ГЕНЕТИКА, 2025, том 61, № 6, с. 47–57

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.174:595.799

ПОЛИМОРФИЗМ ПЯТИ ЭКЗОНОВ ГЕНА *vtg Apis cerana* В ПОПУЛЯЦИЯХ РОССИИ, ЮЖНОЙ КОРЕИ И ВЬЕТНАМА

© 2025 г. А. К. Кинзикеев[1, *], Р. А. Ильясов[2], Д. В. Богуславский[2], А. Ю. Ильясова[2], Л. Р. Гайфуллина[1], В. Н. Саттаров[3], Е. С. Салтыкова[1]

[1] *Институт биохимии и генетики, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия*

[2] *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, Москва, 119334 Россия*

[3] *Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, Уфа, 450077 Россия*

**e-mail: kinzikeev@bk.ru*

Поступила в редакцию 02.09.2024 г.
После доработки 05.02.2025 г.
Принята к публикации 10.02.2025 г.

Самыми известными представителями семейства Apidae являются медоносная пчела *Apis mellifera* и восковая пчела *Apis cerana*. По сравнению с медоносной пчелой *A. cerana* несколько меньше по размеру, хотя и схожа с ней. Восковая пчела обитает в умеренной и тропической Азии, распространена от Афганистана до Корейского полуострова и Японии, на севере – в предгорьях Гималаев, а также на востоке России и на юг через Индонезию. Изучение адаптации пчел к изменяющейся среде является фундаментальным вопросом в эволюционной биологии и имеет важное значение для защиты видов в условиях изменения климата. В данном исследовании было выполнено секвенирование пяти экзонов (с 3-го по 7-й) гена вителлогенина *vtg* с целью изучения таксономических отношений отдельных популяций и подвидов *A. cerana*. Наши предыдущие исследования генов дефензина 1 и 2 (*def1* и *def2*) выявили своеобразие популяции *A. cerana* во Вьетнаме, вероятно, из-за географической изоляции этой популяции. В настоящем исследовании мы подтверждаем это предположение на основе анализа полиморфизма гена *vtg*, который кодирует белок, вовлеченный в генетический контроль иммунитета, овогенеза и продолжительности жизни. Различия в структуре белка могут иметь селективное значение для локальных популяций. Ген *vtg* также участвует в адаптации пчел к холодному климату. Считается, что выживание зимой долгоживущих поколений рабочих пчел связано в том числе с увеличением способности накапливать вителлогенин, что может определять различия в структуре белка у пчел, обитающих в различных условиях.

Ключевые слова: *Apis cerana*, восковая пчела, подвиды, таксономия, вителлогенин.

DOI: 10.31857/S0016675825060042 **EDN:** SWOCKA

Азиатская восковая пчела *Apis cerana* Fabricius, 1793 встречается в Азии, от России до Индонезии и от Японии до Афганистана. Подобно европейской медоносной пчеле *Apis mellifera*, *A. cerana* в ходе эволюции разделилась на многочисленные подвиды и экотипы, которые адаптировались к широкому диапазону климатических условий [1].

Вид *A. cerana* подразделен на восемь подвидов: *A. c. cerana*, который распространен в Афганистане, Пакистане, северных частях Китая, Индии и Вьетнама; *A. c. heimifeng* встречается в высокогорьях Центрального Китая; *A. c. indica*, обитающий в Южной Индии, на Шри-Ланке и в Бангладеше; *A. c. japonica* встречается в Японии; *A. c. javana*, распространенный от о-ва Ява до Восточного Тимора; *A. c. johni*, обитающий на о-ве Суматра; *A. c. nuluensis*, который встречается на о-ве Борнео, и *A. c. skorikovi*, обитающий на центральных и восточных склонах Гималайских гор [2].

Все подвиды *A. cerana* используются для производства меда и опыления дикорастущих растений, а также сельскохозяйственных культур. Обобщение всех имеющихся данных на основании морфологических и молекулярных методов исследований позволяет описать современную таксономию восточной пчелы *A. cerana* как состоящую, предположительно, из 22 подвидов, большая часть которых распространена на территории материкового Китая. Все подвиды *A. cerana* можно разделить на три группы: северо-восточную (4 подвида),

средне-восточную (12 подвидов) и юго-восточную (6 подвидов) [3]. Однако структура популяций *A. cerana* еще недостаточно изучена, и ее определение является важной задачей как для науки, так и для пчеловодства [4].

Используя анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей фрагментов митохондриальной и ядерной ДНК в сочетании с методами морфометрии, в Северо-Восточной Азии были описаны два новых подвида: *A. c. koreana*, обитающий на Корейском полуострове [5], и *A. c. ussuriensis*, встречающийся на Дальнем Востоке России [6]. *A. c. ussuriensis* является самым северным подвидом восточной медоносной пчелы, встречающимся только в дикой форме. Генетические исследования этого подвида представляют большой интерес как для науки, так и для пчеловодства, поскольку все его адаптивные признаки сформировались под влиянием природной среды без вмешательства человека.

Одним из важнейших элементов иммунитета медоносных пчел являются не только антимикробные пептиды, но и белок вителлогенин [7]. Этот гликолипопротеин – предшественник липопротеинов и фосфопротеинов яичного желтка, синтезируется в жировом теле и поступает в гемолимфу. Вителлогенин может связываться с некоторыми элементами бактериальной оболочки и подавлять их активность. Этот белок играет важную роль в механизме адаптивного иммунитета пчел. Кроме того, вителлогенины насекомых участвуют в транспорте сахаров, липидов, фосфатов, витаминов и гормонов [8].

В настоящем исследовании мы провели молекулярно-генетический анализ нуклеотидной изменчивости гена вителлогенина (*vtg*) у подвидов *A. cerana*, обитающих на полуостровах и материке. Это исследование направлено на понимание механизмов адаптации популяций, ареалы обитания которых находятся в различных климатических условиях. Определение филогенетических взаимоотношений этих популяций может помочь в понимании механизмов адаптации к различным условиям обитания и географического расселения подвидов *A. cerana*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Географические точки сбора образцов пчел представлены на рис. 1 и в табл. 1. Особый интерес представляют исследования популяций *A. cerana* на островах и полуостровах из-за различных климатических условий [9]. В связи с этим были отобраны образцы *A. cerana* из Корейского полуострова, из Вьетнама (п-ов Индокитай) и с Дальнего Востока России. Границы ареалов выделяемых популяций *A. cerana* охватывают три региона. Данные об образцах и их географических координатах представлены в табл. 1. Эти регионы были выбраны для отражения различий в климатических условиях и демонстрации дивергенции в популяциях *A. cerana*.

Живые рабочие пчелы фиксировались в 96%-ном этаноле и хранились при температуре –30°C. ДНК выделяли из мышц торакса с использованием набора GeneJet (Thermo Scientific, США). Качество и количество выделенной ДНК анализировали на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo, США).

ПЦР-анализ проводили в термоциклере BIO-RAD T100. Режим ПЦР включал следующие этапы: 5 мин при 94°C, затем 30 циклов, состоящих из денатурации в течение 30 с при 94°C, отжига в течение 30 с при 54.5°C и элонгации в течение 60 с при 72°C. В конце проводилась финальная элонгация в течение 7 мин при 72°C. Для амплификации экзонов гена vtg использовались праймеры, представленные в табл. 2 и описанные в работе C. Kent с соавт. [10].

Секвенирование проводили методом Сэнгера в ООО «Синтол» (Москва). Последовательности фрагментов ДНК были отредактированы в программе Unipro UGENE [11] и выровнены на референсные последовательности генов с помощью MEGA X, используя алгоритм MUSCLE со стандартными параметрами. Филогенетические деревья были построены с использованием программы MEGA X [12].

Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей экзонов 3–7 гена *vtg Apis cerana* было построено методом ближайшего соседа (NJ) на основе модели замен по Джуксу–Кантору, с использованием 50 000 бутстрэп-репликаций в программе CLC Genomics Workbench 24 [13]. Аналогично филогенетическое дерево аминокислотных последовательностей также было построено методом ближайшего соседа (NJ) с использованием 50 000 бутстрэп-репликаций в CLC Genomics Workbench 24.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ген вителлогенина *vtg* у *A. cerana* состоит из семи экзонов. В результате ПЦР-амплификации гена *vtg* были получены фрагменты экзонов с третьего по седьмой, общей длиной 3580 пн, содержащие 60 полиморфных сайтов. Последовательности экзонов гена *vtg A. cerana* депонированы в GenBank под следующими номерами: экзон 3 – OK625992–OK626033, экзон 4 – OK626034–OK626077, экзон 5 – OK626078–OK626118, экзон 6 – OK626119–OK626164, экзон 7 – OK626165–OK626210.

На основании полученных данных была рассчитана частота встречаемости аллельных вариантов гена *vtg* в различных географических частях ареала *A. cerana* (рис. 2). Изученные популяции *A. cerana*

Рис. 1. Точки отбора образцов пчел *A. cerana* (1–14) в России, Южной Корее и Вьетнаме. Детализация мест отбора образцов пчел представлена в табл. 1.

достоверно различаются по частоте встречаемости полиморфных вариантов экзонов гена *vtg*, что свидетельствует о генетической вариабельности этих популяций.

В общей выборке было выявлено 16 полиморфных сайтов, из которых в популяции Вьетнама все оказались мономорфными. Это может указывать на адаптивное значение аллелей гена *vtg* у популяции *A. cerana* во Вьетнаме.

В четвертом экзоне гена *vtg* образцов из Вьетнама в пяти сайтах были обнаружены замены G на A на коротком участке длиной 47 нуклеотидов. Это может быть специфичным маркером пчел данной территории.

Таблица 1. Место и дата сбора исследуемых образцов *Apis cerana* из Южной Кореи, России и Вьетнама

Место сбора	Координаты места сбора	Дата сбора	Обозначение на рисунке 1	Маркировка образца
Южная Корея, (collected by R. Ilyasov) Ёнчхон (Yeoncheon) Кёнгидо (Gyenggi-do) Ёнчугун Гуннам-мён (Yeonchugun Gunnam-myeon)	38.050000, 127.040000 38.022268, 127.083331 37.496900, 127.257000 38.074434, 127.037807	10.05.2019	1 2 3 4	1AC–3AC
Южная Корея, Чхунджу (Choong Ju) collected by R.Ilyasov	36.977970, 128.003397	2019	5	4AC–8AC
Приморский край, Хасанский р-н, д. Ромашка	42.853176, 131.296369	30.03.2005	6	14AC–18AC
Приморский край, Хасанский р-н, с. Овчинниково	43.233092, 131.385862	01.06.2003	7	19AC
Приморский край, Хасанский р-н, заповедник Кедровая Падь	43.101567, 131.490463	29.03.2006	8	20AC, 21AC
Приморский край, Владивосток, Академгородок	43.185648, 131.943308	15.05.2010	9	22AC
Приморский край, п. Барабаш	43.175553, 131.491430	01.06.2003	10	23AC
Южная Корея, Инчхонский национальный ун-т	37.379151, 126.625657	2015/2018	14	24AC–28AC
Приморский край, Владивосток	43.181329, 132.019373	2019	11	29AC–34AC
Южная Корея (collected by O. Frunze), Инчхонский национальный ун-т	37.379151, 126.625657	17.08.21	14	35AC–37AC
Вьетнам, Тхатьтхат (Thach That)	21.126000, 105.522600	17.08.21	12	38AC, 39AC, 41AC, 42AC, 44AC, 46AC, 47AC – 51AC
Вьетнам, Хоа Бин (Hoa Binh)	20.594700, 105.551000	17.08.21	13	40AC, 43AC, 45AC

Таблица 2. Праймеры для ПЦР гена *vtg Apis cerana* из [10]

Экзон гена *vtg*	Последовательности праймеров	Размер ПЦР фрагмента, пн
VG-E3	F: 5'-CCTTTCGATCCATTCCTTGA-3' R: 5'-GTCAAAACGGATTGGTGCTT-3'	679
VG-E4	F: 5'-TCGAAGGGGAAGAATTTCAA-3' R: 5'-ACGAGCAATTCCTCAACACC-3'	840
VG-E5	F: 5'-GTCGGACAATTTCACGTCCT-3' R: 5'-GTTCGAGCATCGACACTTCA-3'	1177
VG-E6	F: 5'-AGAGCCAGGGATACGTCAAA-3' R: 5'-GAGTCATCTCGAGGCTCACC-3'	406
VG-E7	F: 5'-TTCTGGCTGAGGTCAGGATT-3' R: 5'-AATTTCGACCACGACTCGAC-3'	445

Из филогенетического дерева, построенного на основе полученных нуклеотидных последовательностей, видно, что полиморфизм гена *vtg* связан с географической изоляцией *A. cerana* в Южной Корее, Вьетнаме и на Дальнем Востоке (рис. 3). Кластеры, выделенные на дендрограмме, отражают степень генетического сходства между популяциями и демонстрируют влияние эволюционных процессов, таких как мутации, генетический дрейф и изоляция.

Использование образца *A. mellifera* в качестве внешней группы (outgroup) позволяет зафиксировать корень дендрограммы и определить направление эволюционных изменений. Это также свидетельствует о наличии генетической структуры, сформированной в результате пространственной изоляции или локальной адаптации. Кластеры, характеризующиеся близостью последовательностей, принадлежат популяциям с недавним общим прошлым.

Сравнение с *A. mellifera* позволяет выделить консервативные участки, которые указывают на функциональную важность белков. Эти данные подтверждают глубокие эволюционные различия между видами *A. cerana* и *A. mellifera*. Дендрограмма демонстрирует влияние отбора на уровне белков, выделяя функционально важные изменения. Дивергенция между видами *A. cerana* и *A. mellifera* видна на значительной дистанции, соответствующей межвидовым различиям. Дендрограмма отражает непосредственную нуклеотидную изменчивость, что позволяет увидеть больше деталей о точечных мутациях и внутривидовой дивергенции. Она также показывает сохранение функционально значимых участков белков, поддерживаемых стабилизирующим отбором. Различия между последовательностями проявляются в менее консервативных регионах.

Аминокислотные кластеры могут демонстрировать более низкий уровень изменчивости внутри популяций *A. cerana* по сравнению с ДНК, поскольку изменения на уровне нуклеотидов могут быть нейтральными (синонимичными). На основе данных об изменчивости продуктов концептуальной трансляции экзонов 3–7 *A. cerana* была построена дендрограмма. Кладистический анализ изменчивости подтверждает выводы, сделанные на основании кладистического анализа изменчивости нуклеотидных последовательностей тех же экзонов, представленного на рис. 3. Анализ показывает уникальность генетической структуры популяции *A. cerana* на территории Вьетнама.

Помимо выделения вьетнамской популяции в отдельную ветвь на филогенетическом дереве, наблюдается генетический полиморфизм, который отличает ее от других популяций пчел. В некоторых участках экзонов гена *vtg* у пчел из Вьетнама отсутствуют полиморфные варианты, обнаруженные в образцах пчел из России и Южной Кореи. Из 60 исследованных полиморфных сайтов 13 (21.67%) не имели полиморфных вариантов, которые присутствуют в других исследованных популяциях и в последовательностях, депонированных в GenBank.

Пчелы из Вьетнама характеризуются наличием специфичных аллельных форм, идентифицированных только на данной территории: VG4 – 2 аллеля из 23, VG5 – 4 аллеля из 16, VG7 – 3 аллеля из 10. В итоге это составляет 9 аллелей из 49, или 18.37%.

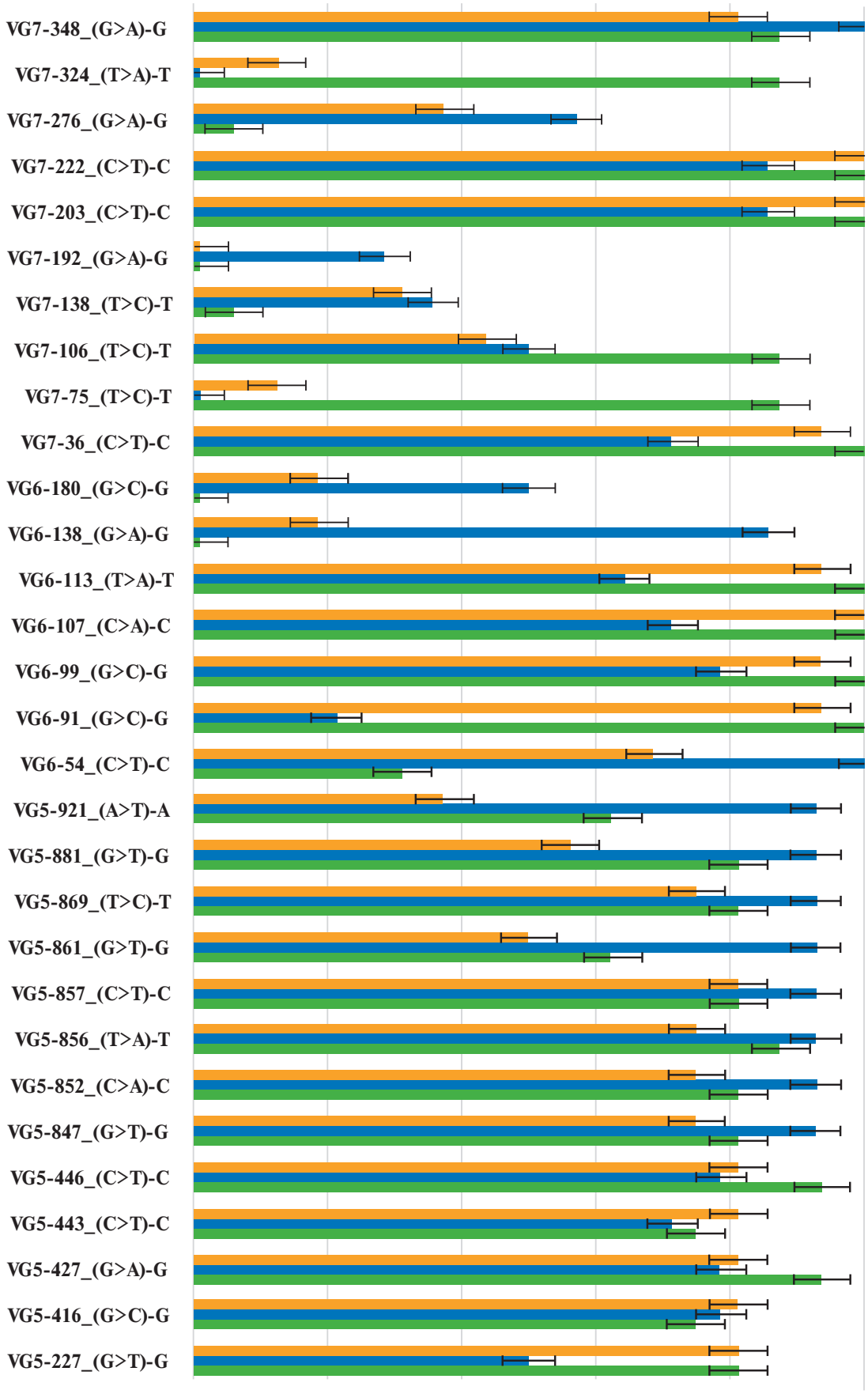
В третьем экзоне *vtg* аминокислотные замены не зарегистрированы. В четвертом экзоне в позиции 77 во всех популяциях отмечена замена глицина на серин. В позиции 178 происходит замена аминокислоты метионина (неполярная) на треонин (полярная незаряженная). В позиции 104 в образцах из вьетнамской популяции встречается лизин (положительно заряженная), который заменяет глутаминовую кислоту (отрицательно заряженная). Также в позиции 119 наблюдаются глицин и серин, а в позиции 125 – изолейцин (неполярная) и треонин (полярная).

В пятом экзоне *vtg* в позиции 386 во всех популяциях, кроме Вьетнама, зарегистрирована замена валином, который заменяет глицин (полярная). В позиции 389 изолейцин (неполярная) заменяет глицин, а в позиции 397 происходит замена гистидина (положительно заряженная) на глутамин (полярная незаряженная). У всех популяций, кроме Южной Кореи, в позиции 175 наблюдается замена аспарагина (незаряженная) на лизин (положительно заряженная). В популяциях Вьетнама в позиции 136 встречается пролин (незаряженная), который заменяет гистидин (положительно заряженная).

В образцах из Южной Кореи и Вьетнама в шестом экзоне *vtg* наблюдаются следующие замены: в позиции 33 — цистеин (полярная незаряженная). на триптофан (неполярная); в позиции 40 – лизин (положительно заряженная) на метионин (неполярная); в позиции 62 – аргинин (полярная положительно заряженная) на серин (полярная незаряженная).

У пчел из вьетнамской популяции *A. cerana* фиксируются замены треонина (незаряженная) на лизин (положительно заряженная) в позиции 42, пролина (неполярная) на серин (полярная) в позиции 44, аспарагина (незаряженная) на лизин (положительно заряженная) в позиции 52, а также пролина (неполярная) на серин (незаряженная) в позиции 58.

Кроме того, в седьмом экзоне у пчел из вьетнамской популяции зарегистрированы замены лейцина (неполярная) на серин (полярная) в позиции 85 относительно референсной последовательности гена *vtg A. cerana* (LOC108000069), (GenBank ID: NM_001328484).


VG7-348_(G>A)-G
VG7-324_(T>A)-T
VG7-276_(G>A)-G
VG7-222_(C>T)-C
VG7-203_(C>T)-C
VG7-192_(G>A)-G
VG7-138_(T>C)-T
VG7-106_(T>C)-T
VG7-75_(T>C)-T
VG7-36_(C>T)-C
VG6-180_(G>C)-G
VG6-138_(G>A)-G
VG6-113_(T>A)-T
VG6-107_(C>A)-C
VG6-99_(G>C)-G
VG6-91_(G>C)-G
VG6-54_(C>T)-C
VG5-921_(A>T)-A
VG5-881_(G>T)-G
VG5-869_(T>C)-T
VG5-861_(G>T)-G
VG5-857_(C>T)-C
VG5-856_(T>A)-T
VG5-852_(C>A)-C
VG5-847_(G>T)-G
VG5-446_(C>T)-C
VG5-443_(C>T)-C
VG5-427_(G>A)-G
VG5-416_(G>C)-G
VG5-227_(G>T)-G

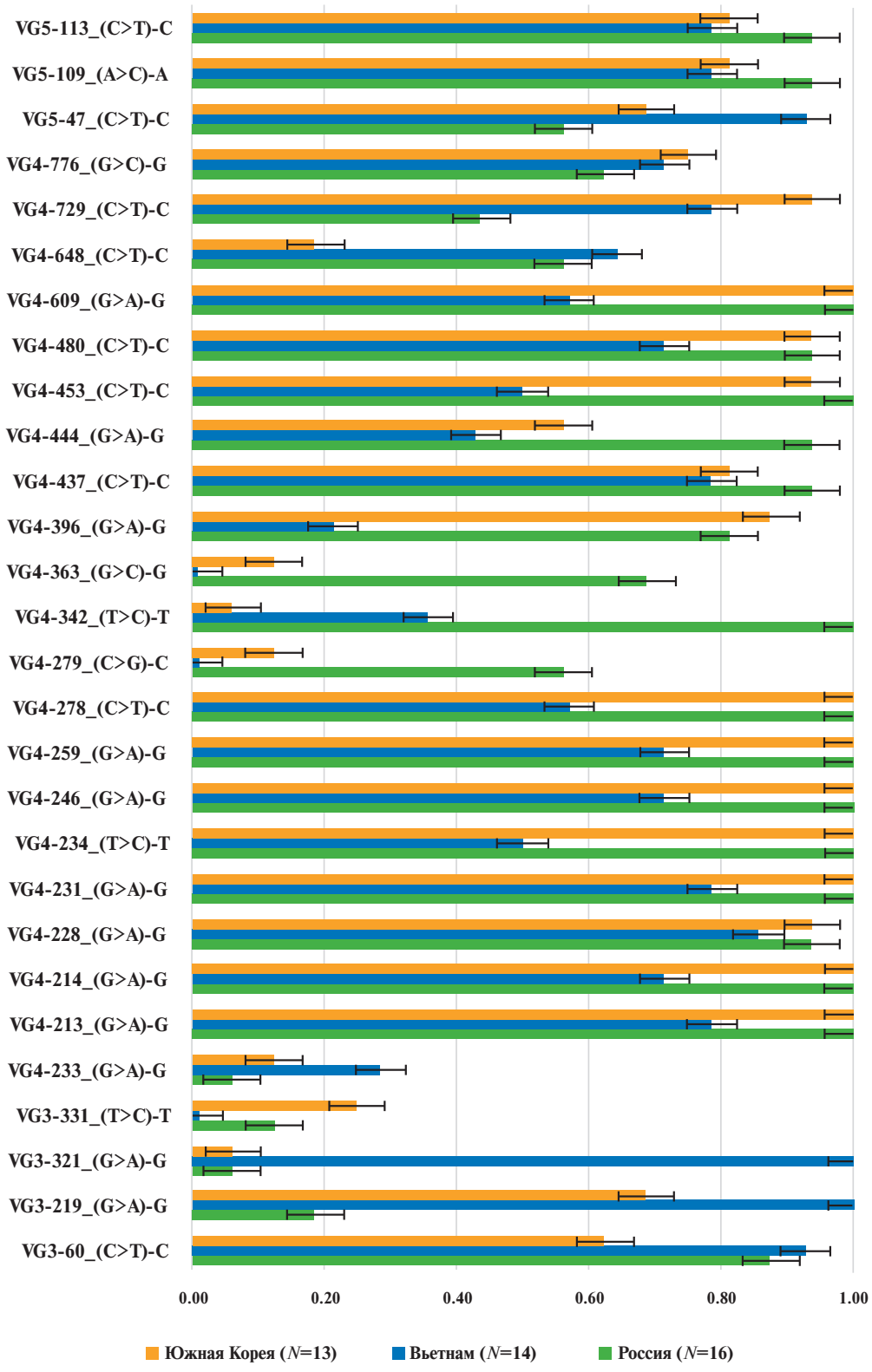


Рис. 2. Частота встречаемости полиморфных вариантов нуклеотидов в последовательностях экзонов 3–7 гена *vtg* у исследуемых образцов *Apis cerana*. Цветовая кодировка: синий – Южная Корея, красный – Вьетнам, зеленый – Россия. Нумерация нуклеотидов основана на референсной последовательности гена *vtg* (GenBank ID: NM_001328484.1). Первые три символа перед дефисом обозначают номер экзона, цифры указывают номер нуклеотида, буквы в скобках обозначают нуклеотидную замену, а последняя буква представляет референсную последовательность.

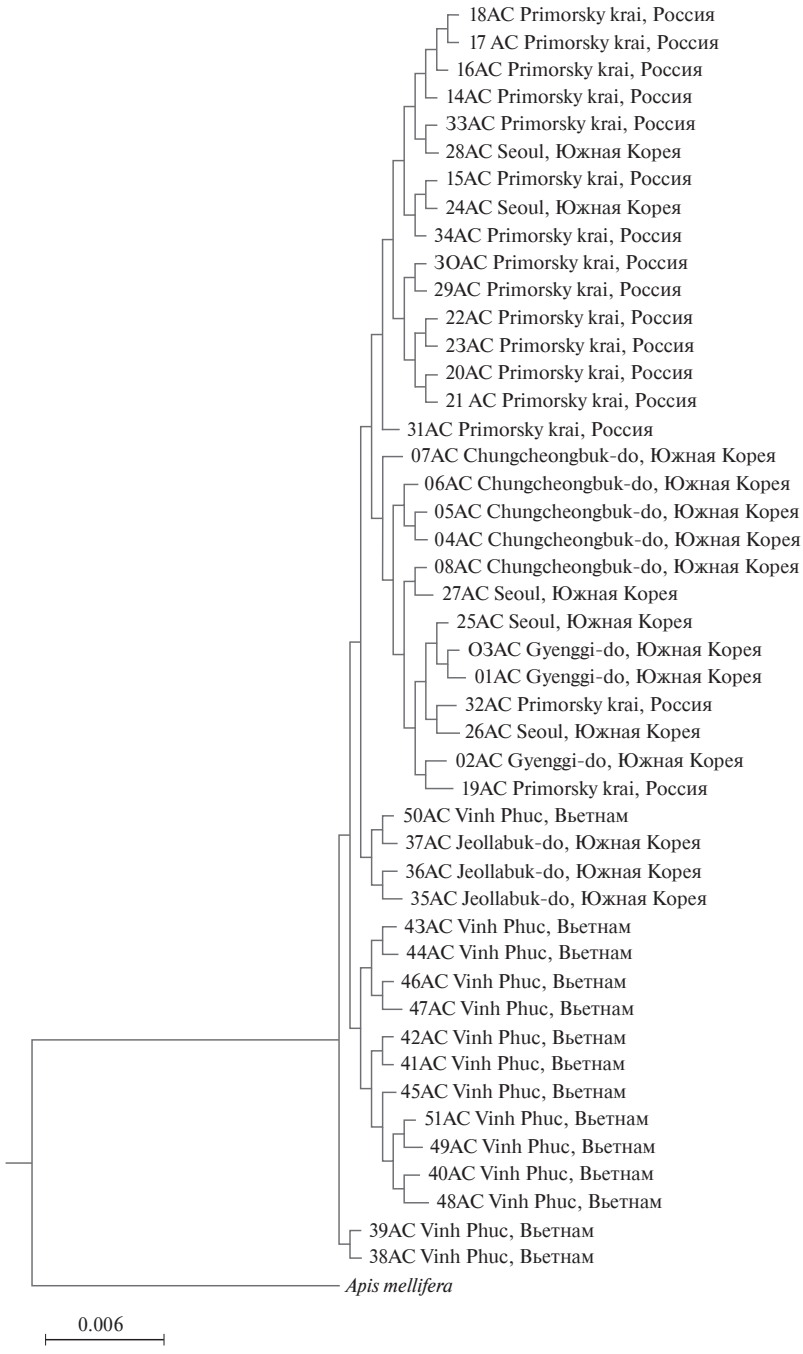


Рис. 3. Кладистический анализ изменчивости нуклеотидных последовательностей экзонов 3–7 гена *vtg* у *Apis cerana*. Указаны маркировка образца (см. табл. 1) и название географической точки его сбора. В качестве референсной внешней группы использован образец *Apis mellifera* (изолят IT1 гена вителлогенина *vtg*), экзоны с третьего по пятый из GenBank под номерами MH755772, MH755807, MH755842, MH755877 и MH755912.

ОБСУЖДЕНИЕ

Корейский полуостров представляет собой преимущественно горный ландшафт с разнообразными высотами, где климат варьируется от континентального на севере до субтропического на юге. Южная Корея, находящаяся в Восточноазиатском муссонном регионе, отличается умеренным климатом с четырьмя четко выраженными сезонами [14].

В 2010-х годах численность колоний *A. cerana* в Корее резко сократилась из-за эпидемии вируса мешотчатого расплода [15]. Однако генетическая структура популяций *A. cerana* на Корейском полуострове пока недостаточно изучена.

Поскольку популяции *A. cerana* из России, Южной Кореи и Вьетнама не имеют точного таксономического статуса, мы предполагаем, что эти

популяции могут относиться к отдельным подвидам и иметь генетические отличия от китайской популяции *A. c. cerana*. Предыдущие исследования, основанные на полиморфизме отдельных локусов мтДНК, не выявили филогенетической дифференциации среди азиатских популяций *A. cerana* [10]. Морфометрические маркеры, использованные для анализа *A. cerana*, оказались недостаточно информативными для раскрытия генетического разнообразия, изменчивости и филогенетической истории этого вида.

В генах *def1* и *def2* во всех четырех полиморфных сайтах, исследованных в работе [15], наблюдается отсутствие полиморфных вариантов в популяции Вьетнама, в отличие от популяций в других странах.

Анализ ДНК и морфологические исследования показали, что *A. c. cerana* распространена только на плато Геологического парка Донг Ван Карст в провинции Хазянг на севере Вьетнама. В то же время *A. c. indica* встречается по всей остальной территории страны, за исключением провинции Камау [16]. *A. c. indica* Южного Вьетнама относится к индокитайскому морфокластеру, тогда как *A. c. cerana* Северного Вьетнама принадлежит к северному морфокластеру [4].

Морфометрические данные показали, что рабочие особи *A. cerana* Северного Вьетнама в районе Донг Ван провинции Хазянг значительно крупнее, чем рабочие особи *A. c. indica* в провинции Ха Тай и в городе Ханое [17]. Наблюдаемые глобальные процессы потепления климата, в сочетании с антропогенными факторами, могут оказать негативное воздействие на популяции *A. cerana*.

Ранее нами были секвенированы и аннотированы полные последовательности митохондриальной ДНК (мтДНК) пчел подвида *A. cerana ussuriensis* [6] (GenBank ID: AP018450) из Приморского края и *A. cerana koreana* [7] (GenBank ID: AP018431) из Южной Кореи. Также были исследованы шесть экзонов гена *vtg* (E2–E7) подвидов: *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana* и *A. c. indica*. Кластерный анализ показал значительную генетическую дифференциацию между южными и северными популяциями *A. cerana* [18].

При кластерном анализе последовательностей генов мтДНК и *vtg* было установлено, что пчелы делятся на две группы: южную, представленную *A. c. indica*, и северную, включающую *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica* и *A. c. cerana*. На основе генетической дивергенции выяснили, что подвид *A. c. ussuriensis* генетически ближе к *A. c. japonica*, *A. c. koreana* и *A. c. cerana*, чем к *A. c. indica*. Значения генетической дивергенции (0.80–8.00%) для мтДНК и гена *vtg* между подвидами *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana* и *A. c. indica* находятся в пределах внутривидовых различий.

Анализ изменчивости гена *vtg* показал, что популяции *A. cerana* из Южной Кореи, России и Японии более тесно связаны друг с другом, чем южные популяции *A. cerana*. Последовательности гена *vtg* могут служить информативными маркерами для мониторинга генетической структуры и процессов адаптации в популяциях *A. cerana* [18].

Вителлогенины представляют собой большие (200–700 кДа) гликолипопротеины, которые в нативном состоянии часто имеют олигомерную структуру и содержат от одной до четырех субъединиц. Мономеры вителлогенина большинства насекомых состоят из одной большой субъединицы (> 150 кДа) и одной малой (< 65 кДа) [19–21]. Эти субъединицы образуются в результате расщепления предшественника в жировом теле [22–27]. Исключение составляют вителлогенины высших перепончатокрылых (подотряд Apocrita) [26, 28, 29]. Предполагается, что изменение заряда аминокислот может вызывать изменения в структуре белка, а следовательно, и в его функциях [30].

У большинства животных вителлогенин состоит из трех консервативных доменов: N-концевого домена (ND), домена с неизвестной функцией 1943 (DUF1943) и домена фактора фон Виллебранда (vWF) типа D. У медоносных пчел ND-домен дополнительно подразделяется на два структурных субдомена: β-barrel и α-helical домены, которые связаны полисериновой областью [30].

Сравнив аминокислотные последовательности вителлогенина *A. mellifera* и *A. cerana*, можно сделать вывод, что различия между ними незначительны. Это позволяет предположить, что домены этих белков выполняют аналогичные функции, как было описано в работе V. Leipart с соавт. для медоносной пчелы *A. mellifera*. Однако аминокислотные замены в доменах могут оказывать влияние на их функциональные особенности [31].

В настоящем исследовании сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена вителлогенина выявил генетическую изменчивость *A. cerana* в географически изолированных регионах. Обнаруженные однонуклеотидные замены могут быть использованы в качестве SNP-маркеров для генетической идентификации как отдельных популяций, так и подвидов *A. cerana*.

Таким образом, исходя из результатов секвенирования пяти экзонов гена *vtg*, мы предполагаем, что популяции *A. cerana*, обитающие на территории Вьетнама, имеют признаки, позволяющие выделить их в отдельный подвид. Полиморфизм экзонов 3–7 гена *vtg* может быть связан с географической изоляцией популяций *A. cerana* в Южной Корее, Вьетнаме и на Дальнем Востоке России. Полученные результаты представляют собой

важный шаг к раскрытию молекулярно-генетических механизмов, определяющих видовую и популяционную структуру *A. cerana*.

Работа выполнена в рамках государственного задания №122041400162-3 и гранта РНФ 24-16-00179 (Ильясов Р.А., секвенирование и анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей).

Исследование одобрено Этическим комитетом Института биологии развития им. Н.К. Кольцова, протокол № 20 от 15.10.2024 г.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ruttner F.* Biogeography and Taxonomy of Honeybees // Berlin: Springer Sci. & Business Media, 1988. 284 p.
2. *Ruttner F.* The evolution of honey bees // Neurobiology and Behavior of Honey Bees / Eds Menzel R., Mercer A. Berlin: Springer Sci. & Business Media, 1987. 334 p.
3. *Radloff S.E., Hepburn C., Hepburn H.R. et al.* Population structure and classification of *Apis cerana* // Apidologie. 2010. V. 41. № 6. P. 589–601. https://doi.org/10.1051/apido/2010008
4. *Engel M.S.* The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae, *Apis*) // Hymenoptera Res. 1999. V. 8. P. 165–196.
5. *Ilyasov R.A., Park J., Takahashi J. et al.* Phylogenetic uniqueness of honeybee *Apis cerana* from the Korean peninsula inferred from the mitochondrial, nuclear, and morphological data // J. Apicultural Sci. 2018. V. 62. P. 189–214. https://doi.org/2478/jas-2018-0018
6. *Ilyasov R.A., Lee M., Kim K.W. et al.* Phylogenetic relationships of Russian Far-East *Apis cerana* with other North Asian populations // J. Apicultural Sci. 2019. V. 63. P. 289–314. https://doi.org/10.2478/jas-2019-0024
7. *Kim Y.H., Kim B.Y., Kim J.M. et al.* Differential expression of major royal jelly proteins in the hypopharyngeal glands of the honey bee *Apis mellifera* upon bacterial ingestion // Insects. 2022. V. 13. https://doi.org/10.3390/insects13040334
8. *Piulachs M.D., Guidugli K.R., Barchuk A.R. et al.* The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: Structural analysis of the cDNA and expression studies // Insect Biochem. and Mol. Biol. 2003. V. 33. P. 459–465. https://doi.org/10.1016/s0965-1748(03)00021-3
9. *Tanaka T., Roubik D.W., Kato M. et al.* Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences // Insects Sociaux 2001. V. 48. P. 44–51. https://doi.org/10.1007/PL00001744
10. *Kent C.F., Amer I., Alexandra C., Amro Z.* Adaptive evolution of a key gene affecting queen and worker traits in the honey bee, *Apis mellifera* // Mol. Ecol. 2011. V. 20. № 24. P. 5226–5235.
11. *Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M.* Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 8. P. 1166–1167.
12. *Kumar S., Stecher G., Li M. et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
13. *Liu C.H., Di Y.P.* Analysis of RNA sequencing data using CLC Genomics Workbench // Mol. Toxicol. Protocols. 2020. P. 61–113.
14. *Jung C., Lee M.* Beekeeping in Korea: Past, present, and future challenges // Asian Beekeeping in the 21st Century. 2018. P. 175–197.
15. *Кинзикеев А.К., Гайфуллина Л.Р., Гладких А.Н. и др.* 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* // Изв. Уфимского науч. центра РАН. 2023. № 2. С. 72–78.
16. *Thai P.H., Toan V.T.* Beekeeping in Vietnam // Asian Beekeeping in the 21st Century 2018. P. 247–267. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8222-1_11
17. *Toan T.V.* Study on some biological and ecological characteristics of the hybrid between Dong Van indigenous honeybee breed (*Apis cerana cerana* Fabricius) with the local indigenous honeybee breeds (*Apis cerana indica* Fabricius) in some provinces in the North of Vietnam: PhD Thesis. Vietnam: Hanoi Univ. Agriculture, 2012.
18. *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. https://doi.org/10.3390/insects13111053
19. *Kunkel J.G., Nordin J.H.* Yolk proteins. Insect physiology, biochemistry and pharmacology // Pergamon Press. 1985. P. 83–111.
20. *Raikhel A.S., Dhadialla T.S.* Accumulation of yolk proteins in insect oocytes // Annual Rev. Entomol. 1992. P. 217–251. https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001245
21. *Valle D.* Vitellogenesis in insects and other groups – a review // Scielo Brasil. 1993. V. 88. P. 1–26. https://doi.org/ 10.1590/s0074-02761993000100005
22. *Bose S.G., Raikhel A.S.* Mosquito vitellogenin subunits originate from a common precursor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988. V. 155. № 1. P. 436–442. doi 10.1016/s0006-291x(88)81105-7

23. *Dhadialla T.S., Raikhel A.S.* Biosynthesis of mosquito vitellogenin // J. Biol. Chemistry. 1990. V. 265. № 17. P. 9924–9933.
24. *Heilmann L.J., Trewitt P.M., Kumaran A.K.* Proteolytic processing of the vitellogenin precursor in the boll weevil, *Anthonomus grandis* // Arch. Insect Biochem. and Physiol. 1993. V. 23. № 3. P. 125–134. https://doi.org/10.1002/arch.940230304
25. *Yano K., Sakurai M.T., Izumi S., Tomino S.* Vitellogenin gene of the silkworm *Bombyx mori*: Structure and sex-dependent expression // Federation Europ. Biochem. Soc. Letters. 1994. V. 356. № 2–3. P. 207–211. https://doi.org/ 10.1016/0014-5793(94)01265-2
26. *Kageyama Y., Kinoshita T., Umesono Y. et al.* Cloning of cDNA for vitellogenin of *Athalia rosae* (Hymenoptera) and characterization of the vitellogenin gene expression // Insect Biochem. and Mol. Biol. 1994. V. 24. № 6. P. 599–605. https://doi.org/10.1016/0965-1748(94)90096-5
27. *Hiremath S., Lehtoma K.* Complete nucleotide sequence of the vitellogenin mRNA from the gypsy moth: Novel arrangement of the subunit encoding regions // Insect Biochem. and Mol. Biol. 1997. V. 27. № 1. P. 27–35. https://doi.org/10.1016/s0965-1748(96)00067-7
28. *Wheeler D., Kawooya J.K.* Purification and characterization of honey bee vitellogenin // Arch. Insect Biochem. and Physiol. 1990. V. 14. № 4. P. 253–267. https://doi.org/10.1002/arch.940140405
29. *Nose Y., Lee J.M., Ueno T. et al.* Cloning of cDNA for vitellogenin of the parasitoid wasp, *Pimpla nipponica* (Hymenoptera: Apocrita: Ichneumonidae): Vitellogenin primary structure and evolutionary considerations // Insect Biochem. and Mol. Biol. 1997. V. 27. № 12. P. 1047–1056. https://doi.org/10.1016/s0965-1748(97)00091-x
30. *Мурашев С.В., Вышегородцева А.В.* Молекулярное моделирование влияния заряда аминокислот и их функциональных групп на pH и зарядовое состояние белка // Изв. Санкт-Петербургского гос. аграрного ун-та. 2016. № 45. С. 72–78.
31. *Leipart V., Montserrat-Canals M., Cunha E.S. et al.* Structure prediction of honey bee vitellogenin: A multi-domain protein important for insect immunity // Federation Europ. Biochem. Soc. Open Bio. 2022. V. 12. № 1. P. 51–70. https://doi.org/10.1002/2211-5463.13316

Polymorphism of Five Exons of the *vtg* gene *Apis cerana* in Populations of Russia, South Korea and Vietnam

A. K. Kinzikeev[1, *], R. A. Ilyasov[2], D. V. Boguslavsky[2], A. Yu. Ilyasova[2], L. R. Gaifullina[1], V. N. Sattarov[3], E. S. Saltykova[1]

[1]*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*
[2]*Koltsov Institute of Developmental Biology, the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*
[3]*Bashkir State Pedagogical University named after M. Akmully, Ufa, 450077 Russia*

**e-mail: kinzikeev@bk.ru*

The best-known kitchen modules of the Apidae are the honey bees *Apis mellifera* and the wax bee *Apis cerana*. Compared to the honey bee, *A. cerana* is somewhat smaller in size, although it lives with it. The wax bee is native to temperate and tropical Asia, ranging from Afghanistan to Korea and Japan, north to the Himalayan foothills, as well as eastern Russia and south through Indonesia. The learning of bees to a changing environment is a fundamental question in evolutionary biology and is critical to protecting species in the face of climate change. In this method, five exons (from 3 to 7) of the vitellogenin gene *vtg* were sequenced to study the taxonomic relationships of individual populations and subspecies *of A. cerana*. Our detailed studies of the defensin 1 and 2 genes (*def1* and *def2*) revealed the peculiarity of the structure of *A. cerana* in Vietnam, probably due to the geographical location of this direction. Currently, we confirm this assumption based on the analysis of the polymorphism of the *vtg gene* , which encodes a protein that implements the genetic control of immunity, oogenesis and lifespan. conservation within the protein may have selective significance for local populations. The *vtg* gene also contributes to the adaptation of bees to a cold climate. It is believed that the survival of long-lived representatives of various bee species, among other things, is associated with the development of the ability to accumulate vitellogenin, which can determine the differences in the stages of proteins in bees living in different conditions.

Keywords: *Apis cerana*, *vtg* gene, wax bee, subspecies, taxonomy, vitellogenin.