *A. m. caucasica* 16 имели гаплотип C2j и две семьи имели варианты гаплотипа C2j – C2jd и C2jf. Оставшиеся две семьи имели гаплотипы C2с и C2l. В выборке *A. m. carnica* преобладающим гаплотипом был C2с. У *A. m. mellifera* гаплотип M17j был доминирующим. В табл. 1 представлен список выявленных гаплотипов.

Последовательности *tRNA_{Leu}-COII* из Генбанка, принадлежащие *A. m. caucasica* (Ap018404.1 из России, OP404074.1 и OP404073.1 из Турции, MN714160.1 из США), также относятся к эволюционной ветви С. Последовательности Ap018404.1, OP404074.1 и OP404073.1 относятся к гаплотипу C2j. MN714160.1 отличается от C2j только на одну замену. Образцы *A. m. caucasica* из Турции из работы S. Tozkar с соавт. также относятся к гаплотипу C2j [15]. Таким образом, по этим немногочисленным данным можно предположить, что для

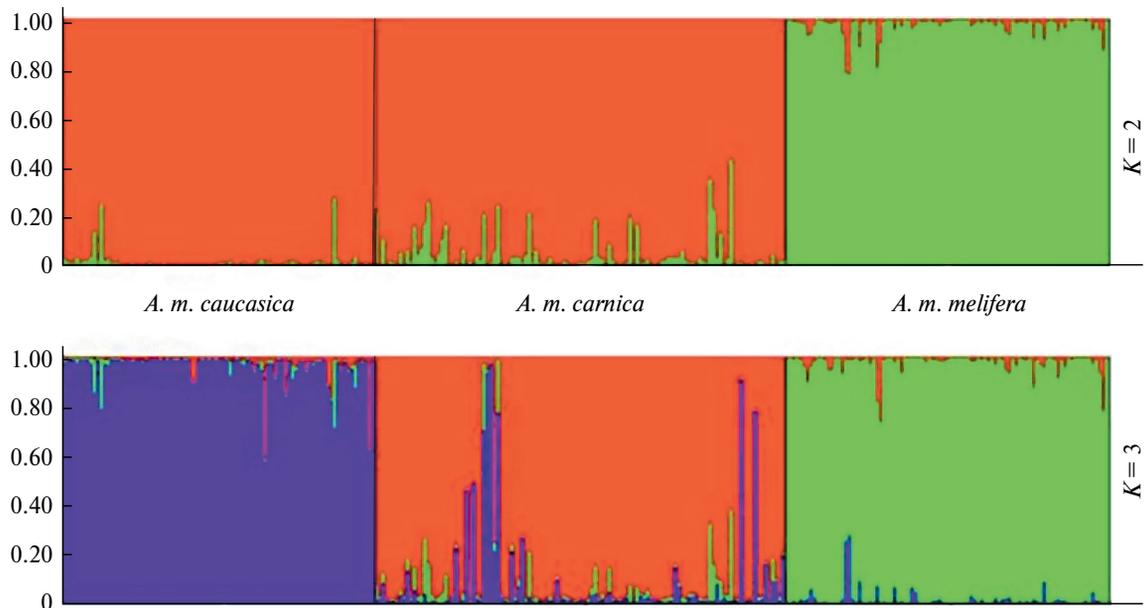


Рис. 1. Генетическая структура исследуемых выборок при $K = 2$ и $K = 3$.

популяции серой горной кавказской пчелы характерным гаплотипом является C2j.

Ранее предполагалось, что подвиды из ветви С отличаются по частотам гаплотипов *tRNA_{Leu}-COII* [9, 10]. Для итальянской пчелы *A. m. ligustica* доминирующим гаплотипом является С1 [10, 16–18]. Для *A. m. carnica*, по одним данным, доминирующим гаплотипом является С2с [9], по другим – С2j [10]. В первом случае идентификация гаплотипов была основана на *DraI* ПДРФ анализе амплификатов *tRNA_{Leu}-COII*. Пчелы были отобраны в Словении, в естественном ареале обитания данного подвида. Во втором случае пчелы были отобраны из разных штатов США, куда пчелы разных подвидов были завезены с XVII в. [2, 17, 19]. Авторы этой работы отмечают, что гаплотип С2j отличается от других гаплотипов гаплогруппы С2. Кроме того, указывается, что пчелы с гаплотипом С2j вошли в

общий кластер с образцами *A. m. caucasica* из Генбанка [10].

К эволюционной ветви О, помимо *A. m. caucasica*, относятся также подвиды *A. m. anatoliaca* (Турция), *A. m. remipes* (Армения), *A. m. macedonica* (Северная Македония, Греция, Болгария), *A. m. cecropia* (Греция) и *A. m. cyprica* (Кипр). Последовательности *tRNA_{Leu}-COII* *A. m. anatoliaca* и *A. m. macedonica*, доступные в Генбанке, также относятся к гаплотипам ветви С. Например, последовательности *A. m. anatoliaca* ON933877.1, MN701760.1–MN701763.1 относятся к гаплотипу С2, а FJ357798.1 – к С1. Гаплотипы *A. m. macedonica* отличаются на одну замену от гаплотипа С2. Для *A. m. remipes*, *A. m. cecropia* и *A. m. cyprica*, мы не обнаружили последовательностей *tRNA_{Leu}-COII*.

Митохондриальный локус *tRNA_{Leu}-COII* – информативный и простой в использовании генетический маркер [7]. С его помощью было

Таблица 1. Гаплотипы *tRNA_{Leu}-COII* в исследуемых выборках *A. m. caucasica*, *A. m. carnica* и *A. m. mellifera*

Выборка	Место сбора	<i>N</i>	Гаплотипы (число особей)
<i>A. m. caucasica</i>	Краснодарский край	20	C2j (16), C2jd (1), C2jf (1), C2c (1), C2l (1)
	Республика Адыгея	6	C2c (3), C2j (1), C2 (1), C1 (1)
<i>A. m. carnica</i>	Оренбургская область	5	C2c (4), C2j (1)
	Узбекистан	5	C2c (4), C2 (1)
	Казахстан	4	C2c (3), C3 (1)
<i>A. m. mellifera</i>	Республика Башкортостан	8	M17j (8)
	Пермский край	12	M17j (4), M17k (6), M17q (2)

проанализировано большое число популяций медоносных пчел во всем мире [10, 20–24]. Однако из-за отсутствия правил классификации гаплотипов *tRNA^{Leu}-COII* накопилось большое число неверно обозначенных гаплотипов. Лишь в 2017 г. появилась работа [25], в которой описываются правила номенклатуры гаплотипов и выполнена ревизия гаплотипов из ранее вышедших работ. В нашем исследовании мы использовали эти правила номенклатуры для классификации гаплотипов *tRNA^{Leu}-COII*.

Анализ генетической структуры представителей трех подвидов медоносной пчелы, широко распространенных на территории России, показал значимый уровень их дифференциации даже при использовании небольшого набора микросателлитных локусов. Оценка распространенности гаплотипов *tRNA^{Leu}-COII* в трех исследуемых выборках показала, что для *A. m. caucasica* преобладающим гаплотипом является С2j. Генетические исследования популяций медоносной пчелы имеют не только фундаментальное значение для сохранения уникальных генофондов, но и применяются племенными хозяйствами, специализирующимися на разведении определенных подвидов медоносной пчелы.

Дифференциация подвидов с помощью генетических и морфометрических маркеров осложняется тем, что популяции медоносных пчел почти не сохранились в границах своего естественного распространения из-за экспорта пчел. Данные по популяционным исследованиям медоносной пчелы разных подвидов очень разрозненные. Для решения этой проблемы, в первую очередь, необходимо найти аборигенные, или локальные, популяции пчел в границах их естественного распространения, а затем провести полногеномные исследования этих популяций, выполнить морфометрический анализ и анализ межгенного локуса *tRNA^{Leu}-COII*.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00004, <https://rscf.ru/project/22-74-00004/> на оборудовании ЦКП УФИЦ РАН.

Исследование одобрено Этическим комитетом ФБУН Ин-том биохимии и генетики – обособленным структурным подразделением Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, дата 30.01.2024, протокол № 2.

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. Горбачев К.А. Кавказская серая горная пчела (*Apis mellifera* var. *caucasica*) и место ее среди других пчел. Тифлис: тип. Труд, 1916. 39 с.
2. Анатов В.В. Породы медоносной пчелы. Москва: Изд-во моск. об-ва испытателей природы, 1948. 183 с.
3. Ruttner F. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Berlin: Springer, 1988. 291 p.
4. Любимов Е.М., Сокольский С.С., Савушкина Л.Н., Бородачев А.В. Селекция пчел серой горной кавказской породы и производство продукции в пчелоразведенческом хозяйстве. Рязань: Изд-во Ряз. обл. тип., 2013. 192 с.
5. Cridland J.M., Tsutsui N.D., Ramirez S.R. The complex demographic history and evolutionary origin of the western honey bee *Apis mellifera* // Genome Biol. Evol. 2017. V. 9. P. 457–472. <https://doi.org/10.1093%2Fgbe%2Fevx009>
6. Momeni J., Parejo M., Nielsen R.O., Langa J., et al. Authoritative subspecies diagnosis tool for European honey bees based on ancestry informative SNPs // BMC Genomics. 2021. V. 22. № 101. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07379-7>
7. Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.-M. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. // Experientia. 1993. V. 49. P. 1016–1021. <https://doi.org/10.1007/BF02125651>
8. Cornuet J.M., Garnery L. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications // Apidologie. 1991. V. 22. P. 627–642.
9. Susnik S., Kozmus P., Poklukar J., Meglic V. Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia // Apidologie. 2004. V. 35. P. 623–636. <https://doi.org/10.1051/apido:2004061>
10. Alburaki M., Madella S., Lopez J., et al. Honey bee populations of the USA display restrictions in their mtDNA haplotype diversity // Frontiers in Genetics. 2023. V. 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1092121>
11. Earl D.A., vonHoldt B.M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation Genetics Resources. 2012. V. 4(2). P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
12. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study // Mol. Ecol. 2005. V. 14(8). P. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
13. Nei M. Molecular evolutionary genetics // DNA Polymorphism Within and Between Populations. N. Y.: Columbia Univ. Press, 1987. P. 254–285.

14. *Nikolova S.R., Bienkowska M., Gerula D., Ivanova E.N.* Microsatellite DNA polymorphism in selectively controlled *Apis mellifera carnica* and *Apis mellifera caucasica* populations from Poland // Arch. Biol. Sci. 2015. V. 67(3). P. 889–894. <https://doi.org/10.2298/ABS141102048N>
15. *Tozkar C.O.* Genetic structure of honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus, 1758) subspecies based on *tRNA^{Leu}-COX2* and *ND5* regions of mtDNA // Applied Ecol. and Environ. Res. 2020. V. 18(2). https://doi.org/10.15666/aeer/1802_22692284
16. *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. P. 907–921. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00945.x>
17. *Carpenter M.H., Harpur B.A.* Genetic past, present, and future of the honey bee (*Apis mellifera*) in the United States of America // Apidologie. 2021. V. 52. P. 63–79. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00836-4>
18. *Kaskinova M.D., Gaifullina L.R., Saltykova E.S.* Haplotypes of the *tRNA^{Leu}-COII* mtDNA region in Russian *Apis mellifera* populations // Animals. 2023. V. 13. <https://doi.org/10.3390/ani13142394>
19. *Marcelino J., Braese C., Christmon K. et al.* The movement of western honey bees (*Apis mellifera* L.) among U.S. States and territories: History, benefits, risks, and mitigation strategies // Front. Ecol. Evol. 2022. V. 10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.850600>
20. *Collet T., Ferreira K., Arias M. et al.* Genetic structure of Africanized honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA *COI–COII* patterns // Heredity. 2006. V. 97. P. 329–335. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800875>
21. *Oleksa A., Kusza S., Tofilski A.* Mitochondrial DNA suggests the introduction of honeybees of african ancestry to East-Central Europe // Insects. 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3390/insects12050410>
22. *Chavez-Galarza J., Lopez-Montanez R., Jimenez A. et al.* Mitochondrial DNA variation in Peruvian honey bee (*Apis mellifera* L.) populations using the *tRNA^{Leu}-cox2* intergenic region // Insects. 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3390/insects12070641>
23. *Tanasković M., Erić P., Patenković A. et al.* MtDNA analysis indicates human-induced temporal changes of Serbian honey bees diversity // Insects. 2021. V. 12. <https://doi.org/10.3390/insects12090767>
24. *Salehi S., Nazemi-Rafie J.* Discrimination of Iranian honeybee populations (*Apis mellifera meda*) from commercial subspecies of *Apis mellifera* L. using morphometric and genetic methods // J. of Asia-Pacific Entomology. 2020. № 23. P. 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.04.009>
25. *Chavez-Galarza J., Garnery L., Henriques D. et al.* Mitochondrial DNA variation of *Apis mellifera iberiensis*: Further insights from a large scale study using sequence data of the *tRNA^{Leu}-cox2* intergenic region // Apidologie. 2017. V. 48. P. 533–544.

Genetic Characteristics of the Gray Mountain Caucasian Bee *Apis mellifera caucasica*

M. D. Kaskinova^{1, *}, L. R. Gaifullina¹, E. S. Saltykova¹

¹*Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

**e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru*

In this study we present the results of a comparative genetic analysis of bees of the *Apis mellifera caucasica* subspecies with the subspecies *A. m. carnica* and *A. m. mellifera*. We performed polymorphism analysis of nine microsatellite loci (*Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28*, and *A43*) and determined the haplotypes of the *tRNA^{Leu}-COII* locus. Analysis of the genetic structure of representatives of three subspecies of honey bees, widespread in Russia, showed a significant level of their differentiation even when using a small set of microsatellite loci. An assessment of the prevalence of *tRNA^{Leu}-COII* haplotypes in the three studied samples showed that for *A. m. caucasica* the predominant haplotype was C2j.

Keywords: *tRNA^{Leu}-COII*, microsatellites, *Apis mellifera caucasica*, subspecies differentiation.