

Министерство науки и высшего образования Российской  
Федерации Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение  
Уфимский федеральный исследовательский центр  
Российской академии наук (УФИЦ РАН)  
Институт биохимии и генетики – обособленное структурное  
подразделение Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения Уфимского федерального  
исследовательского центра Российской академии наук (ИБГ  
УФИЦ РАН)

На правах рукописи

**КИНЗИКЕЕВ АРТУР КАМИЛЕВИЧ**

**ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОВ И ТАКСОНОМИЧЕСКИЕ  
ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ (ПОДВИДОВ)  
ПЧЕЛ *APIS CERANA* РОССИИ, КОРЕИ, ВЬЕТНАМА**

06.06.01 Биологические науки

03.02.07 Генетика

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**

Уфа – 2025

**Работа выполнена в Институте биохимии и<sup>2</sup> генетики – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук**

**Научный  
руководитель:**

**Салтыкова Елена Станиславовна** — доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии адаптивности насекомых Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (УФИЦ РАН).

**Рецензенты:**

**Джаубермезов Мурат Алиевич** — кандидат биологических наук, доцент кафедры генетики и фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Уфимский университет науки и технологий» (ФГБОУ ВО «УУНиТ»)

**Акимова Екатерина Сергеевна** — кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук (УФИЦ РАН).

**Актуальность темы исследования.**

В настоящее время в мире известно девять видов медоносных пчел рода *Apis*, восемь из которых произрастают в Азии. *A. mellifera* — единственный вид медоносных пчел рода *Apis*, обитающий за пределами Азии. Среди азиатских видов медоносных пчел *A. cerana* — пчела среднего размера, меньше гигантских азиатских медоносных пчел (*A. dorsata* и *A. laboriosa*), но крупнее карликовых азиатских медоносных пчел (*A. florea* и *A. andreniformes*). *A. cerana* — самая маленькая из четырех видов азиатских медоносных пчел, гнездящихся в дуплах (включая *A. koschevnikovi*, *A. nuluensis*, *A. nigrocincta* и *A. cerana*).

Восточная медоносная пчела *Apis cerana* встречается в Азии от России до Индонезии и от Японии до Афганистана. Подобно западной медоносной пчеле, *A. cerana* в ходе эволюции разделилась на многочисленные подвиды и экотипы, которые адаптировались к широкому диапазону климатических условий от холодных континентальных до жарких тропических (Ruttner, 1988).

Почти все подвиды *A. cerana* используются для производства меда и опыления сельскохозяйственных культур. Обобщение всех имеющихся литературных данных на основе морфологических и молекулярных методов позволяет описать современную таксономию восточной медоносной пчелы *A. cerana*, как состоящую из двадцати одного подвида, большая часть которых распространена в Китае (12 подвидов, 5 географических рас и 7 биотипов). Все подвиды *A. cerana* можно разделить на три группы: (1) северо-восточную (4 подвида), (2) средне-восточную (12 подвидов) и (3) юго-восточную (6 подвидов) (Radloff et al., 2010). Структура популяций *A. cerana* еще недостаточно изучена, ее определение является важной задачей науки и пчеловодства Азии (Engel.,

Цель работы — это изучение эволюция генов и таксономические взаимоотношения популяций (или подвидов) *Apis cerana* стран Северо-Восточной (Дальний Восток России, Корея) и Юго-Восточной Азии (Вьетнам), на основе полиморфных вариантов генов иммунитета и других генов. Сравнение изолированных полуостровных популяций и материковых популяций.

Эволюция *Apis cerana* (азиатской медоносной пчелы) тесно связана с историей рода *Apis* и формированием его видового разнообразия. Наибольшее разнообразие современных видов *Apis* сосредоточено в Азии. Вполне логично, что большинство гипотез о происхождении, диверсификации и расселении медоносных пчёл исходят из предположения, что *Apis* возникли в современном центре их разнообразия, Юго-Восточной Азии, а предки современной *A. mellifera* – в Азии или на Ближнем Востоке (Ruttner F., 1988). Считалось, что медоносные пчелы не встречались в Америке до тех пор, пока их не завезли европейские колонисты в XVII веке.

Эволюция медоносной пчелы началась в Юго–Восточной Азии, где зародились основные виды пчел рода *Apis*. Экспансия пчел на запад в Европу и Ближний Восток запустила процесс интенсивной микроэволюции с формированием множества подвидов, адаптированных к различным условиям среды. Процесс микроэволюции пчел сопровождался постоянным чередованием миграций с освоением новой климатической зоны и продолжительных изоляций на обитаемой территории (Ильясов, Поскряков, 2006)

Виды пчел *A. cerana* и *A. mellifera* были географически изолированы во время плейстоценового ледникового периода от 500 тыс. до 1,3 млн. лет назад лет назад, и до вмешательства человека они не контактировали. Ареалы *A. cerana* и *A. mellifera* сближены в единственном

**Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:**

Статья “Филогенетические отношения подвидов китайской восковой пчелы *Apis cerana* из Южной Кореи, Вьетнама и России на основе данных нуклеотидной последовательности генов *Defensin 1* и *Defensin 2*” ИЗВЕСТИЯ УФИМСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РАН. 2023. № 2. С. 72–78

Статья “Полиморфизм пяти экзонов гена *vig Apis cerana* в популяциях России, Южной Кореи и Вьетнама” ГЕНЕТИКА. 2025. № 6. С. 47-58

Публикация тезисов «Понт Эвксинский – 2023»

Публикация тезисов XVI съезд Русского энтомологического общества; Москва, 2022 г

Публикация тезисов «80 лет экологической науке на Урале»

uniqueness of honeybee *Apis cerana* from the Korean peninsula inferred from the mitochondrial, nuclear, and morphological data. // JOURNAL OF APICULTURAL SCIENCE. 2018. V. 62. P. 189-214. doi 2478/jas-2018-0018.17. Ilyasov R.A., Rašić S., Takahashi J. et al. Genetic Relationships and Signatures of Adaptation to the Climatic Conditions in Populations of *Apis cerana* Based on the Polymorphism of the Gene Vitellogenin. // INSECTS. 2022. V. 13. № 11, P. 1053. doi 10.3390/insects13111053. 18. Kaskinova M.D, Gaifullina L.R., Ilyasov R.A., et al. Genetic Structure of *Apis cerana* Populations from South Korea, Vietnam and the Russian Far East Based on Microsatellite and Mitochondrial DNA Polymorphism //INSECTS. 2022. V. 13. № 12, P. 1174.]

Сохранение генетического разнообразия *Apis cerana* особенно актуально в условиях глобальных изменений климата и давления сельского хозяйства на экосистемы. Понимание генетической структуры популяций помогает выявить наиболее уязвимые группы пчел и разработать эффективные меры по их охране.

месте — на территории Афганистана, где их разделяет друг от друга 600 км (Radloff et al., 2010).

Виды пчел *A. cerana* и *A. mellifera* имели сходную эволюцию и дивергировали на несколько десятков подвидов, приспособленных к жизни в разных климатических условиях: от жарких тропических до холодных континентальных 47° с. ш. Это стало возможным благодаря обретению гнезд в полостях, где создавалась постоянная температура путем образования клубов пчел в холодные и испарения воды в жаркие времена года. Другое преимущество им дала способность к коммуникации особей друг с другом, благодаря чему более эффективно стали использоваться пищевые ресурсы (Seeley, 2009).

Были обнаружены различия между японскими и континентальными популяциями *Apis cerana* (Wakamiya T. et al., 2023). Корейский полуостров является зоной гибридизации между китайскими и японскими образцами. (Wakamiya T. et al., 2023). *A. c. ussuriensis* относится к континентальной азиатской группе *A. cerana* и отличается от популяций *A. c. cerana*, *A. c. koreana* и *A. c. japonica*. Генетические различия *A. c. ussuriensis* являются результатом естественного отбора и адаптивной эволюции *A. cerana* в условиях резко континентального климата Приморского края

Биологические особенности *Apis cerana* представляют значительный интерес для исследователей в контексте изучения механизмов адаптации и эволюции общественных насекомых. Этот вид медоносных пчел, встречающийся в России исключительно в Приморском и Хабаровском краях, характеризуется обширным ареалом, охватывающим разнообразные климатические зоны от умеренных муссонных регионов до жарких и сухих территорий в странах Юго-Восточной Азии [1]. Подобно европейской медоносной пчеле (*Apis mellifera*), *A. cerana* образует множество подвидов и экотипов,

адаптированных к различным условиям среды, что делает этот вид важным объектом для изучения процессов микроэволюции и дивергенции.

В последнее время наблюдается резкое сокращение ареала и снижение численности *Apis cerana* во всех странах вызванные рядом причин. Активная хозяйственная деятельность человека, загрязнение окружающей среды и другие факторы разрушают биоразнообразие, что негативно сказывается на численности *Apis cerana*.

#### **Степень разработанности темы исследования.**

*A. cerana*. демонстрирует способность к быстрому расселению [Gloag R], поэтому точное количество подвидов *A. cerana* в настоящее время неясно. [Tanaka H. et al.]. Она достаточно изучена в ареале ее умеренного и тропического распространения в Азии (Тайланд, Китай, Япония, Индия) [Smith D. R, Tan K], но популяции из Дальнего Востока, Кореи, Вьетнама и Индонезии остаются недостаточно изученными [Smith & Hagen, 1996, Smith et al., 2000; Takahashi J, Lee et al., 2016]. Tanaka (Tanaka H. et al; 2001) в своей работе пишет, что было бы особенно интересно исследовать популяции *A. cerana* островов и полуостровов. Поэтому нами были выбраны образцы *A. cerana* с Корейского полуострова, Вьетнама, находящегося на полуострове Индокитай и Дальнего Востока России, так как популяции из этих стран пока не имеют точного таксономического статуса. Предполагается, что эти популяции относятся к отдельным подвидам *A. cerana* и имеют генетические отличия от материковой популяции *A. c. cerana*. Одним из важных вопросов, связанных с *A. cerana*, является установление количества подвидов (Tanaka et al., 2001). Предыдущие исследования, основанные на полиморфизме отдельных локусов мтДНК, не выявили филогенетической дифференциации азиатских популяций *A. cerana* (Tanaka H. et al; 2001). Также для оценки генетического разнообразия *A. cerana* во многих исследованиях использовался внутренний некодирующий спейсер *NC2*

Непала и Китая. Образцы *A. mellifera* из Индии и Польши использовались в качестве аутгруппы. На основе анализа последовательностей гена *Vg* подвиды *Apis cerana koreana* на Корейском полуострове были разделены на три группы в соответствии с их географической локализацией и адаптацией к климату с севера на юг (Ilyasov et al., 2022).

Исследование генетической изменчивости восковой пчелы *A. cerana*, проведенное на основе анализа нескольких генетических локусов, представляет значительный интерес для понимания эволюционных процессов и механизмов дифференциации популяций этого важного видового комплекса. В ходе работы были проанализированы образцы из трёх различных географических регионов: Южной Кореи (14 образцов), Дальнего Востока России (16 образцов) и Вьетнама (14 образцов), что позволило получить репрезентативную выборку для сравнительного анализа.

Исследование генетической изменчивости *Apis cerana* на основе анализа ядерных генов *EF-1a*, *OK-A* и *GRI10* позволило выявить дифференциацию между популяциями, обитающими в различных географических регионах. Результаты исследования показали, что ген *EF-1a* является высококонсервативным, что подчёркивает его важную роль в поддержании жизненно важных функций организма пчел. Отсутствие полиморфных вариантов в этом гене среди географически удалённых популяций указывает на сильный очищающий отбор, препятствующий накоплению мутаций и генетического груза. Отсутствие варибельности на протяжённом участке гена среди географически удалённых популяций указывает на его существенную роль в поддержании жизненно важных функций организма.

Это согласуется с данными предыдущих исследований, которые также отмечали высокую степень консервативности этого гена у других видов насекомых [16. Ilyasov R.A., Park J., Takahashi J. et al. Phylogenetic

Ранее нами были секвенированы и аннотированы полные последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК) пчел подвида *Apis cerana ussuriensis* (Ильясов и др., 2019) (регистрационный номер GenBank AP018450) из Приморского края и *Apis cerana koreana* (Ильясов и др., 2019) (AP018431) из Южной Кореи, а также шесть экзонов ядерной ДНК вителлогенина VG Ген E2–E7 подвидов пчел *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana* и *A. c. indica*. Кластерный анализ последовательностей генов мтДНК и VG показал разделение пчел на две группы: южная *A. c. indica* и северная *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica* и *A. c. cerana*. На основе генетической дивергенции мы показали, 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 генетического расстояния Джукса–Кантора (0,005–0,100) для мтДНК и гена VG нДНК между подвидами *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana* и *A. c. indica* находятся в пределах внутривидовых различий. Генетические расстояния Джакса–Кантора, основанные на последовательностях генов VG, показали, что популяции *A. cerana* из северных стран, таких как Корея, Россия и Япония, более тесно связаны друг с другом, чем южные популяции *A. cerana*. Во всех популяциях *A. cerana* наблюдались признаки увеличения численности популяции после недавнего сокращения из-за вируса мешотчатого расплода. Последовательности гена VG могут быть использованы в качестве информативных маркеров для мониторинга генетической структуры и процессов адаптации в популяциях *A. cerana* (Plyasov et al., 2022).

Нуклеотидные последовательности гена вителлогенина *Vg*, участвующего в развитии, разделении труда и кастовой дифференциации, использовались для оценки генетической структуры и признаков адаптации местных популяций *A. cerana* из Кореи, России, Японии,

между генами тРНК-Leu и *COX2* митохондриальной ДНК (мтДНК) [Crozier R., Cornuet J. M]. Хотя эти маркеры обладают соответствующими достоинствами их было недостаточно, чтобы раскрыть генетическое разнообразие, изменчивость и биогеографическую историю *A. cerana* [Tanaka H. et].

#### **Цель исследования:**

Цель работы - это изучение эволюции генов и таксономические взаимоотношения популяций (или подвидов) *Apis cerana* стран Северо-Восточной (Дальний Восток России, Корея) и Юго-Восточной Азии (Вьетнам), на основе полиморфных вариантов генов иммунитета и других генов. Сравнение изолированных полуостровных популяций и материковых популяций. Выявление генетических признаков, позволяющих выделить популяции, обитающие на определённой территории в отдельный подвид.

#### **Задачи исследования:**

- 1) Провести анализ генетической структуры *Apis cerana* Дальнего Востока России, Кореи и Вьетнама.
- 2) Провести анализ полиморфизма и эволюцию генов *VG*, *OK-A*, *GR10*, *Def1* и *Def2*, *EF1-a* в разных точках.
- 3) Выявление полиморфных вариантов аминокислот в зависимости от места обитания популяции.
- 4) Построить филогенетические древа, используя различные алгоритмы для выявления зависимости распространения популяций от нуклеотидных и аминокислотных полиморфных вариантов исследуемых генов.
- 5) Построение моделей белков с различными полиморфными вариантами аминокислот в зависимости от места обитания популяции с целью поиска различий в их структурах.

*A. cerana*. демонстрирует способность к быстрому расселению (Gloag R., 2016), поэтому точное количество подвидов *A. cerana* в настоящее время неясно. (Tanaka H. et al., 2001). Она достаточно изучена в ареале ее умеренного и тропического распространения в Азии (Тайланд, Китай, Япония, Индия) (Smith D. R. et al., 2000), но популяции из Дальнего Востока, Кореи, Вьетнама и Индонезии остаются недостаточно изученными (Smith & Hagen, 1996, Smith et al., 2000; Takahashi J.). Tanaka (Tanaka H. et al; 2001) в своей работе пишет, что было бы особенно интересно исследовать популяции *A. cerana* островов и полуостровов. Поэтому нами были выбраны образцы *A. cerana* с Корейского полуострова, Вьетнама, находящегося на полуострове Индокитай и Дальнего Востока России, так как популяции из этих стран пока не имеют точного таксономического статуса. Предполагается, что эти популяции относятся к отдельным подвидам *A. cerana* и имеют генетические отличия от материковой популяции *A. c. cerana*. Одним из важных вопросов, связанных с *A. cerana*, является установление количества подвидов (Tanaka et al., 2001). Предыдущие исследования, основанные на полиморфизме отдельных локусов мтДНК, не выявили филогенетической дифференциации азиатских популяций *A. cerana* (Tanaka H. et al; 2001). Также для оценки генетического разнообразия *A. cerana* во многих исследованиях использовался внутренний некодирующий спейсер *NC2* между генами тРНК-Leu и *COX2* митохондриальной ДНК (мтДНК) (Crozier R., Cornuet J. M., 1993). Хотя эти маркеры обладают соответствующими достоинствами их было недостаточно, чтобы раскрыть генетическое разнообразие, изменчивость и биогеографическую историю *A. cerana* (Tanaka et al., 2001).

Биологические особенности *Apis cerana* представляют значительный интерес для исследователей в контексте изучения

Полученные данные имеют важное значение для понимания эволюционной истории *Apis cerana* и могут быть использованы в дальнейших таксономических исследованиях. Выявление специфических генетических маркеров позволяет более точно определять происхождение исследуемых образцов и отслеживать миграционные процессы. Кроме того, информация о генетическом разнообразии различных популяций необходима для разработки стратегий сохранения этого важного вида и использования его генетических ресурсов в селекционной работе.

Цель работы заключалась в выявлении генетической изменчивости и таксономических различий между популяциями, обитающими в различных географических регионах. Были проанализированы образцы из Южной Кореи, Дальнего Востока России и Вьетнама, что позволило выявить уникальные генетические маркеры для каждой популяции. Ген *EF-1a* показал высокую степень консервативности, что свидетельствует о его важной роли в жизнедеятельности пчел. В гене *GRI10* были обнаружены полиморфные варианты, характерные исключительно для популяции Южной Кореи, что указывает на возможное недавнее возникновение этой мутации. Наибольший интерес представил анализ гена *OK-A*, где были выявлены семь сайтов нуклеотидных полиморфных вариантов, включая замену, приводящую к изменению аминокислотной последовательности. Филогенетический анализ подтвердил значительную генетическую дифференциацию вьетнамской популяции, что может свидетельствовать о её длительной изоляции и накоплении уникальных мутаций. Полученные данные имеют важное значение для понимания эволюционных процессов и механизмов адаптации *Apis cerana* к различным экологическим условиям, а также для разработки стратегий сохранения биоразнообразия этого вида.

полиморфный вариант ещё не успел широко распространиться в популяции пчел Южной Кореи.

Уникальные полиморфные варианты гена *GR10* в популяции Южной Кореи может свидетельствовать о вероятности возникновения этой мутации в результате адаптации к недавним климатическим изменениям. Локализация полиморфного сайта в интронной области гена *GR10* предполагает его возможную роль в регуляции экспрессии гена или процессинге пре-мРНК. Это открытие подчёркивает важность дальнейших исследований для понимания функционального значения данных полиморфных вариантов. Возможно, что данный полиморфизм может характеризовать адаптацию пчел к специфическим условиям среды, характерным для Южной Кореи.

Исследование генетической изменчивости подвидов *Apis cerana* из России, Южной Кореи и Вьетнама на основе анализа нуклеотидных последовательностей генов *EF-1a*, *OK-A* и *GR10* позволило выявить значительные различия в генетической структуре популяций, обитающих в различных географических регионах. Результаты исследования подтвердили, что ген *EF-1a* является высококонсервативным, что подчёркивает его важную роль в поддержании жизненно важных функций организма пчел. Отсутствие полиморфных вариантов в этом гене среди географически удаленных популяций указывает на сильный очищающий отбор, препятствующий накоплению мутаций.

Наибольший интерес представлял анализ гена *OK-A*, где было выявлено семь сайтов нуклеотидных полиморфных вариантов, включая замену, приводящую к изменению аминокислотной последовательности. Филогенетический анализ на основе последовательностей *OK-A* подтвердил значительную генетическую дифференциацию вьетнамской популяции, что может быть связано с её длительной географической

механизмов адаптации и эволюции общественных насекомых. Этот вид медоносных пчел, встречающийся в России исключительно в Приморском и Хабаровском краях, характеризуется обширным ареалом, охватывающим разнообразные климатические зоны от умеренных муссонных регионов до жарких и сухих территорий в странах Юго-Восточной Азии. Подобно европейской медоносной пчеле (*Apis mellifera*), *A. cerana* образует множество подвидов и экотипов, адаптированных к различным условиям среды, что делает этот вид важным объектом для изучения процессов микроэволюции и дивергенции.

В последнее время наблюдается резкое сокращение ареала и снижение численности *Apis cerana* во всех странах вызванные рядом причин. Активная хозяйственная деятельность человека, загрязнение окружающей среды и другие факторы разрушают биоразнообразие, что негативно сказывается на численности *Apis cerana*.

Анализ генетической изменчивости популяций *A. cerana* имеет не только теоретическое значение (например, для понимания адаптации пчелиных сообществ к экологическим условиям и формирования их генетической структуры), но и практическое. Полученные данные могут быть использованы для разработки стратегий сохранения биоразнообразия медоносных пчел, создания программ по защите редких и эндемичных популяций, а также для оптимизации пчеловодческой деятельности в различных регионах. Понимание генетической структуры популяций необходимо для принятия обоснованных решений в области охраны природы и управления популяцией пчел.

Особый интерес представляют возможные различия в генетической структуре популяций, обитающих в континентальных и полуостровных и островных регионах. Эти различия могут быть связаны с различными факторами, включая степень географической изоляции, историю формирования популяций, влияние антропогенных факторов и

естественный отбор. Исследование этих аспектов может раскрыть механизмы формирования генетического разнообразия и адаптации популяции пчел к различным экологическим условиям.

Было бы особенно интересно исследовать популяции *A. cerana* островов и полуостровов, ввиду их географической изоляции (Tanaka et al.; 2001). Поэтому нами были выбраны образцы *A. cerana* с Корейского полуострова, Вьетнама (полуостров Индокитай) и Дальнего Востока России. Для этого нами были отобраны пробы *Apis cerana* 46 семей из трех стран: России (n=16), Южной Кореи (n=16) и Вьетнама (n=14).

Мы провели начальный молекулярно-генетический анализ гена VG у подвидов *Apis cerana*, обитающих на полуостровах и материке для большего понимания механизмов адаптации у популяций ареалы обитания которых находятся в различных климатических условиях. Определение филогенетических взаимоотношений этих популяций может помочь понять механизмы адаптаций для различных условий обитания и территориальные перемещения подвидов.

Исследование молекулярных механизмов жизнедеятельности *A. cerana* позволяет глубже понять фундаментальные процессы, лежащие в основе физиологии насекомых. Используя микросателлитный анализ митохондриальной и ядерной ДНК, совместно с методами морфометрии в Северо-Восточной Азии были описаны два новых подвида *A. c. koreana* (Pyasov R.A. et al., 2018), обитающий на Корейском полуострове, и *A. c. ussuriensis*, обитающий на Дальнем Востоке России (Ильясов и др., 2019). *Apis cerana ussuriensis* – самый северный подвид восточной медоносной пчелы. Генетические исследования этого подвида представляют большой интерес для науки и пчеловодства, поскольку все его адаптивные признаки сформировались под влиянием природной среды без вмешательства человека.

Почти все подвиды *A. cerana* используются для производства

Другой важный полиморфный сайт в гене *OK-A* находится в положении 297, но, несмотря на наличие нуклеотидной замены А-Г, он не приводит к изменению кодируемой аминокислоты из-за синонимичности кодонов. Такие "молчащие" мутации могут играть важную роль в эволюции генов, влияя на накопление генетического груза, скорость трансляции и точность синтеза белка за счёт различий в доступности тРНК с соответствующими антикодонами.

Анализ распределения полиморфных вариантов в разных популяциях выявил связь между генетическим полиморфизмом и географическим распределением образцов. Особенно показательным является случай с вьетнамской популяцией, которая демонстрирует уникальный набор полиморфных сайтов. В четырёх из семи полиморфных сайтов у пчёл из Вьетнама отсутствуют варианты, характерные для российских и корейских популяций. Кроме того, замена Т-Г в положении 361 является уникальной для вьетнамской популяции и не наблюдается в других исследуемых группах.

Филогенетический анализ, проведённый на основе полученных последовательностей *OK-A*, подтвердил предположение о существенной генетической дифференциации вьетнамской популяции. Формирование отдельной ветви на филогенетическом древе свидетельствует о длительной географической изоляции этой группы и накоплении специфических мутаций.

Информативной оказалась последовательность гена *GRI10*, где в исследуемом участке длиной 282 пары нуклеотидов был обнаружен один сайт нуклеотидного полиморфного варианта в положении 253 (NCBI Reference Sequence: NC\_083855).

Замена А-Г была представлена у представителей популяции пчел Южной Кореи и отмечалась в 3 из 15 исследуемых образцов, что составляет 20% частоты встречаемости. Это говорит о том, что данный

et al., 2022). Иммуитет пчёл в разных регионах может распознавать разные патогены за счёт различных полиморфных аминокислот гена *VG*.

Ген *eEF1A* показал высокую консервативность и отсутствие полиморфных вариантов во всех исследуемых образцах, что подчёркивает его важную роль в поддержании жизненно важных функций организма пчел. Отсутствие полиморфных вариантов в этом гене среди географически удалённых популяций указывает на сильный очищающий отбор, препятствующий накоплению мутаций и генетического груза. Отсутствие варибельности на протяжённом участке гена среди географически удалённых популяций указывает на его существенную роль в поддержании жизненно важных функций организма.

Был произведен анализ участка гена *OK-A Apis cerana* длиной 662 пары нуклеотидов, где было выявлено семь сайтов нуклеотидных полиморфных вариантов. Особое значение имеет сайт в положении 2, где замена А-С приводит к изменению кодируемой аминокислоты: треонин (полярная, нейтральная аминокислота) заменяется на пролин (неполярная, нейтральная аминокислота). Несмотря на то, что обе аминокислоты являются нейтральными, различия в их полярности могут потенциально влиять на вторичную структуру белка *OK-A* и его функциональные свойства. Однако моделирование трёхмерной структуры белка с использованием программы Swiss-model не выявило значительных изменений в пространственной организации молекулы при данной замене. Хотя моделирование трёхмерной структуры белка не выявило существенных изменений в пространственной организации молекулы, различия в полярности аминокислот могут влиять на функциональные свойства белка. Это может иметь важное значение для понимания механизмов адаптации пчел к изменяющимся экологическим условиям.

меда и опыления дикорастущих эндемичных растений и сельскохозяйственных культур. Обобщение всех имеющихся данных на основании морфологических и молекулярных методов исследований позволяет описать современную таксономию восточной пчелы *A. cerana*, как состоящую из двадцати одного подвида, большая часть которых распространена в Китае.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Сохранение генофонда локальных подвидов восковой пчелы возможно при идентификации и селекции. Генетические исследования позволяют разрабатывать основные стратегии сохранения генетического разнообразия подвидов *A. cerana*. Оценка генетического разнообразия естественных популяций пчел является первым шагом к генетическому улучшению видов пчел. Экологические и биологические различия между экотипами и подвидами пчел предоставляют отличную возможность для их генетического улучшения путем селекции и дальнейшего отбора (Ильясов Р.А. и др., 2019).

### **Методология и методы исследования.**

В работе использовались стандартные молекулярно-генетические методы (Глава 2). Проведен анализ полиморфных вариантов генов *VG*, *OK-A*, *GR10*, *Def1* и *Def2*, *EF1-a*. Выравнивание последовательностей ДНК выполнили при помощи ClustalW в ПО MEGA v6.0. Экзоны определили при помощи BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей построили в ПО MEGA v6.0. Анализ белковых структур производился с помощью Swiss-model.

### Степень достоверности и апробация работы.

Уфимский университет науки и технологий БИОЛОГИЯ БУДУЩЕГО  
Материалы XIII научной конференции молодых ученых.

XVI съезд Русского энтомологического общества.

Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, г. Москва Научная конференция академика Юрия Петровича Алтухова с международным участием, «Генетические процессы в популяциях».

ФГБНУ «ФНЦ пчеловодства». Международная научно-практическая конференция «Актуальные тенденции в пчеловодстве и апитерапии XXI века».

УФИЦ РАН. Всероссийская научная конференция с международным участием «Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства»

XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием для молодых учёных по проблемам водных и наземных экосистем «Понт Эвксинский – 2023».

77-я Всероссийская студенческая научно-практическая конференция, посвященная 150-летию со дня рождения А.Г.Дояренко.

ФГБОУ ВО МСХ РФ «Российский государственный университет народного хозяйства имени В.И. Вернадского» VIII ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «Пчеловодство холодного и умеренного климата»

VI Международной научно-практической конференции «ПЧЕЛОВОДСТВО ХОЛОДНОГО И УМЕРЕННОГО КЛИМАТА», «BEEKEEPING IN COLD AND TEMPERATE CLIMATES. 17-18 октября 2024 г., г. ПСКОВ

Всероссийская научная конференция «80 лет экологической науке на Урале», посвященная 80-летию ИЭРиЖ УрО РАН., Россия, Екатеринбург,

географической изоляции популяций Вьетнама. Для популяций Кореи, напротив, в гене *Def2* появляется замена в точках 26, 653, и 628 которые отсутствуют у популяций России и Вьетнама, что также может говорить об обособленности этих популяций. Для подтверждения или опровержения этих предположений требуются дальнейшие исследования с использованием большей выборкой.

При исследовании гена вителлогенина, стало заметно что в популяциях разных стран имеются различия в частоте встречаемости полиморфизмов в исследуемых экзонах гена *Vg*, что может говорить о генетической вариабельности между этими популяциями. Также в популяциях Вьетнама наблюдается консервативность нуклеотидных последовательностей и отсутствие замен. Возможно, существует зависимость между географическим расселением популяций и полиморфизмом в этих точках. Также были выделены замены G-A на коротком участке гена у пчел из Вьетнама, что может говорить о мутации на этом участке гена у вьетнамских популяций пчёл.

Было предположено, что изменение заряда аминокислот может вызвать изменения в структуре белка. В программу Swiss-model были загружены стандартные последовательности аминокислот и последовательности с аминокислотными заменами. Видимых изменений в структуре белка не наблюдалось.

Были сопоставлены аминокислотные составы белка VG *A. melifera* и *A. cerana*. Так как отличия незначительны, то можно предположить, что и их домены выполняют одни и те же функции, которые были описаны Leipart у *A. melifera*. Были сопоставлены аминокислотные замены в этих доменах, которые возможно влияют на их функции. Особенно в домене  $\alpha$ -helical, так как он распознает патогены за счёт своего сильно положительного заряда и изменение в его заряде в результате замены аминокислот может влиять на иммунитет пчёл. (Leipart

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности генов в ПО MEGA и Unipro UGENE показал наличие однонуклеотидного полиморфизма в исследуемых генах. Большая часть нуклеотидных замен располагается в интронах или же синонимичны, что не приводит к замене кодируемой аминокислоты. Анализ гомологов последовательностей гена *Def1* с помощью BLAST-N показал, что *Def1* образцов *A. cerana* из Вьетнама, Южной Кореи и Дальнего Востока гомологичны с идентичностью в 99%. В гене *Def2* одна из однонуклеотидных замен находится внутри экзона (замена тимина на аденин привела к замене валина на аспарагиновую кислоту). Среди 46 аминокислотных последовательностей 2 являются уникальными. Последовательности *Def2* у исследуемых образцов также как *Def1* не кластеризовались в отдельные ветви в зависимости от места сбора пчел. Следовательно, *Def2* тоже не дифференцирует подвиды.

Кластерный филогенетический анализ показал, что исследуемые выборки не формируют отдельных кластеров на основе полиморфизма генов *Def1* и *Def2*. Это свидетельствует о высокой консервативности генов и их важной роли в иммунном ответе пчел рода *Apis*.

Нуклеотидный полиморфизм гена *Def1* в положении 196 и 248 отличается полной заменой А-Т и G-С для популяций Дальнего Востока России от популяций Вьетнама, где наблюдаются противоположенные результаты. Возможно, существует зависимость между географическим расселением популяций и полиморфизмом в этих точках, а на территории Кореи обитает промежуточный вариант этих популяций, более схожий с популяциями России. Также в популяциях Вьетнама наблюдается консерватизм и отсутствие замен в положении 894 гена *Def1* и в положении 100 для гена *Def2*, что может говорить о некоторой

Сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра РАН

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Объект исследования.

Были отобраны пробы *Apis cerana* 46 семей из трех стран: России (n=16), Южной Кореи (n=16) и Вьетнама (n=14). Географические точки отбора проб *Apis cerana*: Южная Корея: Yeoncheon, Gyenggi-do, Yeonchugun Gunnam-myeon, Choong Ju, О. Фрунзе. Приморский край: д. Ромашка, с. Овчинниково, заповедник Кедровая Падь, Владивосток, Академгородок, п. Барабаш. Вьетнам: Dao Duc Long.

### ПЦР-анализ.

ПЦР-анализ проводился в термоциклере BIO-RAD T100 в объеме 15 мкл. Смесь ПЦР на десять образцов (150 мкл) состоит из 120 мкл дистиллированной воды, 15 мкл 10x буфера, dNTP 10 мкм 3 мкл, по 5 мкл F-праймаера 2,2 ОЕ и R-праймаера 2 ОЕ, 2 мкл Taq-полимеразы. Режим ПЦР: 5 минут 94°C, затем 30 циклов с денатурацией 30 секунд при 94°C, отжигом 30 секунд при 54,5°C, элонгацией 60 секунд при 72°C и финальной элонгацией 7 минут при 72°C. Продукты амплификации визуализировали в 8% ПААГ. Для амплификации экзонов гена VG были использованы праймеры, описанные Klaudiny et al., 2005; Arias, Sheppard, 2005; Kent et al., 2005 и Kwon, 2017

### Секвенирование

Секвенирование было выполнено методом Сэнгера в ООО "Синтол" (Москва). F- и R- последовательности фрагментов ДНК были отредактированы в Unipro UGENE и выровнены на референсные

последовательности генов. Последовательности генов были депонированы в GenBank под следующими номерами: ОК157957- ОК157984, ОК625820 - ОК625835.

### **Статистический анализ**

Нуклеотидные последовательности были выровнены программой MEGA X с использованием алгоритма MUSCLE со стандартными параметрами. Выравнивание последовательностей ДНК выполнили при помощи ClustalW в ПО MEGA v6.0. Экзоны определили при помощи BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Филогенетические деревья были построены в программе MEGA X. Для генов было рассчитано количество замен оснований на сайт из усреднения по всем парам последовательностей в каждой группе. Оценки стандартной ошибки были получены с помощью процедуры начальной загрузки (500 повторений). Анализы проводились с использованием двухпараметрической модели Кимуры и модели коррекции Пуассона. Включенные положения кодона были 1st. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). Эволюционная история была выведена с использованием метода Neighbor-Joining. Рядом с ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых ассоциированные таксоны сгруппированы вместе в бутстреп-тесте (500 повторов). Дерево нарисовано в масштабе с длинами ветвей в тех же единицах, что и эволюционные расстояния, используемые для вывода филогенетического дерева. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием двухпараметрического метода Кимуры и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. Включенные положения кодона были 1st. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления).

Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей

построили в ПО MEGA v6.0.

15

Анализ белковых структур производился с помощью Swiss-model.