



АНАЛИЗ ИНФОРМАТИВНОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ГЕНОВ В ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFERA*

*Р.А. Ильясов, А.В. Поскряков, А.Г. Николенко

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук
450054, г. Уфа, Пр. Октября, 71. *E-mail: *apismell@hotmail.com*

АННОТАЦИЯ

Проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности 12 генов митохондриального генома медоносной пчелы, на основании которого удалось выделить 7 информативных генов, позволяющих дифференцировать подвиды пчел эволюционных ветвей А, М, С, О. На примере использования сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена ND2 мтДНК на статистически значимом объеме выборки мы показали высокий уровень дифференцирующей способности этого гена и предположили возможность отдельного использования каждого из 7 генов для дифференциации подвидов 4 эволюционных ветвей.

Ключевые слова: темная лесная пчела, эволюционные ветви, митохондриальный геном, мтДНК, ген ND2, дифференциация подвидов, информативность генов, филогенетический анализ, однонуклеотидные замены.

ВВЕДЕНИЕ

Первоначальная филогенетическая структура медоносной пчелы вида *Apis mellifera* была основана на морфологических исследованиях [Ruttner et al. 1978; Ильясов и др. 2015б]. Медоносная пчела *A. mellifera*, под воздействием разнообразных факторов окружающей среды, подразделилась на 30 подвидов, распространенных по всей территории Старого Света [Ruttner, 1988; Hepburn, Radloff, 1998; Engel, 1999; Sheppard, Meixner, 2003; Meixner et al., 2011; Papachristoforou et al., 2013; Pentek-Zakar et al., 2015]. Наблюдаемый высокий уровень генетического разнообразия медоносной пчелы произошел в результате непрерывного продолжительного естественного отбора в разных климатических и экологических условиях [Kekesoglu et al., 2009; Ильясов и др., 2015в].

Первоначальные исследования подразделяли подвиды пчел на 3 группы: ветвь А, объединяющая подвиды из Африки (*A. m. lamarckii*, *A. m. yemenitica*, *A. m. scutellata*, *A. m. litorea*, *A. m. adansonii*, *A. m. capensis*), ветвь М, объединяющая подвиды Северной Африки и Западной Европы (*A. m. mellifera*, *A. m. iberica*, *A. m. intermissa*) и ветвь С, объединяющая подвиды пчел Восточной Европы, Северного Средиземноморья и Ближнего Востока.

В дальнейшем эта ветвь С была подразделена на две группы: ветвь С, включающая подвиды Восточной Европы и Северного Средиземноморья (*A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. macedonica*, *A. m. cecropia*, *A. m. caucasica*, *A. m. sicula*) и ветвь О, включающая подвиды Ближнего и Среднего Востока (*A. m. armeniaca*, *A. m. meda*, *A. m. anatoliaca*, *A. m. syriaca*, *A. m. cypria*, *A. m. adami*) [Ruttner, 1988; Jensen et al., 2005; Whitfield et al., 2006; Soland-Reckeweg et al., 2009; Oleksa et al., 2011; Pinto et al., 2012; Wallberg et al., 2014]. Дальнейшие молекулярно-генетические исследования [Cornuet, Garnery, 1991; Garnery et al., 1992; Arias, Sheppard, 1996] подтвердили ранее полученные морфометрические данные [Ruttner, 1988]. Только ветвь О не была подтверждена, поскольку была выделена только на основе варибельности микросателлитных локусов и локусов митохондриальной ДНК [Franck et al., 2000; Palmer et al., 2000; Kandemir et al., 2006; Wallberg et al. 2014]. Дальнейшие, более углубленные молекулярно-генетические исследования позволили выделить ветвь Y, включающую подвид *A. m. yemenitica* в Эфиопии [Franck et al. 2001] и ветвь Z, включающую подвид *A. m. syriaca* в Сирии [Alburaki et al., 2013; Meixner et al., 2013].

В геногеографических и филогенетических

исследованиях медоносной пчелы постоянно приходится сталкиваться с информативными и неинформативными генами [Ильясов и др., 2008; Ильясов и др., 2015a]. Целью наших исследований является поиск информативных генов митохондриального генома и оценка возможности отдельного использования каждого из этих маркеров для дифференциации подвидов 4 эволюционных ветвей А, М, С, О.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей 12 генов митохондриальной ДНК (ND2, COII, COI, ATP8, ATP6, COIII, ND3, ND5, ND4, ND4L, ND6, ND1) были использованы последовательности митохондриального генома представителей эволюционных ветвей А, М, С, О (табл. 1).

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности митохондриального генома подвидов медоносной пчелы четырех эволюционных ветвей А, М, С, О

№ в генбанке	Подвид (эвол. ветвь)	Авторы
NC_001566	<i>A. m. ligustica</i> (С)	Crozier, Crozier, 1993
KJ396189	<i>A. m. mellifera</i> (М)	Fuller et al., 2015
KJ396188	<i>A. m. mellifera</i> (М)	Fuller et al., 2015
KP163643	<i>A. m. syriaca</i> (О)	Haddad, 2015
KJ601784	<i>A. m. scutellata</i> (А)	Gibson, Hunt, 2014
KM458618	<i>A. m. intermissa</i> (А)	Hu et al., 2014

(А), (М), (С), (О) – принадлежность пчел к эволюционным ветвям А, М, С и О.

Нами была определена нуклеотидная последовательность гена ND2 мтДНК 39 образцов пчел, из которых 10 образцов *A. m. mellifera* были из Республики Башкортостан, 6 образцов *A. m. mellifera* из Пермского края, 2 образца *A. m. mellifera* из Швейцарии (эволюционная ветвь М), 9 образцов *A. m. caucasica* из Краснодарского края, 9 образцов *A. m. carpatica* из Республики Адыгея, 3 образца *A. m. macedonica* из Украины, 2 образца *A. m. carnica* из Литвы (эволюционная ветвь С). Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных фрагментов гена ND2 [Arias, Sheppard, 1996] проводили в компании Синтол (Москва) на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems (США).

Для сравнительного анализа были использованы нуклеотидные последовательности гена ND2 мтДНК 31 образца пчел эволюционной ветви А, 34 образца пчел эволюционной ветви С, 3 образца пчел эволюционной ветви М и 6 образцов эволюционной ветви О из базы данных Генбанка. Всего в сравнительном анализе нуклеотидной последовательности гена ND2 мтДНК нами было использовано 113 образцов пчел, из которых 31 – эволюционной ветви А, 55 – эволюционной ветви С, 21 – эволюционной ветви М, 6 – эволюционной ветви О (табл. 2). В качестве референсной использовались последовательности из полной последовательности митохондриального генома Nc001566 итальянской пчелы подвида *A. m. ligustica* эволюционной ветви С.

Статистический анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ MEGA 6.0, DNASTar 5.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами был проведен сравнительный анализ пчел четырех эволюционных ветвей А, М, С, О на основе 12 генов митохондриальной ДНК (табл. 2). В качестве референсной последовательности была использована последовательность Nc001566 итальянской пчелы подвида *A. m. ligustica* эволюционной ветви С. Все 12 генов были отобраны из последовательностей полной митохондриальной ДНК (16343 п.н.) [Crozier, Crozier, 1993], загруженных в базу данных Генбанка.

На основе сравнительного анализа с референсной последовательностью были обнаружены следующие однонуклеотидные замены: в гене ND2 (1000 п.н.) – 20 транзиций, в гене COII (676 п.н.) – 17 транзиций, в гене COI (1564 п.н.) – 4 трансверсии и 33 транзиции, в гене ATP8 (157 п.н.) – 5 транзиций, в гене ATP6 (679 п.н.) – 5 транзиций, в гене COIII (778 п.н.) – 3 трансверсии и 11 транзиций, в гене ND3 (352 п.н.) – 11 транзиций, в гене ND5 (1663 п.н.) – 4 трансверсии и 34 транзиции, в гене ND4 (1342 п.н.) – 9 трансверсий и 20 транзиций, в гене ND4L (262 п.н.) – 1 трансверсия и 7 транзиций, в гене ND6 (502 п.н.) – 1 трансверсия и 15 транзиций, в гене ND1 (916 п.н.) – 4 трансверсии и 22 транзиции (табл. 2).

Таблица 2

Однонуклеотидные замены в 12 генах мтДНК у представителей подвидов медоносной пчелы эволюционных ветвей А, М и О в сравнении с референсной последовательностью №001566 итальянской пчелы подвида *A. m. ligustica* эволюционной ветви С

Образцы пчелы	Ген	Позиции однонуклеотидных замен
NC001566 (reference) <i>A. m. ligustica</i> (C)		-
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	ND2	537 T>C, 541 T>C, 555 T>C, 634 T>C, 666 A>G, 741 C>T, 816 C>T, 888 T>C, 1176 C>T, 1194 T>C, 1404 C>T, 1454 C>T, 1471 A>G
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)		537 T>C, 541 T>C, 555 T>C, 634 T>C, 666 A>G, 741 C>T, 816 C>T, 888 T>C, 1176 C>T, 1194 T>C, 1404 C>T, 1454 C>T, 1471 A>G
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)		537 T>C, 541 T>C, 555 T>C, 634 T>C, 651 C>T, 666 A>G, 816 C>T, 897 T>C, 857 T>C, 999 C>T, 1188 A>G, 1454 C>T, 1471 A>G
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)		537 T>C, 541 T>C, 555 T>C, 634 T>C, 666 A>G, 741 C>T, 816 C>T, 888 T>C, 1176 C>T, 1194 T>C, 1404 C>T, 1454 C>T, 1471 A>G
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)		537 T>C, 541 T>C, 555 T>C, 634 T>C, 666 A>G, 741 C>T, 816 C>T, 999 C>T, 1050 T>C, 1194 T>C, 1305 T>C, 1404 C>T, 1454 C>T, 1471 A>G
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)		COII
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)	3632 T>C, 3707 T>C, 3761 C>T, 3767 C>T, 3816 A>G, 4004 C>T, 4055 C>T, 4112 C>T, 4127 T>C, 4136 T>C, 4242 A>G	
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)	3707 T>C, 3761 C>T, 3767 C>T, 3774 T>C, 3816 A>G, 4004 C>T, 4112 C>T, 4242 A>G	
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)	3632 T>C, 3707 T>C, 3737 T>C, 3761 C>T, 3767 C>T, 3816 A>G, 4004 C>T, 4055 C>T, 4112 C>T, 4127 T>C, 4136 T>C, 4242 A>G	
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)	3632 T>C, 3707 T>C, 3761 C>T, 3767 C>T, 3816 A>G, 4004 C>T, 4055 C>T, 4112 C>T, 4127 T>C, 4136 T>C, 4220 T>C, 4223 T>C, 4242 A>G, 4286 A>G	
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	COI	
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)		1919 A>C*, 1933 G>A, 1934 C>T, 1967 T>C, 1976 C>T, 2069 C>T, 2072 C>T, 2382 T>C, 2598 T>C, 2601 A>G, 2634 C>T, 2660 C>T, 2720 C>T, 2939 T>A*, 3054 C>T, 3084 C>T, 3107 T>C, 3152 T>A*, 3285 C>T
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)		1841 G>A, 1851 C>T, 1933 G>A, 1934 C>T, 1967 T>C, 1976 C>T, 2030 G>A, 2069 C>T, 2072 C>T, 2144 T>C, 2162 A>G, 2324 C>T, 2354 T>C, 2475 C>T, 2477 T>A*, 2598 T>C, 2633 T>C, 2642 T>C, 2660 C>T, 2672 C>T, 2720 C>T, 2939 T>A*, 3054 C>T, 3107 T>C, 3245 C>T, 3285 C>T, 3308 T>C
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)		1933 G>A, 1934 C>T, 1967 T>C, 1976 C>T, 2069 C>T, 2144 T>C, 2382 T>C, 2465 A>G, 2475 C>T, 2477 T>A*, 2598 T>C, 2601 A>G, 2660 C>T, 2720 C>T, 2939 T>A*, 3054 C>T, 3107 T>C, 3285 C>T
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)		1933 G>A, 1934 C>T, 1967 T>C, 1976 C>T, 2069 C>T, 2144 T>C, 2382 T>C, 2475 C>T, 2477 T>A*, 2598 T>C, 2601 A>G, 2660 C>T, 2720 C>T, 2939 T>A*, 3077 T>C, 3107 T>C, 3176 T>C, 3285 C>T
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)		ATP8
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)	4507 T>C, 4594 T>C	
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)	4474 T>C, 4507 T>C, 4512 C>T, 4594 T>C, 4602 A>G	
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)	4507 T>C, 4594 T>C	
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)	4507 T>C, 4594 T>C	
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	ATP6	
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)		5235 T>C
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)		5012 C>T, 5096 A>C*

KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)		5235 T>C
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)		4844 C>T, 5219 T>C, 5235 T>C
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	COIII	5320 T>C, 5354 A>T*, 5495 T>A*, 5639 A>G, 5654 A>G, 5772 T>C, 5935 T>C, 5936 T>C
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)		5354 A>T*, 5495 T>A*, 5639 A>G, 5654 A>G, 5772 T>C, 5935 T>C, 5936 T>C
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)		5416 A>T*, 5495 T>A*, 5539 T>C, 5639 A>G, 5772 T>C, 5923 T>C, 5959 T>C, 6019 C>T
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)		5495 T>A*, 5639 A>G, 5654 A>G, 5772 T>C, 5935 T>C, 5936 T>C, 6010 T>C
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)		5495 T>A*, 5639 A>G, 5654 A>G, 5772 T>C, 5935 T>C, 5936 T>C
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	ND3	6189 A>G, 6376 T>C, 6425 C>T, 6454 T>C
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)		6189 A>G, 6376 T>C, 6425 C>T, 6454 T>C, 6488 A>G
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)		6189 A>G, 6355 T>C, 6359 C>T, 6376 T>C, 6397 T>C, 6425 C>T, 6463 T>C, 6488 A>G, 6494 T>C
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)		6189 A>G, 6355 T>C, 6359 C>T, 6376 T>C, 6425 C>T, 6454 T>C, 6472 T>C, 6488 A>G
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)		6189 A>G, 6355 T>C, 6359 C>T, 6376 T>C, 6425 C>T, 6488 A>G
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	ND5	6901 A>C*, 6984 A>G, 7063 T>C, 7216 T>C, 7264 T>C, 7312 C>T, 7408 G>A, 7654 C>T, 7825 T>C, 7830 C>A*, 7954 T>C, 8026 C>T, 8089 C>T, 8254 C>T, 8260 T>C, 8302 C>T, 8383 T>C, 8519 T>C
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)		6901 A>C*, 6984 A>G, 7063 T>C, 7216 T>C, 7264 T>C, 7312 C>T, 7315 C>T, 7408 G>A, 7654 C>T, 7825 T>C, 7830 C>A*, 7954 T>C, 8026 C>T, 8089 C>T, 8254 C>T, 8260 T>C, 8302 C>T, 8383 T>C, 8422 C>T, 8519 T>C
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)		6899 T>C, 6940 C>T, 7012 T>C, 7092 T>C, 7242 T>C, 7339 T>C, 7408 G>A, 7585 T>C, 7636 C>T, 7654 C>T, 7830 C>A*, 8011 C>T, 8017 A>T*, 8089 C>T, 8158 T>C, 8179 T>C, 8239 T>A*, 8254 C>T, 8302 C>T, 8383 T>C, 8519 T>C
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)		6901 A>C*, 6984 A>G, 7063 T>C, 7092 T>C, 7216 T>C, 7264 T>C, 7312 C>T, 7408 G>A, 7585 T>C, 7654 C>T, 7830 C>A*, 7954 T>C, 8026 C>T, 8089 C>T, 8254 C>T, 8260 T>C, 8302 C>T, 8383 T>C, 8404 T>C, 8519 T>C
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)		6900T>C, 6901 A>C*, 6984 A>G, 7063 T>C, 7216 T>C, 7312 C>T, 7408 G>A, 7585 T>C, 7648 T>C, 7654 C>T, 7795 T>C, 7830 C>A*, 7954 T>C, 8019 T>C, 8026 C>T, 8089 C>T, 8254 C>T, 8260 T>C, 8383 T>C, 8404 T>C, 8519 T>C
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	ND4	8668 C>T, 8872 C>T, 8875 G>A, 8923 C>T, 9091 T>A*, 9202 C>T, 9268 C>T, 9361 C>T, 9426 T>C, 9529 C>T, 9532 T>C, 6546 A>G, 9589 T>C, 9613 C>T, 9772 C>T, 9781 T>A*, 9802 A>G, 9833 T>C, 9838 A>G, 9860 T>A*
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)		8668 C>T, 8872 C>T, 8875 G>A, 8923 C>T, 9091 T>A*, 9202 C>T, 9268 C>T, 9361 C>T, 9426 T>C, 9529 C>T, 9589 T>C, 9613 C>T, 9772 C>T, 9781 T>A*, 9802 A>G, 9833 T>C, 9838 A>G, 9860 T>A*
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)		8668 C>T, 8671 T>A*, 8854 C>T, 8872 C>T, 8875 G>A, 9091 T>A*, 9202 C>T, 9268 C>T, 9361 C>T, 9529 C>T, 6546 A>G, 9613 C>T, 9772 C>T, 9789 T>A*, 9833 T>C, 9860 T>A*, 9913 T>A*
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)		8668 C>T, 8872 C>T, 8875 G>A, 8893 A>G, 8923 C>T, 9091 T>A*, 9202 C>T, 9268 C>T, 9361 C>T, 9426 T>C, 9529 C>T, 9589 T>C, 9613 C>T, 9772 C>T, 9781 T>A*, 9802 A>G, 9833 T>C, 9838 A>G, 9860 T>A*, 9898 A>T*, 9899 T>A*, 9902 T>A*
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)		8668 C>T, 8875 G>A, 8923 C>T, 9091 T>A*, 9202 C>T, 9361 C>T, 9426 T>C, 9499 A>G, 9529 C>T, 6546 A>G, 9589 T>C, 9613 C>T, 9772 C>T, 9781 T>A*, 9802 A>G, 9833 T>C, 9860 T>A*, 9898 A>T*, 9899 T>A*, 9902 T>A*
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	ND4L	10048 T>A*, 10111 C>T, 10159 T>C

KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)		10048 T>A*, 10111 C>T, 10159 T>C
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)		10006 T>C, 10048 T>A*, 10141 A>G, 10156 T>C, 10159 T>C, 10207 C>T
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)		10048 T>A*, 10111 C>T, 10159 T>C
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)		10042 T>C, 10048 T>A*, 10111 C>T, 10159 T>C
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	ND6	10458 C>T, 10539 C>T, 10581 C>T, 10696 C>T, 10644 T>C, 10660 A>G, 10671 T>C, 10767 T>C
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)		10458 C>T, 10539 C>T, 10581 C>T, 10696 C>T, 10644 T>C, 10660 A>G, 10671 T>C, 10754 T>C, 10767 T>C
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)		10473 T>C, 10539 C>T, 10581 C>T, 10632 T>C, 10660 A>G, 10671 T>A*, 10761 C>T
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)		10458 C>T, 10581 C>T, 10696 C>T, 10644 T>C, 10660 A>G, 10671 T>C, 10767 T>C, 10884 C>T
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)		10458 C>T, 10581 C>T, 10696 C>T, 10601 G>A, 10644 T>C, 10660 A>G, 10671 T>C, 10767 T>C, 10786 C>T
KJ396189 <i>A. m. mellifera</i> (M)	ND1	12386 T>C, 12483 T>C, 12617 T>C, 12692 T>C, 12749 C>T, 12821 C>T, 12899 A>C*, 12908 C>T, 12914 C>T, 12992 T>C, 13085 A>T*, 13184 G>A, 13186 T>C
KJ396188 <i>A. m. mellifera</i> (M)		12386 T>C, 12483 T>C, 12617 T>C, 12692 T>C, 12749 C>T, 12821 C>T, 12899 A>C*, 12908 C>T, 12914 C>T, 13085 A>T*, 13184 G>A, 13186 T>C
KP163643 <i>A. m. syriaca</i> (O)		12386 T>C, 12483 T>C, 12581 T>C, 12614 T>C, 12617 T>C, 12689 C>A*, 12731 T>C, 12749 C>T, 12821 C>T, 12833 T>C, 12901 C>T, 12905 C>T, 12908 C>T, 12920 A>T*, 13060 A>G, 13091 C>T, 13184 G>A, 13186 T>C
KJ601784 <i>A. m. scutellata</i> (A)		12317 T>C, 12386 T>C, 12483 T>C, 12617 T>C, 12692 T>C, 12749 C>T, 12821 C>T, 12899 A>C*, 12908 C>T, 12914 C>T, 13049 T>C, 13085 A>T*, 13184 G>A, 13186 T>C
KM458618 <i>A. m. intermissa</i> (A)		12386 T>C, 12483 T>C, 12557 T>C, 12617 T>C, 12692 T>C, 12749 C>T, 12821 C>T, 12899 A>G, 12908 C>T, 12914 C>T, 13060 A>G, 13085 A>T*, 13091 C>T, 13184 G>A, 13186 T>C

*- звездочками обозначены трансверсии. В колонке образцы пчел буквами (A), (M), (C), (O) указывается принадлежность пчел к соответствующим эволюционным ветвям А, М, С и О.

На основании выявленной вариабельности нуклеотидной последовательности всех 12 митохондриальных генов нами была построена дендрограмма методом ближайшего соседа с применением бутстреп анализа (рис. 1). На дендрограмме по всем 12 генам митохондриального генома представители эволюционных ветвей А, М, С, О четко дифференцируются на 4 отдельные группы, где можно отметить генетическую близость между представителями эволюционных ветвей М и А, а также между представителями эволюционных ветвей О и С. Эти данные согласуются с гипотезой о происхождении эволюционных ветвей, где первоначально пчелы из Юго-Восточной Азии попали через побережье индийского океана на Ближний Восток. Из Ближнего Востока первоначально пчелы попали в Средиземноморье и сформировали эволюционную ветвь С. Позже, из Ближнего Востока пчелы попали в Африку и сформировали там эволюционную ветвь А [Garney et al., 1992]. Далее пчелы эволюционной ветви А проникли через Иберийский полуостров в Западную Европу и сформировали эволюционную ветвь М.

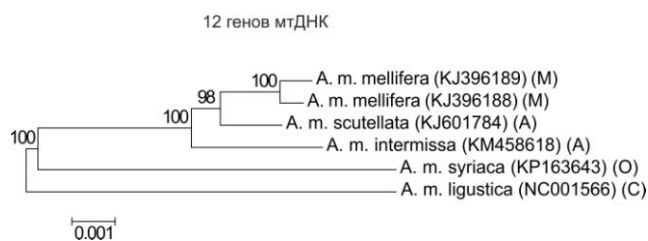


Рис. 1. Дендрограмма генетических взаимоотношений представителей пчел четырех эволюционных ветвей, построенная на основе общего сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей всех 12 митохондриальных генов методом ближайшего соседа с применением бутстреп анализа.

Кроме того, мы построили дендрограммы по каждому гену отдельно, чтобы выявить наиболее информативные для филогенетических исследований гены митохондриального генома медоносной пчелы (рис. 2).

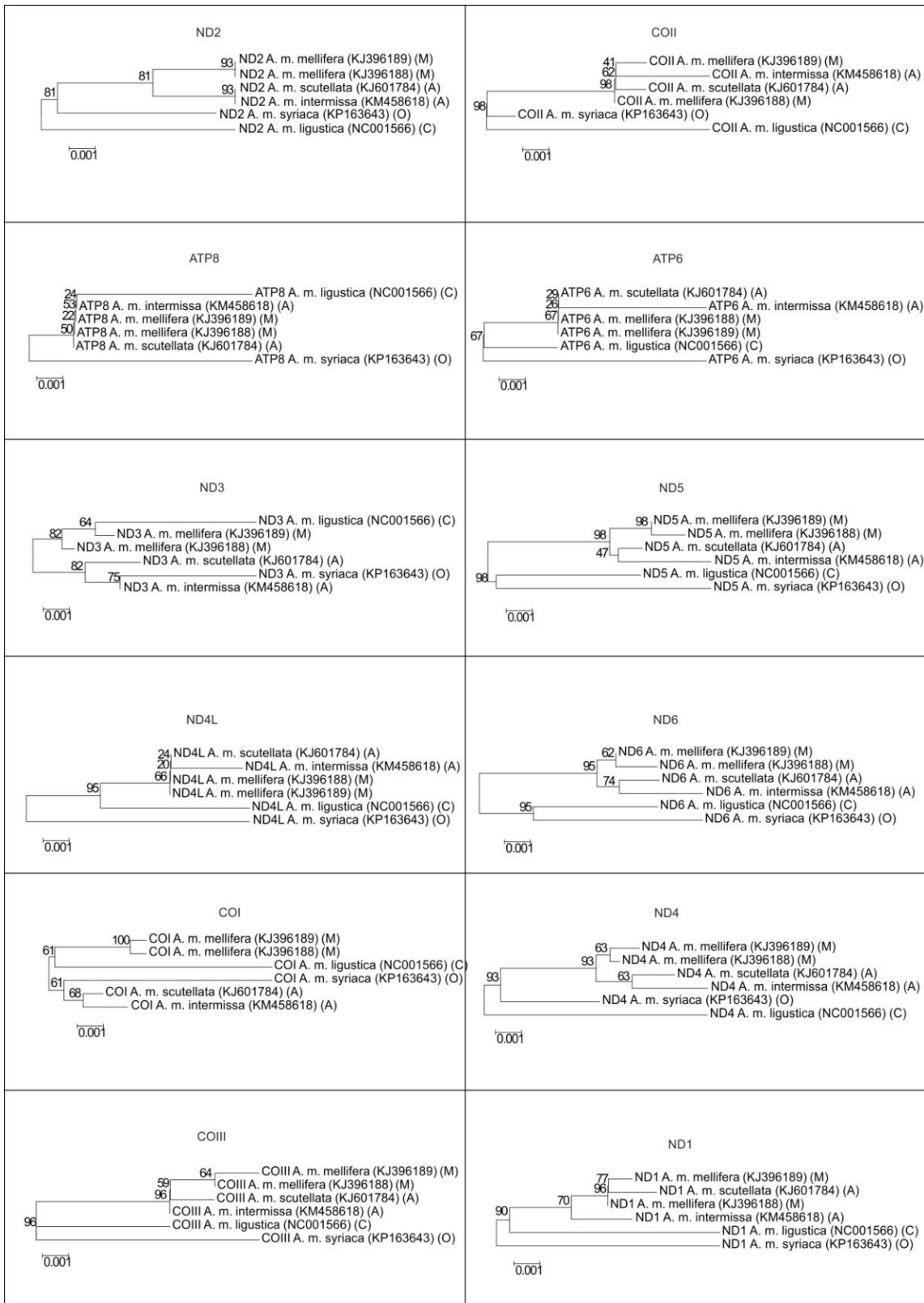


Рисунок 2. Дендрограммы генетических взаимоотношений представителей пчел четырех эволюционных ветвей, построенные на основе раздельного сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей каждого из 12 митохондриальных генов методом ближайшего соседа с применением бутстреп анализа.

На основании сравнительного анализа полученных дендрограмм для каждого из 12 митохондриальных генов (рис. 2) для представителей пчел эволюционных ветвей А, М, С, О с совокупной для всех 12 генов дендрограммой (рис. 1) можно заключить, что информативными маркерами для филогенетических исследований подвидов пчел являются следующие 7 генов митохондриального генома: ND2, ND4, ND4L, ND5, ND6, COI, COIII. Остальные 5 генов митохондриального генома – COII, ATP6, ATP8, ND1, ND3 не информативны для филогенетических исследований и не позволяют дифференцировать подвиды пчел эволюционных ветвей А, М, С, О. Таким образом, в результате проведенного сравнительного анализа мы показали, что филогенетические исследования на основе перечисленных 7 информативных локусов, взятых как в отдельности, так и все вместе, позволяют четко дифференцировать подвиды медоносной пчелы эволюционных ветвей А, М, С, О.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для проверки гипотезы о возможности использования сравнительного анализа нуклеотидной последовательности лишь одного из 7 выделенных информативных генов для дифференциации подвидов медоносной пчелы эволюционных ветвей А, М, С, О, мы решили провести сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена ND2 мтДНК статистически значимого объема выборки. Для этого мы

секвенировали и депонировали в Генбанк нуклеотидные последовательности 39 образцов пчел, относящихся к эволюционным ветвям М и С. Ранее проведенные экспериментальные филогенетические исследования позволяют применить сравнительный анализ нуклеотидной последовательности единственного гена ND2 мтДНК для дифференциации подвидов медоносной пчелы эволюционных ветвей А, М, С, О [Arias, Sheppard, 1996; Pyasov et al., 2011].

Ген ND2 мтДНК медоносной пчелы является наиболее активно изучаемым: в базе данных Генбанка содержатся нуклеотидные последовательности этого гена почти для всех известных подвидов. Для сравнительного анализа мы взяли из Генбанка нуклеотидные последовательности гена ND2 мтДНК 74 представителей пчел разных подвидов эволюционных ветвей А, М, С, О. В результате сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена ND2 113 образцов медоносной пчелы с референсной последовательностью Nc001566 итальянской пчелы подвида *A. m. ligustica* эволюционной ветви С нами была выявлена 71 однонуклеотидная замена, из которых 20 трансверсий и 51 транзиция (табл. 3). Из всех замен, 21 однонуклеотидная замена была признана неинформативной, поскольку встречалась только у одного единственного представителя пчел и могла быть, в том числе, ошибкой секвенирования.

Таблица 3

Однонуклеотидные замены в гене ND2 мтДНК у 113 представителей подвидов медоносной пчелы эволюционных ветвей А, М, С и О в сравнении с референсной последовательностью Nc001566 итальянской пчелы подвида *A. m. ligustica* эволюционной ветви С

Образцы пчел	Позиции однонуклеотидных замен
U35763 <i>scutellata</i> (A) (Africa)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 538 T>C, 555 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 478 A>T*, 657 T>C, 1077 T>C
U35762 <i>sahariensis</i> (A) (Africa)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 539 T>C, 555 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 999 C>T, 666 A>G, 478 A>T*, 1050 T>C
U35751 <i>intermissa</i> (A) (Africa)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 999 C>T, 666 A>G, 478 A>T*, 1050 T>C, 663 C>T
U35744 <i>adansonii</i> (A) (Africa)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 478 A>T*, 1056 T>C
U35761 <i>monticola</i> (A) (Africa)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 540 T>C, 555 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 888 T>C, 666 A>G, 478 A>T*, 1017 A>T*
U35764 <i>scutellata</i> (A) (Africa)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 888 T>C, 666 A>G, 478 A>T*
U35747 <i>capensis</i> (A) (Africa)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 888 T>C, T, 478 A>T*
U35746 (africanized) (A) (Africa)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 537 T>C, 555 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 888 T>C, 666 A>G, 478 A>T*, 663 C>T
U35745 (africanized) (A) (Africa)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 888 T>C, 666 A>G, 478 A>T*, 1003 C>T
U35743 <i>adansonii</i> (A) (Africa)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 481

	A>T*, 479 T>A*, 888 T>C, 666 A>G, 478 A>T*
Kj628987 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G, 662 C>T
Kj628986 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G, 510 C>T
Kj628984 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G, 837 T>C
Kj628983 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G, 554 T>A*
Kj628977 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G, 813 C>T
Kj628974 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G, 867 T>C,
Kj628973 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 900 A>T*
Kj628972 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G, 771 T>C
Kj628971 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G, 913 G>A, 1017 A>T*
Kj628970 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G, 1017 A>T*
Kj628968 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G, 1053 T>C
Kj628966 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C
Kj628964 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 888 T>C, 666 A>G
Kj628985 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C
Kj628982 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 657 T>C, 1077 T>C, 913 G>A
Kj628979 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 666 A>G, 585 T>C
Kj628978 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 657 T>C, 1077 T>C, 813 C>T
Kj628975 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 657 T>C, 1077 T>C, 959 C>T
Kj628969 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 657 T>C, 1077 T>C
Kj628967 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 666 A>G, 585 T>C, 552 T>A*
Kj628965 (A) (Kenya)	541 T>C, 816 C>T, 741 C>T, 634 T>C, 537 T>C, 555 T>C, 666 A>G
Km242631 <i>mellifera</i> (M) (Switzerland) #	541 T>C, 816 C>T, 778 G>A, 838 T>C
Km242630 <i>mellifera</i> (M) (Switzerland) #	541 T>C, 816 C>T, 778 G>A, 838 T>C,
Km242612 <i>mellifera</i> (M) (Bashkortostan, Birskii) #	541 T>C, 816 C>T, 504 C>T
Km242610 <i>mellifera</i> (M) (Bashkortostan, Burzyanskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1015 C>T
Km242609 <i>mellifera</i> (M) (Bashkortostan, Beloreckii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1015 C>T, 699 A>G
Km242606 <i>mellifera</i> (M) (Bashkortostan, Abzelilovskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1015 C>T, 1050 T>C
Ay114495 <i>mellifera</i> (M) (Europe)	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1047 T>C
Dq181613 <i>mellifera</i> (M) (Bashkortostan, Burzyanskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T
Dq181622 <i>mellifera</i> (M) (Permskii, Osinskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T
Dq181621 <i>mellifera</i> (M) (Permskii, Nytvenskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T, 861 G>A

Dq181620 <i>mellifera</i> (M) (Permskii, Chastinskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T
Dq181619 <i>mellifera</i> (M) (Permskii, Krasnovisherskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 621 C>T
Dq181617 <i>mellifera</i> (M) (Permskii, Krasnovisherskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T, 861 G>A
Dq181616 <i>mellifera</i> (M) (Bashkortostan, Tatyshlinskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T
Dq181615 <i>mellifera</i> (M) (Bashkortostan, Tatyshlinskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T
Dq181612 <i>mellifera</i> (M) (Bashkortostan, Burzyanskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T
Dq181611 <i>mellifera</i> (M) (Bashkortostan, Burzyanskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T
Dq181618 <i>mellifera</i> (M) (Permskii, Krasnovisherskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T, 861 G>A, 1047 T>C, 536 T>C
Dq181614 <i>mellifera</i> (M) (Bashkortostan, Tatyshlinskii) #	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 504 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 1015 C>T, 536 T>C
U35760 <i>mellifera</i> (M) (Western Europe)	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C
U35758 <i>mellifera</i> (M) (Western Europe)	541 T>C, 816 C>T, 999 C>T, 987 T>A*, 1023 T>C, 1071 T>C, 913 G>A, 1047 T>C, 974 T>C
U35755 <i>macedonica</i> (C) (Macedonia)	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 478 A>T*
Km242629 <i>caucasica</i> (C) (Krasnodarskii) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 752 C>T, 480 A>T*, 484 A>T*, 779 T>G*
Km242628 <i>caucasica</i> (C) (Krasnodarskii) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 752 C>T, 480 A>T*, 484 A>T*, 779 T>G*
Km242627 <i>caucasica</i> (C) (Krasnodarskii) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 752 C>T, 480 A>T*, 484 A>T*
Km242626 <i>caucasica</i> (C) (Krasnodarskii) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 752 C>T, 480 A>T*, 484 A>T*, 916 T>C
Km242625 <i>caucasica</i> (C) (Krasnodarskii) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 752 C>T, 480 A>T*, 484 A>T*, 916 T>C
Km242624 <i>caucasica</i> (C) (Krasnodarskii) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 752 C>T, 480 A>T*, 484 A>T*, 779 T>G*, 916 T>C
Km242623 <i>caucasica</i> (C) (Krasnodarskii) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 752 C>T, 480 A>T*, 484 A>T*, 567 A>G
Km242622 <i>carpatica</i> (C) (Adygeya) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 480 A>T*, 484 A>T*, 779 T>G*
Km242621 <i>carpatica</i> (C) (Adygeya) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 480 A>T*, 484 A>T*, 779 T>G*
Km242620 <i>carpatica</i> (C) (Adygeya) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 480 A>T*, 484 A>T*, 779 T>G*
Km242619 <i>carpatica</i> (C) (Adygeya) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 936 A>G, 480 A>T*, 484 A>T*, 779 T>G*
U35749 <i>camica</i> (C) (Eastern Europe)	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 480 A>T*, 484 A>T*, 894 T>C
Hq318730 <i>caucasica</i> (C) (Krasnodarskii) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 752 C>T, 480 A>T*, 484 A>T*
Hq318729 <i>caucasica</i> (C) (Krasnodarskii) #	541 T>C, 481 A>T*, 479 T>A*, 752 C>T, 480 A>T*, 484 A>T*, 476 G>A
Km242616 <i>carpatica</i> (C) (Adygeya) #	541 T>C, 481 A>T*, 936 A>G, 480 A>T*, 484 A>T*, 779 T>G*
Jq778310 <i>camica</i> (C) (Eastern Serbia)	541 T>C
Jq778309 <i>camica</i> (C) (Eastern Serbia)	541 T>C
Jq778308 <i>camica</i> (C) (Eastern Serbia)	541 T>C,
Jq778307 <i>camica</i> (C) (Eastern Serbia)	541 T>C
Jq778306 <i>camica</i> (C) (Eastern Serbia)	541 T>C
Jq778305 <i>camica</i> (C) (Eastern Serbia)	541 T>C
Jq778304 <i>camica</i> (C) (Eastern Serbia)	541 T>C, 1086 T>G*

Ay114510 <i>camica</i> (C) (Eastern Serbia)	541 T>C
Ay114508 <i>camica</i> (C) (Eastern Europe)	541 T>C
Ay114505 <i>cecropia</i> (C) (Southern Greece)	541 T>C
Ay114502 <i>adami</i> (O) (Crete)	541 T>C, 936 A>G, 752 C>T, 1114 T>A*, 1115 A>T*, 1120 T>A*
AY114501 <i>adami</i> (O) (Crete)	541 T>C, 936 A>G, 752 C>T, 1114 T>A*, 1115 A>T*, 1120 T>A*
Km242618 <i>carpatica</i> (C) (Adygeya) #	541 T>C, 936 A>G, 779 T>G*
Km242617 <i>carpatica</i> (C) (Adygeya) #	541 T>C, 936 A>G, 779 T>G*
Km242615 <i>camica</i> (C) (Lithuania) #	541 T>C, 752 C>T
Km242614 <i>camica</i> (C) (Lithuania) #	541 T>C, 752 C>T, 715 T>C
U35748 <i>camica</i> (C) (Eastern Europe)	541 T>C, 1110 T>A*
Dq361090 <i>macedonica</i> (C) (Ukraine) #	541 T>C, 1099 T>C
Dq361089 <i>macedonica</i> (C) (Ukraine) #	541 T>C, 1099 T>C
Dq361088 <i>macedonica</i> (C) (Ukraine) #	541 T>C
Ay114509 <i>camica</i> (C) (Eastern Europe)	541 T>C, 504 C>T, 894 T>C
Ay114507 <i>camica</i> (C) (Eastern Europe)	541 T>C, 504 C>T, 894 T>C
Ay114506 <i>cecropia</i> (C) (Southern Greece)	541 T>C
Ay114504 <i>macedonica</i> (C) (Macedonia)	541 T>C
Ay114503 <i>macedonica</i> (C) (Macedonia)	541 T>C
Ay114500 <i>adami</i> (O) (Crete)	541 T>C
Ay114499 <i>anatoliaca</i> (O) (Turkey)	541 T>C, 1003 C>T
Ay114498 <i>caucasica</i> (C) (Caucasus)	541 T>C, 936 A>G, 752 C>T
Ay114497 <i>caucasica</i> (C) (Caucasus)	541 T>C
AY114496 <i>caucasica</i> (C) (Caucasus)	541 T>C, 752 C>T
Ay114491 <i>ligustica</i> (C) (Italy)	541 T>C, 999 C>T, 658 G>A
Ay114489 <i>ligustica</i> (C) (Italy)	541 T>C, 999 C>T, 658 G>A
Ay114485 <i>ligustica</i> (C) (Italy)	541 T>C, 999 C>T, 658 G>A
Ay114484 <i>ligustica</i> (C) (Italy)	541 T>C
AY136625 <i>pomonella</i> (C) (Tian Shan)	541 T>C, 936 A>G, 752 C>T
Ay136624 <i>pomonella</i> (C) (Tian Shan)	541 T>C, 1129 A>G
Ay136622 <i>pomonella</i> (C) (Tian Shan)	541 T>C, 888 T>G*, 894 T>G*, 1100 T>C, 763 A>G, 912 A>G, 538 T>G*, 578 A>G, 600 A>G
Ay618911 <i>cyprica</i> (O) (Cyprus)	541 T>C, 888 T>G*, 894 T>G*, 1100 T>C, 763 A>G, 912 A>G, 886 A>C*
Ay618910 <i>cyprica</i> (O) (Cyprus)	541 T>C, 888 T>G*, 894 T>G*, 1100 T>C, 763 A>G, 912 A>G, 886 A>C*
Ay136623 <i>pomonella</i> (C) (Tian Shan)	888 T>G*, 936 A>G, 752 C>T, 1100 T>C, 538 T>G*, 578 A>G, 1126 A>T*
AY114488 <i>ligustica</i> (C) (Italy)	-
Ay114487 <i>ligustica</i> (C) (Italy)	-
Ay114486 <i>ligustica</i> (C) (Italy)	-
U35754 <i>ligustica</i> (C) (Italy)	-
Nc001566 <i>ligustica</i> (C) (Italy) (reference)	-

*- звездочками в заменах обозначены трансверсии. # - решетками в образцах указаны образцы, секвенированные сотрудниками нашей лаборатории.

На основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена ND2 мтДНК медоносной пчелы всех 113 образцов нами была построена дендрограмма методом ближайшего соседа с применением бутстреп анализа (рис. 3).

На дендрограмме подтверждается информативность применения сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена ND2 для дифференцировки подвидов пчел эволюционных ветвей А, М, С, О. Образцы пчел четко подразделяются на 4 группы. Проанализированные

нами образцы пчел Пермского края и Республики Башкортостан попадают в группу с пчелами *A. m. mellifera* европейских популяций и формируют эволюционную ветвь М. Наши образцы пчел из Краснодарского края и Республики Адыгея попадают в группу с пчелами разных подвидов, формирующих эволюционную ветвь С.

На дендрограмме эволюционная ветвь С подразделилась на 2 части, что позволяет предположить наличие внутренней генетической подразделенности.

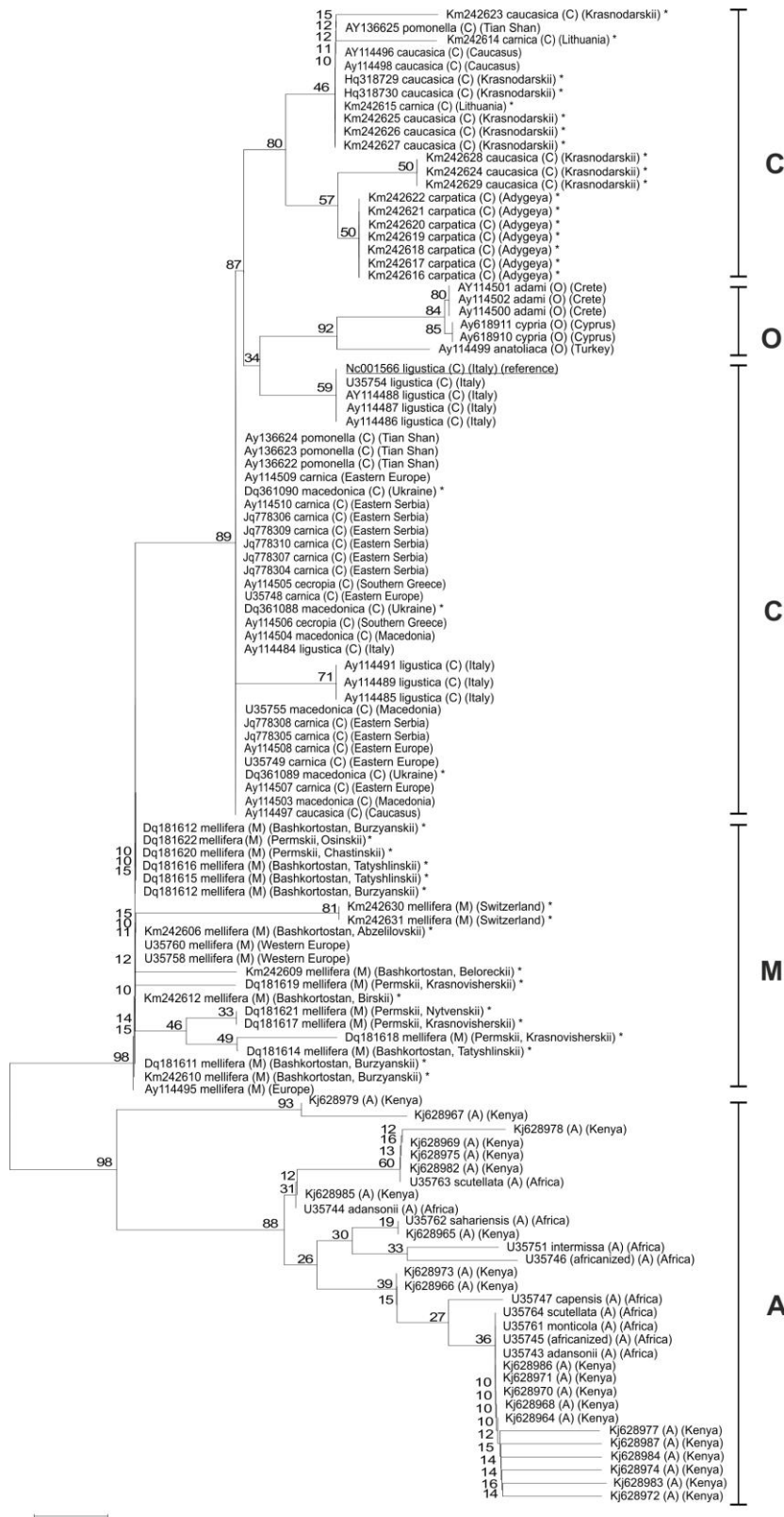


Рисунок 3. Дендрограмма генетических взаимоотношений 113 представителей пчел четырех эволюционных ветвей А, М, С, О, построенная на основе общего сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена ND2 методом ближайшего соседа с применением бутстреп анализа.

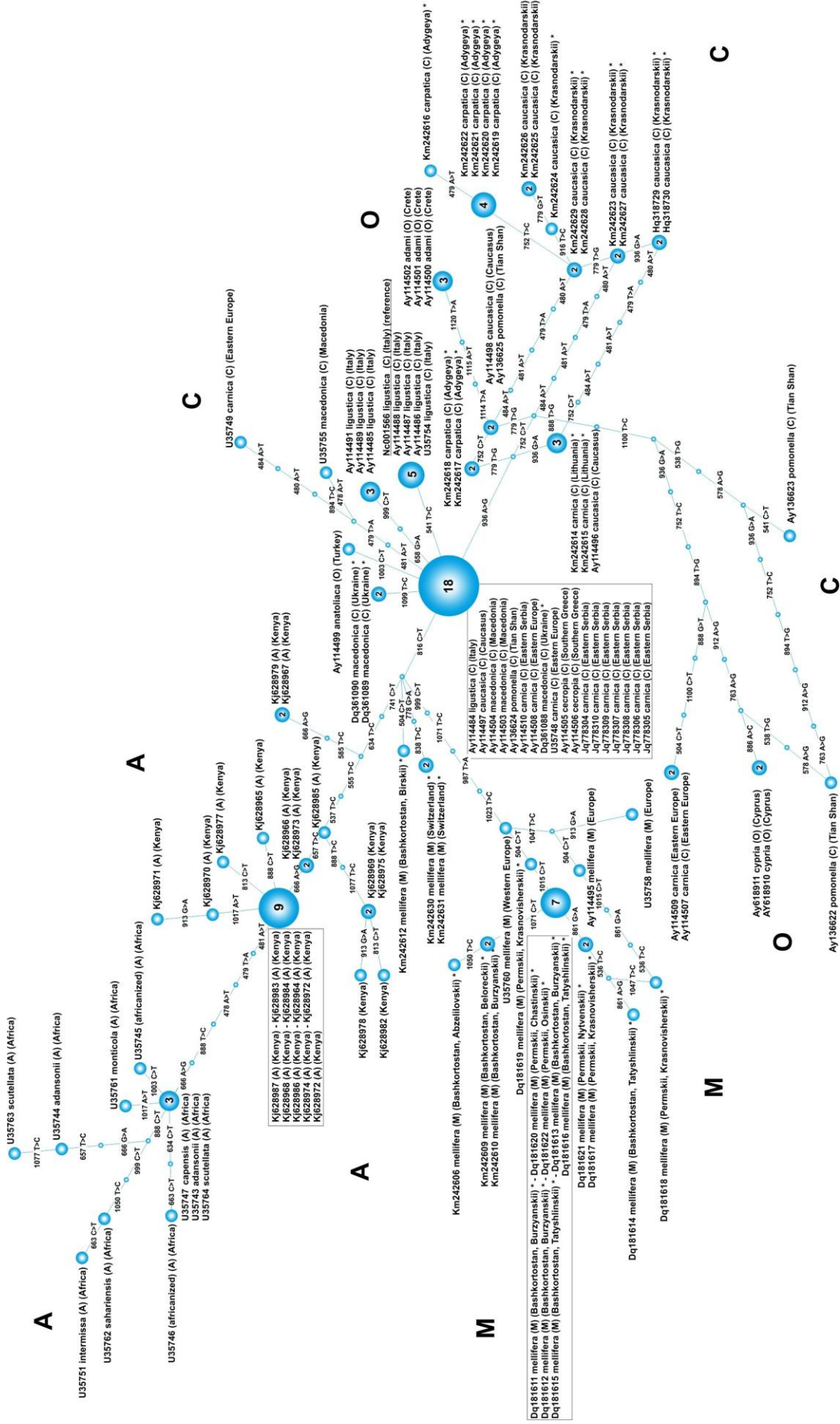


Рисунок 4. Медианная сеть, построенная на основе однонуклеотидных замен гена ND2 мтДНК для 113 представителей пчел четырех эволюционных ветвей А, М, О, С.

Данная группировка совпадает также и с естественным географическим распространением подвидов пчел: эволюционная ветвь А объединила пчел со всей территории Африки, ветвь С – Северного Средиземноморья и Восточной Европы, О – Ближнего Востока и Южного Средиземноморья, М – Западной и Северной Европы и Урала. Для наглядного отображения филогенетических связей и очередности возникновения нуклеотидных замен у представителей пчел разных эволюционных ветвей нами была построена медианная сеть на основе информативных однонуклеотидных замен гена ND2 мтДНК для 113 представителей пчел четырех эволюционных ветвей А, М, С, О (рис. 4).

На медианной сети подвиды пчел дифференцируются на 4 эволюционные ветви. Выявляется внутренняя генетическая подразделенность внутри каждой эволюционной ветви, что вызвано естественными эволюционными процессами в процессе адаптации к условиям среды обитания. Медианная сеть дополняет дендрограмму и позволяет рассчитать число нуклеотидных замен между представителями разных подвидов, выявить подвиды, составляющие ядро эволюционной ветви, рассчитать время дивергенции подвидов, предсказать вероятность дальнейших филогенетических изменений.

Таким образом, в результате сравнительного анализа 12 генов митохондриального генома нами выявлено 7 информативных генов (ND2, ND4, ND4L, ND5, ND6, COI, COII), позволяющих четко дифференцировать подвиды медоносной пчелы четырех эволюционных ветвей А, М, С, О. На примере использования сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена ND2 мтДНК на статистически значимом объеме выборки мы показали высокий уровень дифференцирующей способности этого гена и предположили возможность отдельного использования каждого из 7 генов для дифференциации подвидов 4 эволюционных ветвей.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 13-04-01802 и 14-04-97084 р_поволжье_а на оборудовании ЦКП «Биомика» отделения биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильясов Р.А., Косарев М.Н., Поскряков А.В., Шарипов А.Я., Николенко А.Г. Новый подход к оценке генетического потенциала семей темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* на основе полиморфизма микросателлитных локусов // Биомика. 2015а. Т. 7. С. 138-152.
2. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Методы идентификации подвида *A.m.mellifera* пчелы медоносной // Пчеловодство. № 8. 2008. С. 8-9.
3. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Современное состояние и сохранение темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* в России и странах Европы // Биомика. 2015б. Т. 7. С. 121-127.
4. 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. 2015в. Т. 51 (7). С. 792–798.
5. Alburaki M., Bertrand B., Legout H. et al. A fifth major genetic group among honeybees revealed in Syria // BMC Genetics. 2013. V. 14. P. 117.
6. Arias M.C., Sheppard W.S. Molecular phylogenetics of honeybee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence // Mol. Phylogenet. Evol. 1996. V. 5. P. 557–566.
7. Cornuet J.M., Garnery L., Solignac M. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA // Genetics. 1991. V. 128. P. 393-403.
8. 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.
9. Engel M.S. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*) // J. Hym. Res. 1999. V. 8. P. 165-196.
10. Franck P., Garnery L., Loiseau B.P. et al. Genetic diversity of the Honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data // Heredity. 2001. V. 86. P. 420-430.
11. Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.-M. Molecular conformation of a fourth lineage in honeybees from Middle-East // Apidologie. 2000. V. 31. P. 167-180.
12. Fuller Z.L., Nino E.L., Patch H.M. et al. Genome-wide analysis of signatures of selection in populations of African honey bees (*Apis mellifera*) using new web-based tools // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 1-18. DOI: 10.1186/s12864-015-1712-0.
13. 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. P. 145-154.
14. Gibson J.D., Hunt G.J. The complete mitochondrial genome of the invasive Africanized Honey Bee, *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA. 2014. DOI: 10.3109/19401736.2014.905858.
15. Haddad N.J. Mitochondrial genome of the levant region honeybee, *Apis mellifera syriaca* (Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA. 2015. DOI: 10.3109/19401736.2014.1003846.
16. Hepburn H.R., Radloff S.E. Honeybees of Africa. Berlin: Springer, 1998. 130 p.
17. Hu P., Lu Z.X., Wang Y.Z. et al. Complete mitochondrial genome of the Algerian honeybee, *Apis*

- mellifera intermissa* (Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA. 2014. DOI: 10.3109/19401736.2014.963815.
18. Ilyasov R.A., Kutuev I.A., Petukhov A.V., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Phylogenetics relationships of dark European honeybees *Apis mellifera mellifera* L. from the Russian Ural and West European populations // Journal of Apicultural Science. 2011. V. 55. P. 67-76.
 19. Jensen A.B., Pedersen B.V. Honeybee Conservation: a case story from Læsø island, Denmark, in: Lodesani M., Costa C. Beekeeping and conserving biodiversity of honeybee. Sustainable bee breeding. Northern Bee Books, Hebden Bridge, 2005. P. 142-164.
 20. Kandemir I., Kence M., Sheppard W.S., Kence A. Mitochondrial DNA variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Turkey // J. Apic. Res. 2006. V. 45. P. 33-38.
 21. Kekecoglu M., Bouga M., Soysal M. I., Harizanis P. Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee populations from Turkey using PCR-RFLP's analysis of two mtDNA segments // Bulg. J. Agric. Sci. 2009. V. 15. P. 589-597.
 22. Meixner M.D., Leta M.A., Koeniger N., Fuchs S. The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera* - *Apis mellifera simensis* n. ssp. // Apidologie. 2011. V. 42. P. 425-437.
 23. Meixner M.D., Pinto M.A., Bouga M. et al. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera* // J. Apic. Res. 2013. V. 52. DOI 10.3896/IBRA.1.52.4.05.
 24. Oleksa A., Chybicki I., Tofilski A., Burczyk J. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland // J. Apic. Res. 2011. V. 50. P. 116-129.
 25. Palmer M.R., Smith D.R., Kaftanoglu O. Turkish honeybees: genetic variation and evidence of a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA // J. Hered. 2000. V. 91. P. 42-46.
 26. 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. Apic. Sci., 2013. V. 57. P. 127-134.
 27. Péntek-Zakar E., Oleksa A., Borowik T., Kusza S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies // Ecology and Evolution. 2015. P. 1-12. doi: 10.1002/ece3.1781.
 28. Pinto M.A., Muñoz I., Chávez-Galarza J., De La Rua P. The Atlantic side of the Iberian peninsula: a hot-spot of novel African honey bee maternal diversity // Apidologie. 2012. V. 43. P. 663-673.
 29. Ruttner F. Biogeography and Taxonomy of Honey bees. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 288 p.
 30. Ruttner F., Tassencourt L., Louveaux J. Biometrical statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. I: Materials and methods // Apidologie 1978. V. 9. P. 363-382.
 31. Sheppard W.S., Meixner M.D. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia // Apidologie. 2003. V. 34. P. 367-375.
 32. Soland-Reckeweg G., Heckel G., Neumann P. et al. Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera* // J. Insect Conserv. 2009. V. 13. P. 317-328.
 33. Wallberg A., Han F., Wellhagen G. et al. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* // Nat. Genet. 2014. V. 46. P. 1081-1088.
 34. Whitfield C.W., Behura S.K., Berlocher S.H. et al. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera* // Science. 2006. V. 314. P. 642-645.

ANALYSIS OF THE INFORMATIVENESS OF THE MITOCHONDRIAL GENES IN PHYLOGENETICS RESEARCHES OF THE HONEY BEE *APIS MELLIFERA*

*R.A. Ilyasov, A.V. Poskryakov, A.G. Nikolenko

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences
450054, Ufa, Prospekt Octyabrya, 71, *E-mail: apismell@hotmail.com

ANNOTATION

Seven informative genes of the honey bee *Apis mellifera*, which allow differentiating subspecies from evolutionary lineages A, M, C, O, were found based on the comparative analysis of 12 genes mitochondrial genome. We had showed the high level differentiate ability of the gene ND2 mtDNA by comparative analysis of the sequences this gene on statistically significant size of sample of the honey bees. We suggested that each one from the seven informative genes can be used for differentiation the subspecies of the honey bees from evolutionary lineages A, M, C, O.

Keywords: dark European bees, evolutionary lineage, *Apis mellifera*, mtDNA, gene ND2, mitochondrial genome, subspecies differentiation, phylogenetics analysis, single nucleotide polymorphism.