

ВНУТРИПОРОДНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ВЗАИМООТНОШЕНИЯ МЕЖДУ КАРПАТСКОЙ (*Apis mellifera carpathica*) И КАВКАЗСКОЙ (*Apis mellifera caucasica*) РАСАМИ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

© 2023 г. Т. А. Триселева*, @, А. Ф. Сафонкин*, Т. О. Быкова**, М. Я. Рухкян***

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 117071 Россия

**Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского, Симферополь,
просп. Академика Вернадского, 4, Симферополь, 295007 Россия

***Центр зоологии и гидроэкологии АН, ул. П. Севака, 7, Ереван, 0014 Армения

@E-mail: triselyova@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.02.2023 г.

После доработки 08.02.2023 г.

Принята к публикации 08.02.2023 г.

По анализу 94 сиквенсов гена *COI* мтДНК изучено внутрипородное разнообразие и эволюционные взаимоотношения пчел из России, Украины, Армении, Киргизии, Таджикистана, Польши. Выявлено два основных гаплотипа, соответствующие расам *A. m. carpathica* и *A. m. caucasica*, распространенных в исследуемых регионах. Однако в Армении преобладают пчелы кавказской расы, а в Польше – карпатской. Большим гаплотипическим разнообразием обладает *A. m. caucasica*, один из ее гаплотипов образован образцами пчел крымской горной породы, возможно самостоятельной расы *A. m. taurica*. На филогенетическом дереве выделяются 2 кластера: один включает *A. m. mellifera* и *A. m. iberica* (эволюционная линия М), другой (линия С) – *A. m. ligustica*, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*. Гаплотипы *A. m. caucasica* имеют большее количество замен на сайт, что указывает на их более раннее происхождение по сравнению с *A. m. ligustica* и *A. m. carpathica*. По времени расхождения *A. mellifera* и *A. cerana* в 6 млн лет, отхождение всех рас линии С оценено от 1.3 до 0.6 млн, расы *A. m. caucasica* 0.35–0.25 млн, *A. m. carpathica* – 0.2–0.04 млн. При использовании универсальных праймеров с подбором условий амплификации для участка гена *COI* мтДНК выявлен несинонимичный SNP G/A в позиции 4 (680 п.н.) отличающий *A. m. carpathica* от *A. m. ligustica*.

Ключевые слова: медоносная пчела, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*, филогения пчел, *COI* мтДНК

DOI: 10.31857/S102634702360005X, **EDN:** TQCXWF

Виды медоносных пчел рода *Apis*: *A. florea* – малая, *A. dorsata* – гигантская, *A. cerana* – восточная, *A. mellifera* – западная определились как самостоятельные виды уже во время олигоцена. Последний Ледниковый период привел к тому, что пчелы на территории Европы отодвинулись на юг, где в результате сформировались современные расы медоносной пчелы *A. mellifera* (Ruttner, 1992). Медоносные пчелы, населяющие Европу в настоящее время – результат их вторичного расселения из южных регионов.

В процессе эволюции и расселения внутри вида *Apis mellifera* сформировались группы пчел, приуроченные к разным природно-климатическим условиям, различающиеся по комплексу биологических признаков и имеющие определенный ареал. В.В. Алпатов (Алпатов, 1948), разбирая вопросы внутривидовой изменчивости, предложил различать несколько типов подвидов и придерживался мнения, что географические подвиды

пчел соответствуют понятию “природных” или “примитивных” пород. Таким образом, группы пчел, различные по комплексу признаков, в отечественной литературе обозначаются как породы. В зарубежной литературе эти группы пчел обозначают термином “раса”, рассматривая их как результат естественного отбора. В научной литературе породы пчел в зоологическом смысле часто рассматриваются как подвиды пчел. В современных условиях разведения пчел зоологический термин “подвид” на наш взгляд может быть отнесен только к аборигенным пчелам определенного региона, что соответствует понятию “раса”. Термин “породность” более близок к группам пчел, искусственно разводимым в питомниках и на пасеках.

Медоносная пчела играет большую роль в формировании структуры растительных биоценозов посредством опыления. Для каждого биоценоза имеет значение таксономическая принад-

лежность пчел и поддержание чистопородности генофонда, поскольку разные расы медоносной пчелы предпочитают определенные виды опыляемых растений (Ильясов и др., 2017б).

Таксономия медоносной пчелы содержит множество вопросов, связанных со спецификой популяционной структуры, особенностями биологии и решениями методов распознавания подвидов медоносных пчел. Существование переходных зон между ареалами подвидов привело к обмену генетическим материалом и, как следствие, к постепенному изменению характеристик соседних подвидов. Большую роль в этом процессе играет также искусственная гибридизация в результате вмешательства человека (Ильясов и др., 2017а, 2017в; Ilyasov *et al.*, 2020).

К настоящему времени разработаны десятки методов идентификации таксономической принадлежности семей пчел. Первоначально во всем мире использовали только морфометрические методы исследования. Однако морфометрические признаки не всегда информативны, поскольку под воздействием условий среды обитания подвержены изменчивости (Franck *et al.*, 2000). Еще в начале 20 в. А.С. Михайлов (Михайлов, 1927), изучая сезонную изменчивость экстерьерных признаков пчел (длина хоботка, длину и ширину правого переднего крыла, число зацепов на правом заднем крыле, сумму длин 3 и 4 тергитов), установил, что в течение сезона, в той или иной степени, меняются все измеренные показатели.

Методы молекулярной диагностики для идентификации пчел включают анализ варибельности аллозимных локусов, мтДНК, микросателлитных локусов ядерной ДНК, сайтов однонуклеотидных замен. (Ильясов и др., 2017в). Разработка штрихкодирования ДНК для создания стандартизованного, экономичного и эффективного по времени метода идентификации видов (Bouga *et al.*, 2011), несмотря на некоторые критические замечания (Meuer, Paulay, 2006; Rubinoff *et al.*, 2006), дает свои результаты. Для филогенетических и филогеографических исследований медоносной пчелы успешно используются методы на основе полиморфизма локусов мтДНК (Smith 1991; Ильясов и др., 2006). Учитывая появление новых данных о географическом распределении, генетическом разнообразии и структуре можно ожидать, что штрихкодирование ДНК улучшит исследования молекулярной филогенетики и популяционной генетики (Hajibabaei *et al.*, 2007).

Широко распространенными на территории Европы и интенсивно используемыми пчеловодами являются две близкие расы: кавказская *A. m. caucasica* и карпатская *A. m. carpathica*. Эти расы имеют перекрывающиеся места обитания с другими расами, что привело к увеличению степени гибридизации *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* не

только друг с другом, но и с другими подвидами (Bouga *et al.*, 2011; Pentek–Zakar *et al.*, 2015; Kukrer *et al.*, 2017). Несмотря на широкое использование на пасеках Европы этих рас, таксономическое положение и генетическое родство *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* до сих пор остаются спорными.

A. m. carpathica — наименее изученная из всех рас медоносных пчел. Она практически неизвестна для многих исследователей и не всегда упоминается в литературе как самостоятельная раса (Maa, 1953; Ruttner, 1988; Arias, Sheppard, 1996; Franck *et al.*, 2000; Smith, 2002; Kandemir *et al.*, 2011; Ilyasov *et al.*, 2019). Например, *A. m. carpathica* как самостоятельная раса не была подтверждена также F. Ruttner, который считал ее ответвлением от *A. m. carnica* в западной части Румынии и от *A. m. macedonica* на юго-востоке (цитируется по Bouga *et al.*, 2011).

Филогенетический анализ на основе полной мтДНК показал, что *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* являются самостоятельными подвидами и представляют эволюционную линию С (Ilyasov *et al.*, 2019), куда кроме них входят следующие расы медоносной пчелы Восточной Европы и Северного Средиземноморья: *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. macedonica*, *A. m. cecropia*, *A. m. sicula* (Ильясов и др., 2018).

Ранее нами было описано внутривидовое разнообразие *A. m. carpathica* на основе морфологических и молекулярных данных (Сафонкин и др., 2019). Однако известные данные не позволяют уточнить взаимоотношения между *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*.

Цель работы — исследование внутривидового разнообразия и эволюционных взаимоотношений между *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* и выявление критериев определения чистопородности на основе секвенирования участка гена *COI* мтДНК в пробах рабочих пчел.

МАТЕРИАЛЫ МЕТОДЫ

Нами были получены и проанализированы 94 сиквенса (из них 68 новые) от особей рабочих пчел *A. mellifera*, отловленных с частных пасек на территории Российской Федерации (Москва, Московская, Липецкая области, Крым), Украины, разных регионов Армении, из Киргизии, Таджикистана, а также из пасек разных районов Польши. Только часть образцов из пасек имела обозначенный породный статус. Крым: *A. m. carpathica* *A. m. caucasica*; Украина: *A. m. carpathica*; Польша: *A. m. carnica* *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* (табл. 1).

Общая ДНК была выделена из лапок имаго пчел с использованием реагентов “Diatom™ DNA Prep 200” (Изоген, Москва). Амплификацию проводили с использованием набора реактивов

Таблица 1. Образцы пород рабочих пчел *Apis mellifera*

Исходные данные с пасеки			Результаты анализа COI мт ДНК
Место сбора	Год	Кол-во проб/раса	Кол-во сиквенсов/раса/ гаплотип
Москва, Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина	2015	3/не указана	1/карпатка/Г2 2/кавказка/Г1
Московская область, г. Гжель	2015	2/не указана	2/карпатка/Г2
Липецкая область, г. Липецк	2016	2/не указана	1/карпатка/Г2 1/кавказка/Г1
Крым с. Укромное Симферопольского р-на г. Феодосия “Красные пещеры” Симферопольского р-на г. Бахчисарай		6/не указана 2/не указана 4/не указана 1/не указана 10/Крымская? 3/карпатка 3/кавказка 6/не указана	6/карпатка/Г2 2/кавказка/Г1 4/карпатка/Г2 1/кавказка/Г1 10/Крымская/Г1-4 3/кавказка/Г1 3/кавказка/Г1 6/карпатка/Г2
Ставропольский край	2017	3/не указана	2/карпатка/Г2 1/кавказка/Г1
Закарпатская обл. Украины	2016	2/карпатка	2/карпатка/Г2
Армения Наирийский район Ширакский р-н Гегаркуникская обл. Котайкская обл. Сюникская обл. Тавушская обл. Вайоцдзорская обл.	2017, 2019	1/не указана 1/не указана 4/не указана 7/не указана 2/не указана 1/не указана 1/не указана	1/кавказка/Г1-2 1/карпатка/Г2 4/кавказка/Г1 7/кавказка/Г1, Г1-3 2/кавказка/Г1 1/кавказка/Г1 1/кавказка/Г1
Киргизстан, Жалабатская обл.	2017	4/не указана	2/карпатка/Г2 2/кавказка/Г1, Г1-1
Таджикистан с. Хистевараз, Согдийская обл.	2014, 2016	4/не указана 4/не указана	4/карпатка/Г2-1 4/кавказка/Г1, Г1-1
Польша Mrozy Ceglow Ladzyn Minska Mazowieckiego Poreby Nowe Kobylanka	2018	4/карника 2/карника 2/итальянка 5/кавказка 1/итальянка 1/не указана 2/не указана 2/не указана	4/карпатка/Г2, Г2-1 1/кавказка/Г1 1/карпатка/Г2 2/карпатка/Г2 5/кавказка/Г1 1/карпатка/Г2 1/карпатка/Г2 2/карпатка/Г2-1 2/карпатка/Г2

для ПЦР 5xMasterMix (Диалат, Москва). Анализируемый фрагмент гена *COI* мтДНК составлял 680 пар нуклеотидов. Для амплификации данного участка были использованы пары праймеров для начального участка гена *COI* LCO1490 и HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). Реакцию проводили при следующих условиях: 94° – 3 мин (1 цикл); 94° – 1 мин, 45° – 1 мин, 72° – 1 мин (6 циклов); 94° – 1 мин, 55° – 1.5 мин, 72° – 1.5 мин (40 циклов); 72° – 6 мин (1 цикл). Продукт амплификации очищали методом осаждения раствором этилового спирта с добавлением 5 М ацетата натрия. Электрофорез и чтение нуклеотидных последовательностей продукта амплификации выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США) с использованием набора реактивов BigDye Terminatort kit 3.1 (Applied Biosystems) в ЦКП “Инструментальные методы в экологии” при ИПЭЭ РАН.

Обработку данных проводили с использованием пакетов программ MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021), Network ver. 4.6.1.1 (Bandelt *et al.*, 1999, ARLEQUIN ver. 3.5 (Excoffier, Lischer, 2011), BEAST ver. 2.4 (Bouckaert *et al.*, 2014) с использованием Строгих часов и модели видообразования (Yule, 1925)

Вновь полученные последовательности гена *COI* мтДНК образцов медоносной пчелы *A. m. carpathica* и *A. m. caucasica*, представленные отдельными гаплотипами, или образцы одних и тех же гаплотипов, но из разных мест сбора, депонированы в GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) под номерами OP890235–OP890259, а полученные нами ранее и используемые в данной работе под номерами MF100910–MF100926.

Для сравнительного анализа дополнительно из GenBank были взяты последовательности гомологичного участка мтДНК медоносной пчелы: *A. m. carpathica* (AP018403), *A. m. caucasica* (AP018404, KX819203, MN7141), *A. m. ligustica* (L06178, KX908209, M23409), а также рас *A. m. mellifera* (KY9268), *A. m. iberica* (MN5851) и трех видов рода *Apis*: *A. cerana* (GQ162109), *A. dorsata* (NC_037709), *A. florea* (NC_021401). Филогенетические деревья включают только отдельные гаплотипы, полученные нами для настоящего исследования и гаплотипы, взятые из ГенБанка для сравнения. Кроме того, из GenBank были взяты и проанализированы короткие последовательности, содержащие участок с SNP (Single Nucleotide Polymorphism, однонуклеотидные полиморфизмы (замены)), входящий в анализируемый участок гена *COI* мтДНК и специфический для *A. m. carpathica* (KY271917–KY271927) и *A. m. caucasica* (KY271890–KY271900).

Для построения медианной сети и дендрограмм использовали все полученные нами последовательности участка *COI* и последовательности гомологичного участка из GenBank.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из рис. 1 медианной сети видно, что большая часть полученных образцов распределилась между двумя гаплотипами, которые определяются образцами с породным статусом *A. m. caucasica* (гаплотип 1) и *A. m. carpathica* (гаплотип 2). Один из трех образцов *A. m. caucasica* из GenBank (KX819203) также имеет тот же гаплотип, что и полученные нами образцы с породным статусом *A. m. caucasica* (гаплотип 1). Следует отметить, что практически все образцы из Армении, не имеющие породного статуса, имеют гаплотип *A. m. caucasica* (гаплотип 1). Исключение составляют образцы из Ширакского района, расположенного на севере Армении, которые имеют гаплотип породного статуса *A. m. carpathica* (гаплотип 2). Кроме того, от гаплотипа со статусом породы *A. m. caucasica* (гаплотип 1) отходят 4 отдельных гаплотипа (1-1, 1-2, 1-3, 1-4), в том числе гаплотип (1-4) образцов крымской горной пчелы (Быкова и др, 2016, Сафонкин и др, 2019), остальные три гаплотипа представлены единичными образцами пчел с пасек Армении, Таджикистана и Киргизии. Гаплотип с породным статусом *A. m. carpathica* (гаплотип 2) включает также образцы из Польши, обозначенные в сборах как *A. m. carnica* и *A. m. ligustica*, и собранные в г. Цеглув (Ceglów), Ладзын (Ladzyn), Мрозы (Mrozy), и образцы неизвестной породы из г. Миньск-Мозовецки (Minska Mazowieckiego), Мазовецкого воеводства, с. Кобылянка (Kobyłanka) Малопольского воеводства. От этого же гаплотипа отходит гаплотип (Г2-1) образцов из Польши *A. m. carnica* из Мрозы и неизвестной породы из с. Poreby Nowe Мазовецкого воеводства, а также из выборки с одной из пасек Таджикистана. Как видно на медианной сети, образцы из Таджикистана неизвестной породы распределились между гаплотипами с разным породным статусом. Образцы *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* из GenBank также образуют на медианной сети отдельные гаплотипы. Причем, гаплотип *A. m. caucasica* из GenBank (AP018404, MN7141) дает начало гаплотипу 1 (с породным статусом *A. m. caucasica*), а также гаплотипу, представленному образцами из GenBank *A. m. carpathica* (AP018403) и *A. m. ligustica* (L06178, KX908209, M23409). *A. m. mellifera* (KY9268), *A. m. iberica* (MN5851) и три вида рода *Apis*: *A. cerana*, *A. florea*, *A. dorsata* образуют соответственно отдельные гаплотипы. Группа рас *A. mellifera* связана между собой двумя гипотетическими гаплотипами (медианными векторами), один из которых является общим для *A. m. mellifera* и *A. m. iberica*, другой дает начало *A. m. caucasica*, *A. m. carpathica*, *A. m. ligustica* (рис. 1).

Дендрограммы, построенные методами ближайшего связывания (Neighbor-Joining), максимального правдоподобия (Maximum Likelihood),

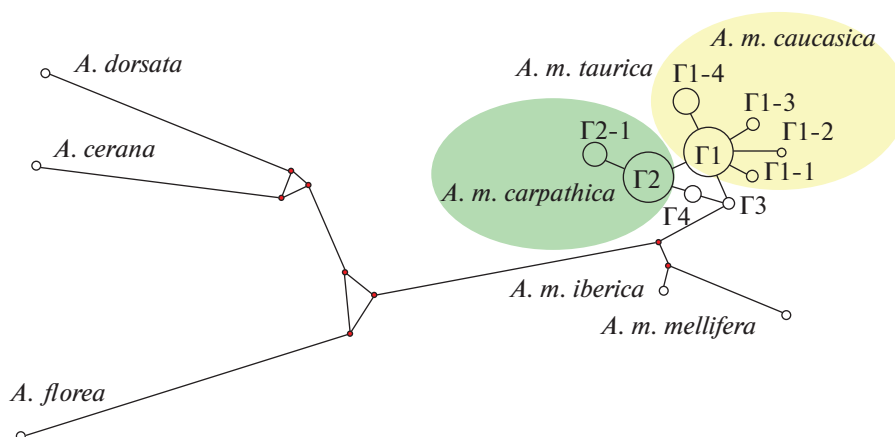


Рис. 1. Медианная сеть 3-х видов рода *Apis* и 6-ти рас *Apis mellifera*, построенная на основе нуклеотидных последовательностей участка *COI* мтДНК. Круги — отдельные гаплотипы. Г1, Г1-1 — Г1-4 — гаплотипы *A. m. caucasica*, Г2, Г2-1 — гаплотипы *A. m. carpathica*, Г3 — гаплотип *A. m. caucasica* (Генбанк MN714160, AP018404), Г4 — гаплотип *A. m. ligustica* (Генбанк L06178, KX908209, M23409), *A. m. carpathica* (Генбанк AP018403).

максимальной экономии (Maximim Parsimony) по нуклеотидным последовательностям гаплотипов *COI* мтДНК, совпадают в ключевых узлах. Группа рас *A. mellifera* объединена в общий кластер. При этом *A. m. mellifera* и *A. m. iberica* стоят отдельно от группы рас *A. m. ligustica*, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*. Такое распределение рас соответствует двум эволюционным линиям С и М соответственно. Гаплотип *A. m. caucasica*, представленный двумя образцами из GenBank на всех деревьях является объединяющим для остальных гаплотипов, включая *A. m. ligustica*, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica* (рис. 2).

Большее гаплотипическое разнообразие (H) у *A. m. caucasica* (0.551 ± 0.071) по сравнению с *A. m. carpathica* (0.371 ± 0.079) при низком нуклеотидном разнообразии (π) у обеих рас (0.001 ± 0.0008 , 0.0005 ± 0.0006 соответственно) обычно является результатом мутаций в течение достаточно длительного времени. Это приводит к увеличению гаплотипической изменчивости, однако недостаточного для накопления значительных различий между нуклеотидными последовательностями (Avice, 1994). Низкое и гаплотипическое, и нуклеотидное разнообразие характерно для исторически более молодых популяций (Avice, 1994).

Для уточнения времени появления и распространения рас *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* была построена дендрограмма на основе нуклеотидных последовательностей участка гена *COI* в программе BEAST (рис 3).

Исходя из времени дивергенции между видами *A. mellifera* и *A. cerana* 5.9–6 млн (Garneru *et al*, 1991; Cornuet, Garneru, 1991), рассчитанного на основе скорости эволюции мтДНК у видов рода *Apis*, предполагаемое по нашим расчетам время расхождения рас внутри *A. mellifera* составляет от

1.3 до 0.6 млн лет. При этом гаплотипы, относящиеся к расе *A. m. caucasica*, датируются более ранним временем происхождения (0.35–0.25 млн лет) по сравнению с *A. m. carpathica* (0.2–0.04 млн лет).

Согласно последним данным (Tihelka *et al.*, 2020) местом происхождения *Apis mellifera* скорее всего являлась Северная Африка и, возможно, регион Ближнего Востока. Один из предполагаемых пу-

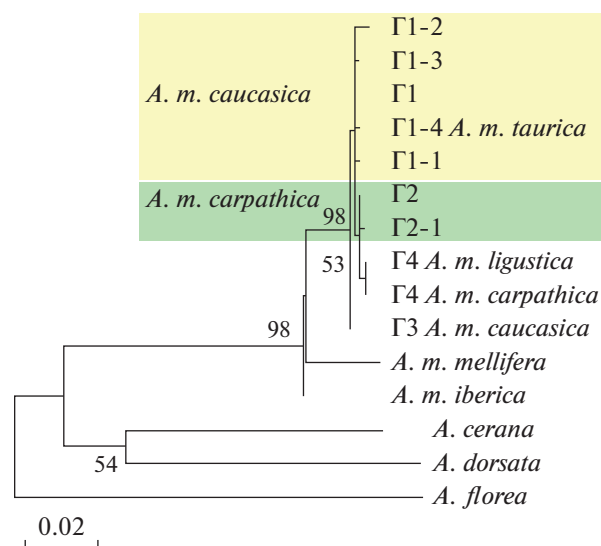


Рис. 2. Дендрограмма отношений 3-х видов рода *Apis* и 6-ти рас *Apis mellifera*, построенная на основе нуклеотидных последовательностей участка *COI* мтДНК методом максимального правдоподобия (ML). Г1, Г1-1 — Г1-4 — гаплотипы *A. m. caucasica*, Г2, Г2-1 — гаплотипы *A. m. carpathica*, Г3 — гаплотип *A. m. caucasica* (Генбанк MN714160, AP018404), Г4 — гаплотип *A. m. ligustica* (Генбанк L06178, KX908209, M23409) и *A. m. carpathica* (Генбанк AP018403).

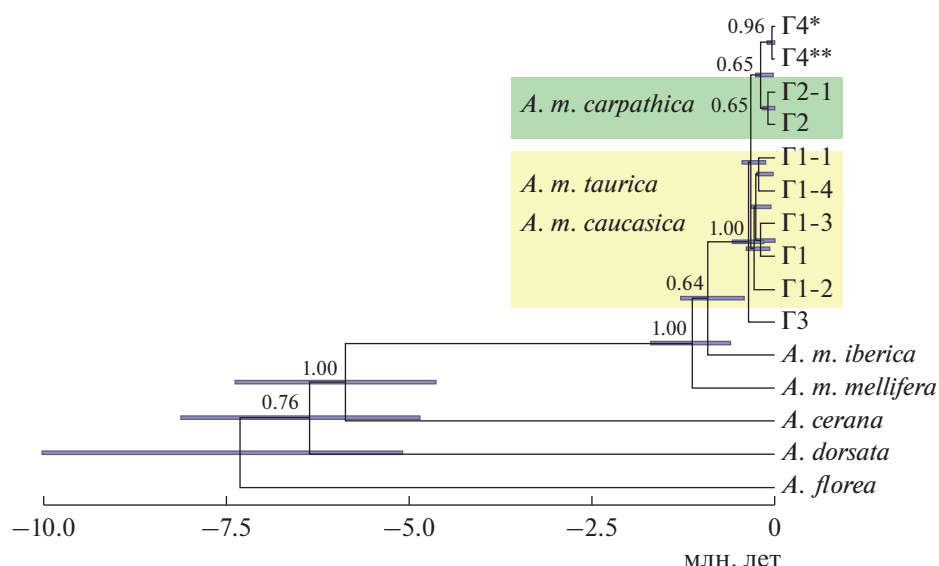


Рис. 3. Шкала времени дивергенции представителей рода *Apis*, построенная на основе фрагмента гена *COI* мтДНК в программе BEAST v. 2.4. Г4* – гаплотип *A. m. ligustica* (Генбанк L06178, KX908209, M23409), Г4** – *A. m. carpatica* (Генбанк AP018403).

тей проникновения в Европу пчел эволюционной линии С шел через Кавказ.

В ранневалдайское время произошло позднеплейстоценовое похолодание и оледенение, которое затронуло Кавказ и Карпаты. Это было последнее оледенение на Кавказе, которое датируется примерно 50—тыс. лет. Последнее четвертичное оледенение (поздневалдайское), датируемое 24—тыс. лет, охватило северо-западную часть Европы, включая современную территорию Польши, далее до стран Балтии, через Валдайскую возвышенность, до низовьев Северной Двины и Пинеги (Чочиа, Евдокимов, 1993) и, следовательно, в это время пчелы могли обитать только на юге Европы и на Кавказе.

Вторичное проникновение пчел линии С на остальную территорию Европы после окончания ледникового периода могло происходить из южной Европы. По мнению П.М. Комарова, проникновению пчел на Кавказ из центральных регионов западной Европы мешали степи. Поэтому автор считал аборигенных кавказских пчел древнее других европейских рас (Комаров, 1937). Более раннее время происхождения кавказской расы подтверждается и нашими данными.

По молекулярным данным *A. m. carpathica* отличается от *A. m. caucasica* по наличию SNP A/G в позиции 99 начального участка гена *COI* мтДНК размером 658 п.н. (Folmer *et al.*, 1994). То есть, последовательности *COI* демонстрируют стабильные SNP, типичные для этих рас (Syromyatnikov *et al.*, 2018). В нашем случае при длине сиквенсов 680 п.н. это позиция соответствует 110.

Наличие общего гаплотипа для образцов пчел из Польши *A. m. carpathica*, *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* для данного участка *COI* может свидетельствовать о несоответствии образцов породному статусу.

Таким образом, большинство образцов в нашей работе, распределившихся между гаплотипами с соответствующим SNP, относятся к двум расам *A. m. carpathica* и *A. m. caucasica*. Наличие отдельных гаплотипов, отходящих от двух основных может, с одной стороны, свидетельствовать о некотором разнообразии внутри рас. С другой стороны, один из гаплотипов, отходящий от основного гаплотипа *A. m. caucasica*, образован образцами пчел крымской горной породы (Быкова и др., 2016), которую крымские исследователи вслед за В.В. Алпатовым (Алпатов, 1948) по морфологическим признакам и биологии сравнивают с самостоятельной расой — *A. m. taurica* (Быкова и др., 2016). Стабильные различия в определенных нуклеотидных позициях могут свидетельствовать о начале формирования особых экотипов пчел, адаптированных к определенному региону, особенно в условиях предгорий и горных местностей.

Диапазон генетической дистанции (Jukes–Cantor) по мтДНК между подвидами насекомых в целом составляет 0.005–0.100 (Han *et al.*, 2016; Eimanifar *et al.*, 2017; Ilysov *et al.*, 2019). Однако генетическая дистанция может различаться у разных групп насекомых как по всей мтДНК, так и по отдельным генам. В литературе приводятся различные диапазоны генетической дистанции по гену *COI* мтДНК для разных групп насекомых, в том числе для разных семейств и родов Hymenoptera.

Таблица 2. Генетическая дистанция (Jukes–Cantor, Kimur 2-parameter) между гаплотипами образцов рас медоносной пчелы *A. mellifera*

	<i>A. m. caucasica</i>	<i>A. m. carpatica</i>	<i>A. m. ligustica</i>	Крымская пчела	<i>A. m. mellifera</i>	<i>A. m. iberica</i>	<i>A. m. syriaca</i>
<i>A. m. caucasica</i>		0.001–0.003 0.005*	0.003 0.005*	0.001	0.031–0.033	0.012–0.018	0.012–0.015*
<i>A. m. carpatica</i>			0.001 0.005*	0.003	0.031–0.033	0.013–0.017	0.012–0.015*
<i>A. m. ligustica</i>				0.004	0.031–0.033	0.013	0.012–0.015*
Крымская пчела					0.033	0.015	—

Примечание. * Из работы Ильясов и др., 2021.

Так, например, генетическая дистанция участка гена *COI* внутри видов *Vespa orientalis* и *Polistes bucharensis* составляет от 0.0 до 0.002 и от 0.0 до 0.005 соответственно, что по мнению авторов связано с различием в корме и географическими локалитетами (Abd-El-Samie *et al.*, 2018). В другой работе (Eimanifar *et al.*, 2017) было показано, что генетическая дистанция в семействе Apidae между подвидами, относящимся к разным эволюционным линиям, в среднем выше и может составлять 0.0047–0.0132 (*A. m. lamarckii* и *A. m. mellifera*), а между *A. m. lamarckii* и *A. m. intermissa*, которые находятся внутри одной эволюционной линии А – 0.0117.

Генетическая дистанция между гаплотипами образцов рас медоносной пчелы *A. mellifera* представлена в табл. 2.

В работе (Ильясов и др. 2021) генетическая дистанция, определенная авторами как 0.005, имеет отношение только к *A. m. caucasica*, *A. m. carpatica*, *A. m. ligustica*, тогда как генетическая дистанция между этими расами и *A. m. syriaca* из другой эволюционной линии Z, находится в диапазоне от 0.012 до 0.015. Исходя из выше изложенных данных, диапазон генетической дистанции по *COI* мтДНК в образцах, представленных в нашей работе, между *A. m. carpatica*, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* в большей мере соответствует внутривидовой изменчивости, что говорит о близости этих рас, относящихся к одной эволюционной линии С. Генетическая дистанция между *A. m. carpatica*, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* (линия С) и *A. m. mellifera*, *A. m. iberica*, которые относятся к другой эволюционной ветви (М), превосходит внутривидовую дистанцию по гену *COI*. Анализ генетической дистанции между гаплотипом крымской горной породы и *A. m. carpatica*, *A. m. caucasica* и *A. m. ligustica* (табл. 2) показывает тесную связь гаплотипа крымской горной породы с *A. m. caucasica*. Это указывает на возможное влияние генотипа аборигенной расы *A. m. taurica*, выделенной по морфометрическим признакам В.В. Алпатовым (1948), на формирование пчел крымской горной породы.

Вероятно, определение пород/рас, экотипов или подвигов медоносной пчелы может быть связано, в том числе с их эволюционной историей, так как степень дивергенции между подвидами/расами/ породами внутри одной эволюционной линии и между подвидами из разных линий различна (Arias, Sheppard, 1996). Дивергенция *A. mellifera* на основные эволюционные линии оценивалась некоторыми авторами от 0.33 до 1.35 млн лет (Cornuet, Garnery, 1991), что подтверждается и нашими данными при оценке времени дивергенции между линией М и С в 0.6 млн лет (рис. 3).

Различия в эволюции линий М и С могут быть связаны с экологической специализацией предковых форм пчел. Пчелы линии М адаптированы больше к обитанию в лесных массивах равнин. Пчелы линии С – в условиях предгорных и горных лугов, что способствовало их расселению с Кавказа на Крым, а через Турцию на Альпы и Карпаты.

Наличие отличающегося гаплотипа *A. m. carpatica* (AP018403) и одного из гаплотипов *A. m. caucasica* (AP018404) из Генбанка от гаплотипов аналогичных рас, представленных в нашей работе связано с нахождением в позиции 1828 полного генома мтДНК аденина А (Ilyasov *et al.*, 2019), тогда как во всех полученных нами образцах (при длине сиквенса 680 п.н. это позиция 4) и в одном сиквенсе (KX819203) из ГенБанка в этой позиции находится гуанин G, что ведет к замене аспарагина на аспарагиновую кислоту.

Следует отметить, что гаплотип *A. m. carpatica* из GenBank (AP018403) получен от пчел из пасек Майкопского региона Республики Адыгея (Научного отдела ППХ “Майкопское” – филиала ФГБНУ “ФНЦ пчеловодства”), где в последние годы проводятся селекционно-племенные работы по выведению линии карпатских пчел. Гаплотип *A. m. caucasica* GenBank (AP018404) получен из пасек Сочинского региона Краснодарского края, где занимаются разведением серой горной кавказской породы.

Наличие G вместо A (в позиции 4 при 680 п.н.) во всех полученных нами образцах может говорить об изменчивости пород относительно генетически “выверенных” линий. Однако, по нашему мнению, отличие наших образцов скорее связано с тем, что мы сиквенировали определенный участок гена *COI* мтДНК с использованием универсальных праймеров (Folmer *et al.*, 1994). Такая же замена присутствует в одном сиквенсе (KX819203) из Генбанка, который представлен тем же начальным участком гена *COI*. Остальные немногочисленные образцы данных пород из GenBank представлены или полным геномом мтДНК или участком *COI-COI* мтДНК с возможной ошибкой в определении нуклеотида в данной позиции.

Использование универсальных праймеров и подбор условий амплификации для участка гена *COI* мтДНК образцов медоносной пчелы позволили нам по наличию несинонимичного SNP G/A в позиции 4 (680 п.н.) отличить *A. m. carpathica* от другой близкой расы, *A. m. ligustica*, тогда как образцы *A. m. carpathica* и *A. m. ligustica* из ГенБанка по данному участку гена *COI* мтДНК объединены в один общий гаплотип (гаплотип 4).

Таким образом, результаты, полученные на основе анализа собственных данных по 94 сиквенсам участка гена *COI* мтДНК проб медоносной пчелы *A. mellifera* в сравнении с имеющимися данными из GenBank по представленным там расам *A. mellifera* с использованием универсальных праймеров позволили распределить выборки медоносных пчел из разных регионов между двумя основными гаплотипами, соответствующими двум расам: *A. m. carpathica* и *A. m. caucasica* и дифференцировать их от *A. m. ligustica*. *A. m. carpathica* и *A. m. caucasica* практически равномерно распространены на европейской территории России, в бывших республиках СССР Центральной Азии, на Крымском полуострове. В Польше преобладают пчелы *A. m. carpathica*, в то время как в Армении породное разнообразие пчел определяется пчелами *A. m. caucasica*.

Эволюция *A. mellifera* линии С происходила от пчел, близких к породному статусу *A. m. caucasica*, возможно сохраненному в районе Кавказских гор и обладающих большим гаплотипическим разнообразием. Послеледниковое расселение пчел привело к образованию рас *A. m. ligustica* и *A. m. carpathica*, с естественным распространением в условиях горных массивов Альп и Карпат. Близка к *A. m. caucasica* и выявленная группа пчел Крыма, возможно соответствующая породному статусу *A. m. taurica*.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Kamil Karaban, Institute of Biological Sciences, Cardinal Stefan Wyszyński University in Warsaw за предоставление материала из Польши и А.А. Яцук, Институт проблем экологии и эволюции РАН, за

сбор материала из Ставропольского края и Наиринского района Армении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Аллатов В.В. Породы медоносной пчелы и их использование в сельском хозяйстве. М., 1948.
- Быкова Т.О., Триселева Т.А., Ивашов А.В., Сафонкин А.Ф. К оценке морфогенетического разнообразия медоносной пчелы *Apis mellifera* L. из горно-лесной зоны Крыма // Изв. РАН. Сер. биол. 2016. № 6. С. 625–630.
<https://doi.org/10.7868/S0002332916060059>
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А. Г. Макро- и микроэволюция медоносной пчелы *Apis mellifera* // Биомика. 2017а. Т. 9. № 2. С. 60–70.
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Основные методы идентификации подвидов пчел *Apis mellifera* // Биомика. 2017б. Т. 9. № 2. С. 71–82.
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Современные методы оценки таксономической принадлежности семей пчел // Экологическая генетика. 2017в. Т. 15. № 4. С. 41–51.
<https://doi.org/10.17816/ecogen15441-51>
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Три сценария эволюции подвидов пчелы *Apis mellifera* // Пчеловодство. 2018. № 1. С. 16–18.
- Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Митохондриальная ДНК в изучении популяций пчел на Урале // Материалы межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока. Новосибирск, 2006. С. 72–74.
- Ильясов Р.А., Хан Г.Ю., Ли М.Л., Ким К.В., Парк Д.Х., Такахаши Д.И., Кwon X.B., Николенко А.Г. Филогенетические отношения подвидов пчел *Apis mellifera caucasica* и *Apis mellifera carpathica* по последовательностям митохондриального генома // Генетика. 2021. Т. 57. № 6. С. 697–710.
<https://doi.org/10.31857/S0016675821060047>
- Комаров П.М. Разведение пчел. М.: Сельхозгиз, 1937. 312 с.
- Михайлов А.С. К биометрической характеристике кавказской горной серой пчелы // Пчеловодный мир. 1927. № 3. С. 84–86.
- Сафонкин А.Ф., Триселева Т.А., Быкова Т.О. Внутривидовое разнообразие карпатской расы медоносной пчелы *Apis mellifera carpathica* // Изв. РАН. Сер. биол. 2019. № 5. С. 524–532.
<https://doi.org/10.1134/S0002332919050096>
- Чочиа Н.Г., Евдокимов С.П. Палеогеография позднего кайнозоя Восточной Европы и Западной Сибири (ледниковая и ледово-морская концепции) / Под общ. ред. Н.Г. Чочиа. Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 1993. 248 с.
- Abd-El-Samie E.M., Elkafrawy I., Osama M., Ageez A. Molecular phylogeny and identification of the Egyptian wasps (Hymenoptera: Vespidae) based on COI mitochondrial gene sequences // Egypt. J. Biol. Pest Con-

- trol. 2018. V. 28. P. 36.
<https://doi.org/10.1186/s41938-018-0038-z>
- 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. № 3. P. 557–566.
<https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0050>
- Avise J.C. Molecular markers, natural history and evolution. N.Y.: Chapman and Hall. 1994. 511 p.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2381-9>
- Bandelt H.J., Foster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Bouckaert R., Heled J., Kuhnert D., Vaughan T., Wu C.H., Xie D., Suchard M.A., Rambaut A., Drummond A.J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis // PLoS Computational Biology. 2014. V. 10. № 4. P. e1003537.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
- Bouga M., Alaux C., Bienkowska M., Büchler R., Carreck N.L., Cauia E., Chlebo R., Dahle B., Dall'Olio R., De la Rúa P., Gregorc A., Ivanova E., Kence A., Kence M., Kezic N., Kiprijanovska H., Kozmus P., Kryger P., Le Conte Y., Lodesani M., Murilhas A.M., Siceanu A., Soland G., Uzunov A., Wilde J. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping // J. Apic. Res. 2011. V. 50. № 1. P. 51–84.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.50.1.06>
- Cornuet J.M., Garnery L. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications // Apidologie. 1991. V. 22. P. 627–642.
<https://doi.org/10.1051/apido:19910606>
- Eimanifar A., Kimball R.T., Braun E.L., Moustafa D.M., Haddad N., Fuchs S., Grünwald B., Ellis J.D. The complete mitochondrial genome of the Egyptian honey bee, *Apis mellifera lamarckii* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA Part B. 2017. V. 2. № 1. P. 270–272.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1325343>
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Mol. Ecol. Res. 2011. V. 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Mol. Mar. Biol. Biotech. 1994. V. 3. № 5. P. 294–299.
- Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J.M. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*) // Mol. Ecol. 2000. V. 9. № 7. P. 907–921.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.00945.x>
- Garnery L., Vautrin D., Cornuet J. M., Solignac M. Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data // Apidologie 1991. V. 22. P. 87–92.
<https://doi.org/10.1051/apido:19910111>
- Hajibabaei M., Singer G.A., Hebert P.D.N., Hickey D.A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics // Tr. Genet. 2007. V. 23. № 4. P. 167–172.
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.02.001>
- Han T., Lee W., Lee S., Park I.G., Park H. Reassessment of species diversity of the subfamily Denticollinae (Coleoptera: Elateridae) through DNA barcoding // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. P. e0148602.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148602>
- Ilyasov R., Nikolenko A., Tuktarov V., Goto K., Takahashi J.-I., Kwon H.W. Comparative analysis of mitochondrial genomes of the honey bee subspecies *A. m. caucasica* and *A. m. carpathica* and refinement of their evolutionary lineages // J. Apicultural Res. 2019. V. 58. № 4. P. 567–579.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1622320>
- Ilyasov R.A., Lee M.-L., Takahashi J.-I., Kwon H.W., Nikolenko A.G. A revision of subspecies structure of western honey bee *Apis mellifera* // Saudi J. Biological Sciences. 2020. V. 27. P. 3615–3621.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.001>
- Kandemir I., Ozkan A., Fuchs S. Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach // Apidologie. 2011. V. 42. № 5. P. 618–627.
<https://doi.org/10.1007/s13592-011-0063-3>
- Kukrer M., Kence M., Kence A. Genetic evidences for the impact of anthropogenic factors on honey bee diversity // BioRxiv. 2017. V. 1. P. 1–28.
<https://doi.org/10.1101/154195>
- Maa T.C. An inquiry into the systematics of the tribus Apidini or honey bees (Himenoptera) // Treubia. 1953. V. 21. P. 525–640.
- Meyer C.P., Paulay G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling // PLoS Biology. 2006. V. 3. № 12. P. 2229–2238.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422>
- Pentek–Zakar E., Oleksa A., Borowik T., Kusza S. Population structure of honey bees in the Carpathian Basin (Hungary) confirms introgression from surrounding subspecies // Ecol. Evol. 2015. V. 5(23). P. 5456–5467.
<https://doi.org/10.1002/ece3.1781>
- Rubinoff D., Cameron S., Will K. A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification // J. Hered. 2006. V. 97. № 6. P. 581–594.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esl036>
- Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees. Berlin: Springer Verlag, 1988. 284 p.
- Ruttner F. Naturgeschichte der Honigbienen // Ehrenwirth Verlag, Munich. Grenoble; Bukarest: Apimondia, 1992. S. 380–383.
- Smith D.R. Mitochondrial DNA and Honey Bee Biogeography / In Diversity in the genus *Apis*. Smith D.R. editor. Boulder, CO: Westview Press; 1991. P. 131–176.
- Smith D.R. Genetic diversity in Turkish honey bees // Uludag Arıcılık Dergisi. 2002. V. 2. № 3. P. 10–17.
- Syromyatnikov M.Y., Borodachev A.V., Kokina A.V., Popov V.N. A molecular method for the identification of honey bee

- subspecies used by beekeepers in Russia // *Insects*. 2018. V. 9. № 1. E10.
<https://doi.org/10.3390/insects9010010>
- Tamura K., Stecher G., and Sudhir Kumar / MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021. V. 38(7). P. 3022–3027.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tihelka E., Cai Ch., Pisani D., Donoghue Ph.C.J. Mitochondrial genomes illuminate the evolutionary history of the Western honey bee (*Apis mellifera*) *Scientific Reports*. 2020. V. 10. P. 14515.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-71393-0>
- Yule G.U. A mathematical theory of evolution, based on the conclusions of Dr. JC Willis, FRS // *Philosophical Transactions of the Royal Society. B. Biological Sciences*. 1925. V. 213. P. 21–87.
<https://doi.org/10.1098/rstb.1925.0002>

Intrabreed Diversity and Relationships between Races of Honey Bee *Apis mellifera carpathica* and *Apis mellifera caucasica*

T. A. Triseleva^{1, #}, A. F. Safonkin¹, T. O. Bykova², and M. J. Rukhkyan³

¹ Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp., 33, Moscow, 119071 Russia

² Vernadsky Crimean Federal University, prosp. Akademika Vernadskogo, 4, Simferopol, 295007 Russia

³ Scientific Center of Zoology and Hydroecology, National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Paruyr Sevaki St., 7, Yerevan, 0014 Armenia

[#]e-mail: triseleva@yandex.ru

Based on the analysis of 94 sequences of the mtDNA *COI* gene, the intrabreed diversity and evolutionary relationships of bees from Russia, Ukraine, Armenia, Kyrgyzstan, Tajikistan, and Poland were studied. We revealed two main haplotypes corresponding to the races *A. m. carpathica* and *A. m. caucasica*, common in the studied regions. However, in Armenia bees of the Caucasian race predominate, and in Poland – Carpathian. *A. m. caucasica* has higher haplotype diversity: one of its haplotypes is formed by samples of bees from the Crimean mountain breed, possibly an independent race *A. m. taurica*. There are 2 clusters on the phylogenetic tree: one cluster includes *A. m. mellifera* and *A. m. iberica* (evolutionary line M), the other (line C) – *A. m. ligustica*, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*. Haplotypes of *A. m. caucasica* have more substitutions per site, indicating their earlier origin compared to *A. m. ligustica* and *A. m. carpathica*. According to the time of divergence of *A. mellifera* and *A. cerana* at 6 Ma, the divergence of all races of line C is estimated from 1.3 to 0.6 Ma; races *A. m. caucasica* 0.35–0.25 million, *A. m. carpathica* – 0.2–0.04 million. When using universal primers with optimization of amplification conditions for the mtDNA *COI* gene region, a nonsynonymous G/A SNP was detected in position 4 (680 bp) which can be used to identify *A. m. carpathica* from *A. m. ligustica*.

Keywords: honey bee, *A. m. carpathica*, *A. m. caucasica*, bee phylogeny, *COI* mtDNA