

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ И ЭВОЛЮЦИЯ
УССУРИЙСКОЙ ВОСКОВОЙ ПЧЕЛЫ *Apis cerana ussuriensis*
ИЗ ПРИМОРСКОГО КРАЯ РОССИИ

© 2021 г. Р. А. Ильясов^{1,2,*}, Г. Ю. Хан², М. Л. Ли², К. В. Ким², М. Ю. Прощалькин³,
А. С. Лелей³, Д. Х. Парк^{2,4}, Д. И. Такахаша⁵, Х. В. Квон^{2,**}, А. Г. Николенко¹

¹Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

²Отделение наук о жизни и Исследовательский центр насекомых-переносчиков болезней,
Инчхонский национальный университет, Инчхон, 22012 Корея

³Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия

⁴Биоинформатическая компания 3BIGS CO. LTD, Хвасон-си, 18454 Корея

⁵Факультет естественных наук, Университет Киото Сангё, Киото, 603-8555 Япония

*e-mail: apismell@hotmail.com

**e-mail: hwkwon@inu.ac.kr

Поступила в редакцию 16.06.2020 г.

После доработки 04.09.2020 г.

Принята к публикации 09.10.2020 г.

Apis cerana ussuriensis Piyasov et al., 2019 — самый северный подвид восковой пчелы *A. cerana* Fabricius, 1793, распространенный в лесах Приморского и Хабаровского краев до 47°54' с.ш. Генетические исследования этого подвида представляют большой интерес для науки и пчеловодства, поскольку все адаптивные признаки сформировались под действием окружающей среды без участия человека. Мы секвенировали и аннотировали последовательности полной митохондриальной ДНК (мтДНК) пчел подвидов *Apis cerana ussuriensis* Piyasov et al., 2019 (номер в Генбанке AP018450) из Приморского края и *Apis cerana koreana* Piyasov et al., 2019 (AP018431) из Южной Кореи и шести экзонов гена вителлогенина *VG E2–E7* ядерной ДНК (ядДНК) подвидов пчел *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica* Radoszkowski, 1887, *A. c. cerana* и *A. c. indica* Fabricius, 1798. Методом кластерного анализа последовательностей мтДНК и гена *VG* яДНК было показано разделение пчел на две группы, включающие южный подвид *A. c. indica* и северные подвиды *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*. На основе генетической дивергенции было показано, что подвид *A. c. ussuriensis* генетически ближе к подвидам *A. c. japonica*, *A. c. koreana* и *A. c. cerana* чем к подвиду *A. c. indica*. Значения генетической дивергенции (0.80–8.00%) и генетической дистанции Jukes–Cantor (0.005–0.100) по мтДНК и гену *VG* яДНК между подвидами *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica* находятся в пределах внутривидовых различий между подвидами насекомых. Предположительное время возникновения подвидов *A. cerana* — от двух до одного млн лет назад.

Ключевые слова: *Apis cerana*, *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica*, митохондриальный геном, подвид, дивергенция, эволюция, Приморский край, вителлогенин, мтДНК, яДНК.

DOI: 10.31857/S0016675821050039

Восковая пчела *Apis cerana* Fabricius, 1793 является второй по значимости для человека после медоносной пчелы *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Их естественные ареалы не перекрывались до настоящего времени и были ограничены Европой и Африкой у *A. mellifera* и Азией у *A. cerana*. Оба вида пчел приспособлены к обитанию в широком диапазоне климатических поясов — от холодного умеренного до жаркого экваториального [1]. В азиатских странах *A. cerana* разводится на пасеках, а в России встречается только в диком состо-

янии в дальневосточных лесах на территориях Хабаровского и Приморского краев до 47°54' с.ш. и включен в красную книгу [2, 3]. В.Н. Кузнецов [3] обнаружил 80 деревьев, в дуплах которых обитали дикие семьи *A. cerana*, и предположил, что в лесах Приморского и Хабаровского краев до 47°54' с.ш. обитают более 1000 семей китайской восковой пчелы.

Восковая пчела *A. cerana* является важным и известным опылителем сельскохозяйственных

культур в Азии и производителем меда, воска, маточного молочка и пчелиной пыльцы [4], не уступает медоносной пчеле *A. mellifera* по уровню коммерческого использования и обладает высоким потенциалом для генетического улучшения путем селекции на основе молекулярных маркеров. В последнее время численность *A. cerana* резко сократилась в странах Азии в связи с распространением вируса мешотчатого расплода (SBV) и массового импорта *A. mellifera* [5–7].

Согласно опубликованным данным внутри *A. cerana* выделяется более 20 подвидов, большинство из которых не имеют четких таксономических диагнозов [8–19]. Сохранение генофонда локальных подвидов *A. cerana* возможно при маркер-опосредованной идентификации и селекции. Молекулярно-генетические исследования позволяют разработать базовые стратегии сохранения *A. cerana*. Маркеры митохондриальной ДНК (мтДНК) являются эффективными инструментами в исследовании эволюции и межвидовых и внутривидовых филогенетических взаимоотношений медоносных пчел [18, 20–25].

В настоящей работе мы секвенировали и аннотировали последовательности полной митохондриальной ДНК (мтДНК) пчел подвидов *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 (GenBank/DBJ AP018450) (ZooBank 06874b0a-029b-40e2-b4a8-1a20f7692ed3) из Приморского края и *Apis cerana koreana* Ilyasov et al., 2019 (GenBank/DBJ AP018431) (ZooBank 290e12ba-fc5f-4907-ae50-ef0fa8dc8d9c) из Южной Кореи и шести экзонов гена вителлогенина *VG E2–E7* ядерной ДНК (ядНК) подвидов пчел *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana* и *A. c. indica*. Была проведена оценка филогенетических взаимоотношений *A. c. ussuriensis* с другими подвидами из Южной Кореи, Китая, Японии, Тайваня и Индонезии на основе полной мтДНК и гена *VG* яДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было отобрано по 10 взрослых особей рабочих пчел из следующих семей: *A. c. ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 из дупла в лесном массиве пригорода Владивостока, Приморский край, Россия (43°11' с.ш. 132°55' в.д.); *A. c. koreana* Ilyasov et al., 2019 с пасеки Gokseong-gun, Gokseong-eup, Nakjung-ri, Jeollanam-do, Южная Корея (35°24' с.ш., 127°27' в.д.), с пасеки Sangju-si, Gyeongsangbuk-do, Южная Корея (36°42' с.ш., 128°18' в.д.), с пасеки Sancheong-gun, Gyeongsangnam-do, Южная Корея (35°36' с.ш., 128°88' в.д.); *A. c. japonica* с пасеки Kitahiroshima, Hokkaido, Япония (42°95' с.ш., 141°53' в.д.); *A. c. indica* с пасеки Taichung, Тайвань (24°04' с.ш., 120°73' в.д.). Видовая принадлежность пчел *A. cerana* была определена морфометрически согласно В.Н. Кузнецову [3].

Тотальную ДНК экстрагировали из грудной мышечной ткани каждой пчелы с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, Madison, WI, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Образцы ДНК хранили при –20°C до дальнейшего использования. Полимеразную цепную реакцию экзонов 2–7 гена вителлогенина (*VG*) проводили на 96-луночном термоциклере Applied Biosystems Veriti HiD на основе уже разработанных праймеров [26] с набором для ПЦР TaKaRa (100 мкл ПЦР × 100 реакций) (TAKARA BIO INC., Shiga, Япония) в соответствии с инструкциями производителя. Все продукты ПЦР были очищены с помощью набора для очистки ПЦР QIAquick (250) (QIAGEN, Hilden, Германия), следуя инструкциям производителя.

По одной рабочей особи из каждой семьи пчел было использовано для секвенирования мтДНК с помощью набора NextSeq 500/550 High Output Kit v. 2 (75 циклов) (ILLUMINA, США) и парных циклов считывания (2 × 150 пн), следуя инструкции производителя, на секвенаторе Illumina NextSeq 500 (ILLUMINA, США) в Университете Киото Сангё (Kyoto, Япония). Геномные библиотеки были приготовлены с помощью набора для подготовки ДНК-библиотеки Nextera (ILLUMINA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Сборка геномов проводилась на основе 1662000 прочтений со средним покрытием 75 с помощью Geneious R9 (BIOMATTERS, Новая Зеландия). Аннотация геномов выполнена на MITOS (Германия) [27] и tRNAscan-SE (СА, США) [28]. По одной рабочей особи из каждой семьи пчел было использовано для секвенирования экзонов гена вителлогенина *VG* яДНК с обоих концов с помощью дидезокси-метода Sanger [29] с использованием набора ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 на секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, США) в Инчхонском национальном университете (Incheon, Южная Корея).

Нуклеотидные последовательности полной мтДНК были депонированы в базы данных GenBank/DBJ под номерами AP018431 для *A. c. koreana* (15925 пн) (ZooBank 290e12ba-fc5f-4907-ae50-ef0fa8dc8d9c) (Gokseong-gun, Jeollanam-do, Южная Корея) и AP018450 для *A. c. ussuriensis* (15919 пн) (ZooBank 06874b0a-029b-40e2-b4a8-1a20f7692ed3) (Приморский край, Россия). Нуклеотидные последовательности экзонов 2–7 гена *VG* были депонированы под номерами MH755745, MH755780, MH755815, MH755850, MH755885, MH755920 (4125 пн) и MH755746, MH755781, MH755816, MH755851, MH755886, MH755921 (4125 пн) для двух представителей *A. c. ussuriensis* (Приморский край, Россия); под номерами MH755735, MH755770, MH755805, MH755840, MH755875, MH755910 для *A. c. koreana* (Sancheong,

Gyeongsangnam-do, Южная Корея); МН755741, МН755776, МН755811, МН755846, МН755881, МН755916 (4125 пн) и МН755742, МН755777, МН755812, МН755847, МН755882, МН755917 (4125 пн) для *A. c. japonica* (Kitahiroshima, Hokkaido, Япония); МН755747, МН755782, МН755817, МН755852, МН755887, МН755922 (4128 пн) и МН755748, МН755783, МН755818, МН755853, МН755888, МН755923 (4128 пн) для *A. c. indica* (Taichung, Тайвань).

Сравнительный анализ полной мтДНК был проведен с использованием последовательностей из Генбанка: *A. c. japonica* AP017314 (15917 пн) (Kyoto, Япония), *A. c. japonica* AP017941 (15778 пн) (Amami, Япония), *A. c. cerana* AP017983 (15460 пн) (Jiangsu, Китай), *A. c. cerana* KM244704 (15712 пн) (Yunnan, Китай), *A. c. indica* AP017984 (15376 пн) (Taipei, Тайвань), *A. c. indica* AP018149 (15884 пн) (Sabah, Борнео, Малайзия), *A. c. koreana* AP018431 (15925 пн) (Jeollanam-do, Южная Корея), *A. c. koreana* KX908206 (15904 пн) (Chungcheongbukdo, Южная Корея), *A. m. ligustica* NC 001566 (16324 пн) (внешняя группа, США). Сравнительный анализ гена *VG* яДНК был проведен с использованием последовательностей из Генбанка: *A. c. cerana* KT725235 (4125 пн) (Yunnan, Китай), *A. c. cerana* ApisCC1.0 (4125 пн, фрагмент 781683–788069 из геномной последовательности KZ288206) (Yunnan, Китай), *A. m. mellifera* JN557295, JN557387, JN557201, JN557573, JN557481, JN557109 (4074 пн) (внешняя группа, изолят M2261, Warsaw, Польша).

Дивергенция нуклеотидных последовательностей и генетические дистанции Jukes–Cantor [30], Tamura–Nei [31] и *p*-distance [32] были рассчитаны с использованием Unipro UGENE 1,28 (UNIPRO, Россия) и CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания). Филогенетический анализ на основе последовательностей ДНК был проведен с использованием MEGA7 [33] и Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, США), JMP14 (SAS Institute Inc., North Carolina, США). Филогенетические деревья были построены с использованием метода ближайшего соседа [34] на основе дистанций Jukes–Cantor с 1000 бутстреп-репликациями и Reltime [35] метода оценки длины ветвей. Физическая карта полного митохондриального генома была построена с использованием CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Дания) и Artemis 17.0.1 (The Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Митохондриальный геном *A. c. ussuriensis* (Приморский край, Россия) содержит 42% А, 42% Т, 6% G, 10% С нуклеотидов, обогащен АТ на 84%, содержит наиболее высокие частоты динуклеотидов АА (19%), АТ (18%), ТТ (18%) и ТА (16%) и наиболее низкие частоты динуклеотидов GG

(1%), GC (1%), CG (1%) и CC (2%), что характерно для большинства перепончатокрылых [25, 36, 37]. Среднее содержание GC в мтДНК *A. c. ussuriensis* составляет 16%, а максимальный уровень не превышает 40%. Значение генетического разнообразия и варибельности зависит прямо пропорционально от GC-состава – чем выше содержание GC, тем выше генетическое разнообразие и варибельность генов. Содержание GC в мтДНК менее 40% считается низкой [38] (табл. 1).

МтДНК *A. c. ussuriensis* (15919 пн) незначительно короче мтДНК *A. mellifera* (16343 пн) и *Drosophila yakuba* (16019 пн). Сумма всех межгенных некодирующих регионов мтДНК *A. c. ussuriensis* (1252 пн) также немного короче *A. mellifera* (1639 пн) и *D. yakuba* (1262 пн) [36].

Митохондриальный геном *A. c. ussuriensis* содержит 30 белок-кодирующих генов (CDS), 22 гена транспортной РНК (tRNA), два гена субъединиц рибосомальной РНК (rRNA) – *16S rRNA* и *12S rRNA*, четыре некодирующих межгенных участка (*NC1–NC4*). Синтения мтДНК *A. c. ussuriensis* сходна с синтением мтДНК большинства перепончатокрылых с небольшими различиями [25, 36]. Большинство генов (*ATP6*, *ATP8*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *CYTB*, *ND2*, *ND3*, *ND6*, *tRNA-Ala*, *tRNA-Asn*, *tRNA-Asp*, *tRNA-Gln*, *tRNA-Glu*, *tRNA-Gly*, *tRNA-Ile*, *tRNA-Leu(UUR)*, *tRNA-Lys*, *tRNA-Met*, *tRNA-Ser(AGN)*, *tRNA-Ser(UCN)*, *tRNA-Thr* и *tRNA-Trp*) расположены на легкой цепи мтДНК, за исключением четырех генов субъединиц (*ND1*, *ND4*, *ND4L* и *ND5*), двух генов rRNA (*12S* и *16S rRNA*) и восьми генов тРНК (*tRNA-Arg*, *tRNA-Cys*, *tRNA-His*, *tRNA-Leu(CUN)*, *tRNA-Phe*, *tRNA-Pro*, *tRNA-Tyr* и *tRNA-Val*), которые расположены на тяжелой цепи мтДНК (табл. 2, рис. 1).

Белок-кодирующие гены *ND3*, *ND4L*, *ND5*, *COX1*, *ND6*, *COX2*, *ND1*, *ND2* имеют стартовый кодон АТТ, гены *COX3*, *ATP6* и *CYTB* – стартовый кодон АТГ, ген *ND4* – стартовый кодон АТА, ген *ATP8* – стартовый кодон АТС. Все белок-кодирующие гены мтДНК *A. c. ussuriensis* имеют единый стоп-кодон ТАА. Для некоторых генов мтДНК (*tRNA-Gln* и *tRNA-Ala* (4 пн), *ND2* и *tRNA-Cys* (1 пн), *COX1* и *tRNA-Leu(UUR)* (5 пн), *COX2* и *tRNA-Asp* (1 пн), *ATP8* и *ATP6* (19 пн)) *A. c. ussuriensis* характерно перекрывание, что возможно унаследовано от прокариотического генома с полицистронным типом транскрипции (табл. 2).

Размер всех белок-кодирующих генов мтДНК *A. c. ussuriensis* 11058 пн, они кодируют 3686 аминокислот. Гены rRNA мтДНК *A. c. ussuriensis* имеют суммарный размер 2116 пн (*12S rRNA* – 787 пн и *16S rRNA* – 1329 пн). Размеры генов тРНК мтДНК *A. c. ussuriensis* варьируют от 60 пн (*tRNA-Ser(AGN)*) до 78 пн (*tRNA-Pro*).

МтДНК *A. c. ussuriensis* содержит четыре некодирующих межгенных участка (*NC1–NC4*), что

Таблица 1. Характеристика нуклеотидного состава полной мтДНК *A. c. ussuriensis* Приморского края России

Нуклеотиды	Число (частота)
GC-состав	2540 (0.16)
AT-состав	13373 (0.84)
Аденин А	6729 (0.42)
Цитозин С	1542 (0.10)
Гуанин G	998 (0.06)
Тимин Т	6644 (0.42)
Динуклеотид AA	2973 (0.19)
Динуклеотид AC	475 (0.03)
Динуклеотид AG	358 (0.02)
Динуклеотид AT	2921 (0.18)
Динуклеотид CA	675 (0.04)
Динуклеотид CC	239 (0.02)
Динуклеотид CG	70 (0.01)
Динуклеотид CT	558 (0.04)
Динуклеотид GA	471 (0.03)
Динуклеотид GC	116 (0.01)
Динуклеотид GG	136 (0.01)
Динуклеотид GT	275 (0.02)
Динуклеотид TA	2609 (0.16)
Динуклеотид TC	712 (0.05)
Динуклеотид TG	432 (0.03)
Динуклеотид TT	2886 (0.18)
Нуклеотид А в позиции 1/2/3	240 (0.47)/128 (0.25)/249 (0.48)
Нуклеотид С в позиции 1/2/3	37 (0.07)/70 (0.14)/22 (0.04)
Нуклеотид G в позиции 1/2/3	50 (0.1)/19 (0.04)/11 (0.02)
Нуклеотид Т в позиции 1/2/3	188 (0.37)/298 (0.58)/233 (0.45)
Размер, пн	15919
Вес одной цепи, кДа	4904.98

характерно для всех представителей *A. cerana* [39]. Некодирующий межгенный участок *NC1* (228 пн) расположен между генами *tRNA-Met* и *tRNA-Gln*, *NC2* (89 пн) – между генами *tRNA-Leu* (TAA) и *COX2*, *NC3* (68 пн) – между генами *COX3*, *tRNA-Gly*, *NC4* (51 пн) – между генами *tRNA-Pro* и *ND6*. Все не кодирующие межгенные и AT-богатые участки *A. c. ussuriensis* составляют менее 8% от всего размера мтДНК. Некодирующие межгенные и AT-богатые участки являются регуляторными областями и содержат повторяющиеся мотивы. Мотив ААТГААТТ встречался в мтДНК *A. c. ussuriensis* 48 раз, мотив ААТАААТТ – 74 раза, мотив ТАСТТА (вероятный сайт связывания митохондриального терминатора транскрипции (mtTERM)) – 8 раз [40].

Некодирующий межгенный участок *NC2* *A. c. ussuriensis* идентичен с гаплотипом *Japan01* (последовательности КР064995 и АР018431), он не обладает идентичностью ни с одним из 10 опу-

ликованных гаплотипов (*ACNC101–ACNC110*) [18, 19, 39] и был обозначен как гаплотип *ACNC111* (рис. 2). Гаплотип *ACNC111* наиболее близок к гаплотипу *ACNC101* (последовательности КР064870 и КР064972) и отличается вставкой 31insT относительно начала последовательности *NC1* (рис. 2).

Сравнительный анализ последовательности полной мтДНК позволил рассчитать транзиции и трансверсии между представителями *A. cerana* разных популяций. Сходно с геномами большинства организмов, транзиции у *A. cerana* происходят чаще, чем трансверсии. Были рассчитаны транзиции и трансверсии между представителями *A. cerana* разных популяций для всей мтДНК, а также только для белок-кодирующих генов мтДНК. Это позволяет оценить вклад кодирующей и не кодирующей частей митохондриального генома в генетическую вариабельность. Отмечено, что роль не кодирующей части мтДНК в под-

Таблица 2. Аннотация полной мтДНК *A. c. ussuriensis* Приморского края России

№	Ген	Позиция начала	Позиция конца	Размер, пн
1	<i>tRNA-Ser</i> (AGN)	1	60	60
2	<i>tRNA-Glu</i>	64	129	66
3	<i>tRNA-Met</i>	164	229	66
4	<i>tRNA-Gln</i>	462	527	66
5	<i>tRNA-Ala</i>	524	589	66
6	<i>tRNA-Ile</i>	608	673	66
7	<i>ND2</i>	674	1669	996
8	* <i>tRNA-Cys</i>	1669	1734	66
9	* <i>tRNA-Tyr</i>	1740	1808	69
10	<i>tRNA-Trp</i>	1825	1893	69
11	<i>COX1</i>	1894	3459	1566
12	<i>tRNA-Leu</i> (UUR)	3455	3524	70
13	<i>COX2</i>	3614	4294	681
14	<i>tRNA-Asp</i>	4294	4361	68
15	<i>tRNA-Lys</i>	4368	4439	72
16	<i>ATP8</i>	4446	4607	162
17	<i>ATP6</i>	4589	5266	678
18	<i>COX3</i>	5284	6063	780
19	<i>tRNA-Gly</i>	6136	6202	67
20	<i>ND3</i>	6203	6556	354
21	* <i>tRNA-Arg</i>	6577	6645	69
22	<i>tRNA-Asn</i>	6665	6732	68
23	* <i>tRNA-Phe</i>	6751	6821	71
24	* <i>ND5</i>	6828	8495	1668
25	* <i>tRNA-His</i>	8496	8561	66
26	* <i>ND4</i>	8579	9910	1332
27	* <i>ND4L</i>	9913	10176	264
28	<i>tRNA-Thr</i>	10200	10266	67
29	* <i>tRNA-Pro</i>	10282	10359	78
30	<i>ND6</i>	10411	10923	513
31	<i>CYTB</i>	10936	12084	1149
32	<i>tRNA-Ser</i> (UCN)	12108	12174	67
33	* <i>ND1</i>	12187	13101	915
34	* <i>tRNA-Leu</i> (CUN)	13102	13170	69
35	* <i>16S rRNA</i>	13171	14499	1329
36	* <i>tRNA-Val</i>	14500	14566	67
37	* <i>12S rRNA</i>	14567	15353	787
	Вся мтДНК	1	15919	15919

* Гены, транскрибирующиеся с тяжелой цепи мтДНК.

держании генетической вариабельности выше кодирующей (табл. 3).

Дивергенция (%) и генетические дистанции между *A. c. japonica* и *A. c. cerana* – 2.85 и 0.80 по мтДНК и гену *VG* яДНК соответственно; между

A. c. japonica и *A. c. indica* – 5.26 и 0.85; между *A. c. japonica* и *A. c. koreana* – 1.33 и 0.80; между *A. c. cerana* и *A. c. indica* 4.95 и 0.80; между *A. c. cerana* и *A. c. koreana* – 2.85 и 0.80; между *A. c. koreana* и *A. c. indica* – 5.45 и 0.88; между *A. c. ussuriensis* и *A. c. cerana* – 2.55 и 1.25; между *A. c. ussuriensis* и

Таблица 3. Транзиции и трансверсии последовательности полной мДНК между представителями *A. segeta* разных популяций

Представители <i>A. segeta</i>	Транзиции полной мДНК/белок-кодирующих генов мДНК									
	AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия	KM244704, <i>A. c. segeta</i> , Yunnan, Китай	AP017983, <i>A. c. segeta</i> , Jiangsu, Китай	AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	AP017984, <i>A. c. indica</i> Taipei, Тайвань	AP018149, <i>A. c. indica</i> Sabah, Borneo, Малайзия	NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США
AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия	29/12	26/15	15/5	14/5	18/8	42/10	99/65	308/138	1506/957	
KM244704, <i>A. c. segeta</i> , Yunnan, Китай		9/3	17/9	17/9	21/12	53/18	88/59	274/130	1438/950	
AP017983, <i>A. c. segeta</i> , Jiangsu, Китай	64/52		14/12	14/12	18/15	50/21	85/58	225/131	1367/951	
AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	29/21	60/49		2/1	9/5	43/13	89/62	311/135	1492/953	
AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	30/23	61/51	9/8		6/5	45/13	89/62	285/135	1452/952	
KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	38/25	73/54	30/18	31/20		48/16	92/65	316/136	1498/955	
AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	40/24	63/48	45/33	45/35	39/23		122/71	317/142	1510/959	
AP017984, <i>A. c. indica</i> , Taipei, Тайвань	237/197	251/209	244/206	242/204	253/207	245/204		228/139	1320/947	
AP018149, <i>A. c. indica</i> , Sabah, Borneo, Малайзия	339/272	337/273	338/278	342/280	355/281	337/274	345/294		1492/931	
NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США	715/550	713/554	718/557	710/554	725/558	709/546	691/543	694/539		

Таблица 4. Генетические дистанции (выше диагонали) и генетические различия (ниже диагонали) между последовательностями полной мтДНК образцов *A. cerana*

Представители <i>A. cerana</i>	AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия	KM244704, <i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	AP017983, <i>A. c. cerana</i> , Jiangsu, Китай	AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	AP017984, <i>A. c. indica</i> Taipei, Тайвань	AP018149, <i>A. c. indica</i> Sabah, Borneo, Малайзия	NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США
AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия		0.006/ 0.002/ 0.002	0.006/ 0.002/ 0.002	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.006/ 0.006	0.042/ 0.013/ 0.013	0.159/ 0.097/ 0.088
KM244704, <i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	1.8/ 85/ 13		0.002/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.007/ 0.003/ 0.003	0.022/ 0.005/ 0.005	0.040/ 0.013/ 0.013	0.155/ 0.096/ 0.087
AP017983, <i>A. c. cerana</i> , Jiangsu, Китай	3.3/ 90/ 16	1.5/ 35/ 5		0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.008/ 0.003/ 0.003	0.022/ 0.005/ 0.005	0.037/ 0.013/ 0.013	0.152/ 0.096/ 0.087
AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Япония	0.9/ 44/ 7	2.8/ 77/ 13	3.5/ 84/ 16		0.002/ 0.001/ 0.001	0.003/ 0.001/ 0.001	0.003/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.005/ 0.005	0.042/ 0.014/ 0.014	0.158/ 0.096/ 0.087
AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Япония	1.2/ 44/ 8	2.2/ 78/ 14	2.9/ 85/ 17	0.7/ 11/ 3		0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.005/ 0.005	0.041/ 0.014/ 0.014	0.156/ 0.096/ 0.087
KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Корея	1.1/ 56/ 13	1.9/ 94/ 19	3.4/ 98/ 22	0.9/ 39/ 12	1.2/ 37/ 13		0.003/ 0.003/ 0.003	0.023/ 0.006/ 0.006	0.044/ 0.014/ 0.014	0.159/ 0.096/ 0.087
AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Корея	1.5/ 82/ 12	2.4/ 116/ 19	3.9/ 123/ 22	1.3/ 88/ 15	1.9/ 90/ 16	1.1/ 87/ 17		0.024/ 0.007/ 0.008	0.043/ 0.014/ 0.014	0.159/ 0.097/ 0.088
AP017984, <i>A. c. indica</i> , Taipei, Тайвань	5.5/ 336/ 46	4.5/ 339/ 48	3.1/ 338/ 47	5.7/ 333/ 45	5.12/ 331/ 44	5.6/ 345/ 51	6.1/ 367/ 52		0.038/ 0.014/ 0.014	0.148/ 0.095/ 0.087
AP018149, <i>A. c. indica</i> , Sabah, Borneo, Малайзия	4.8/ 647/ 89	5.5/ 611/ 88	6.7/ 559/ 85	4.9/ 649/ 87	5.3/ 627/ 90	4.9/ 671/ 93	5.2/ 654/ 95	6.9/ 573/ 93		0.156/ 0.095/ 0.087
NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , США	20.6/ 2221/ 585	21.2/ 2151/ 585	22.2/ 2071/ 583	20.5/ 2210/ 581	20.9/ 2162/ 580	20.5/ 2223/ 588	20.6/ 2219/ 587	22.2/ 2011/ 584	20.5/ 2186/ 590	

ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание АТ-нуклеотидов в полной последовательности мтДНК *A. c. ussuriensis* 84% было сходно с другими насекомыми: *A. c. cerana* – 84%, *A. c. koreana* – 84.1%, *A. mellifera* – 84.9%, *Bombus hypocrita* – 85.3%, *B. ignitus* – 86.8%, *Cephus cinctus* – 82%, *Enicospilus* sp. – 85.2%, *Melipona bicolor* – 86.7%, *Polistes humilis* – 84.7% и *Spathius agrili* – 84% [18, 25].

Филогенетический анализ последовательности некодирующего межгенного участка *NC1* выявил девять гаплотипов *A. cerana* (*ACNC101*, *ACNC102*, *ACNC103*, *ACNC104*, *ACNC105*, *ACNC106*, *ACNC107*, *ACNC108*, *ACNC109*), подразделенных на две группы – А и В [39]. Гаплотип *ACNC110* был обнаружен у *A. c. koreana* [18]. В настоящем исследовании у *A. c. ussuriensis* обнаружен новый гаплотип *ACNC111*, который отличался от *ACNC110* инсерцией 31insT относительно начала последо-

Таблица 5. Генетические дистанции (выше диагонали) и генетические различия (ниже диагонали) между последовательностями гена *VG* яДНК образцов *A. cerana*

Представители <i>A. cerana</i>	Дистанции Jukes–Cantor/Тamura–Nei/ <i>p</i> -distance											
	<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 01	<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 02	<i>A. c. cerana</i> , Jiangxi, Китай	<i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 01	<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 02	<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangbuk-do, Южная Корея	<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangnam-do, Южная Корея	<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 01	<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 02	<i>A. m. mellifera</i> , Warsaw, Польша	
<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 01		0.002/ 0.003/ 0.001	0.013/ 0.013/ 0.005	0.013/ 0.013/ 0.005	0.008/ 0.008/ 0.004	0.009/ 0.009/ 0.004	0.010/ 0.010/ 0.005	0.010/ 0.011/ 0.005	0.014/ 0.014/ 0.005	0.014/ 0.014/ 0.005	0.081/ 0.082/ 0.026	
<i>A. c. ussuriensis</i> , Приморский край, Россия 02	0.3/ 12/ 6		0.012/ 0.012/ 0.004	0.012/ 0.012/ 0.005	0.010/ 0.010/ 0.004	0.010/ 0.010/ 0.005	0.008/ 0.008/ 0.004	0.008/ 0.008/ 0.004	0.013/ 0.012/ 0.004	0.013/ 0.013/ 0.004	0.081/ 0.082/ 0.026	
<i>A. c. cerana</i> , Jiangxi, Китай	1.3/ 52/ 22	1.2/ 48/ 22		0.007/ 0.007/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.006/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.009/ 0.009/ 0.001	0.009/ 0.010/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. cerana</i> , Yunnan, Китай	1.3/ 53/ 26	1.2/ 49/ 24	0.8/ 27/ 6		0.008/ 0.008/ 0.002	0.006/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 01	0.8/ 32/ 20	1.0/ 40/ 22	0.8/ 30/ 6	0.8/ 31/ 10		0.002/ 0.002/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.002	0.007/ 0.007/ 0.002	0.009/ 0.009/ 0.002	0.008/ 0.008/ 0.002	0.076/ 0.077/ 0.023	
<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Япония 02	0.9/ 37/ 20	1.0/ 41/ 22	0.7/ 25/ 4	0.7/ 26/ 8	0.2/ 7/ 2		0.006/ 0.006/ 0.001	0.005/ 0.005/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.007/ 0.008/ 0.001	0.075/ 0.076/ 0.022	
<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangbuk-do, Южная Корея	1.0/ 42/ 24	0.8/ 32/ 18	0.8/ 30/ 6	0.8/ 27/ 8	0.8/ 28/ 8	0.7/ 25/ 6		0.002/ 0.002/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangnam-do, Южная Корея	1.0/ 43/ 25	0.8/ 31/ 19	0.8/ 27/ 7	0.8/ 28/ 9	0.8/ 27/ 9	0.7/ 24/ 7	0.2/ 7/ 1		0.008/ 0.008/ 0.001	0.009/ 0.009/ 0.001	0.078/ 0.079/ 0.022	
<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 01	1.4/ 56/ 24	1.4/ 54/ 24	0.9/ 36/ 8	0.8/ 31/ 10	0.9/ 36/ 8	0.8/ 31/ 6	0.8/ 32/ 8	0.9/ 33/ 9		0.001/ 0.001/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022	
<i>A. c. indica</i> , Taichung, Тайвань 02	1.4/ 56/ 23	1.4/ 54/ 23	1.0/ 38/ 9	0.8/ 31/ 11	0.9/ 34/ 9	0.8/ 29/ 7	0.9/ 34/ 9	0.9/ 35/ 10	0.1/ 4/ 1		0.076/ 0.077/ 0.022	
<i>A. m. mellifera</i> , Warsaw, Польша	9.0/ 311/ 157	9.1/ 312/ 158	8.7/ 296/ 143	8.7/ 297/ 145	8.7/ 295/ 146	8.6/ 292/ 144	8.7/ 298/ 147	8.8/ 300/ 148	8.8/ 297/ 145	8.7/ 295/ 146		

вательности *NC1*. Филогенетический анализ последовательности второго некодирующего межгенного участка *NC2* выявил шесть гаплотипов *A. cerana* (*Japan1*, *Nepal1*, *ThaiS1*, *BurmaN1*, *BurmaN2* и *BurmaN3*), подразделенных на две группы – материковая Азия и Sundaland [41]. По нуклеотидной последовательности *NC2* *A. c. ussuriensis* относится к гаплотипу материковой Азии *Japan1*. Вероятно, что присутствие гаплотипа *Japan1* во всех

популяциях *A. cerana* в Азии свидетельствует об общем происхождении всей популяции *A. cerana* и последующем распространении по всей Азии. Таким образом, по некодирующим межгенным участкам *NC1* и *NC2* *A. c. ussuriensis* относится к континентальной азиатской группе *A. cerana* и отличается от популяций *A. c. cerana*, *A. c. koreana* и *A. c. japonica*. Предполагается, что генетические различия *A. c. ussuriensis* являются результатом

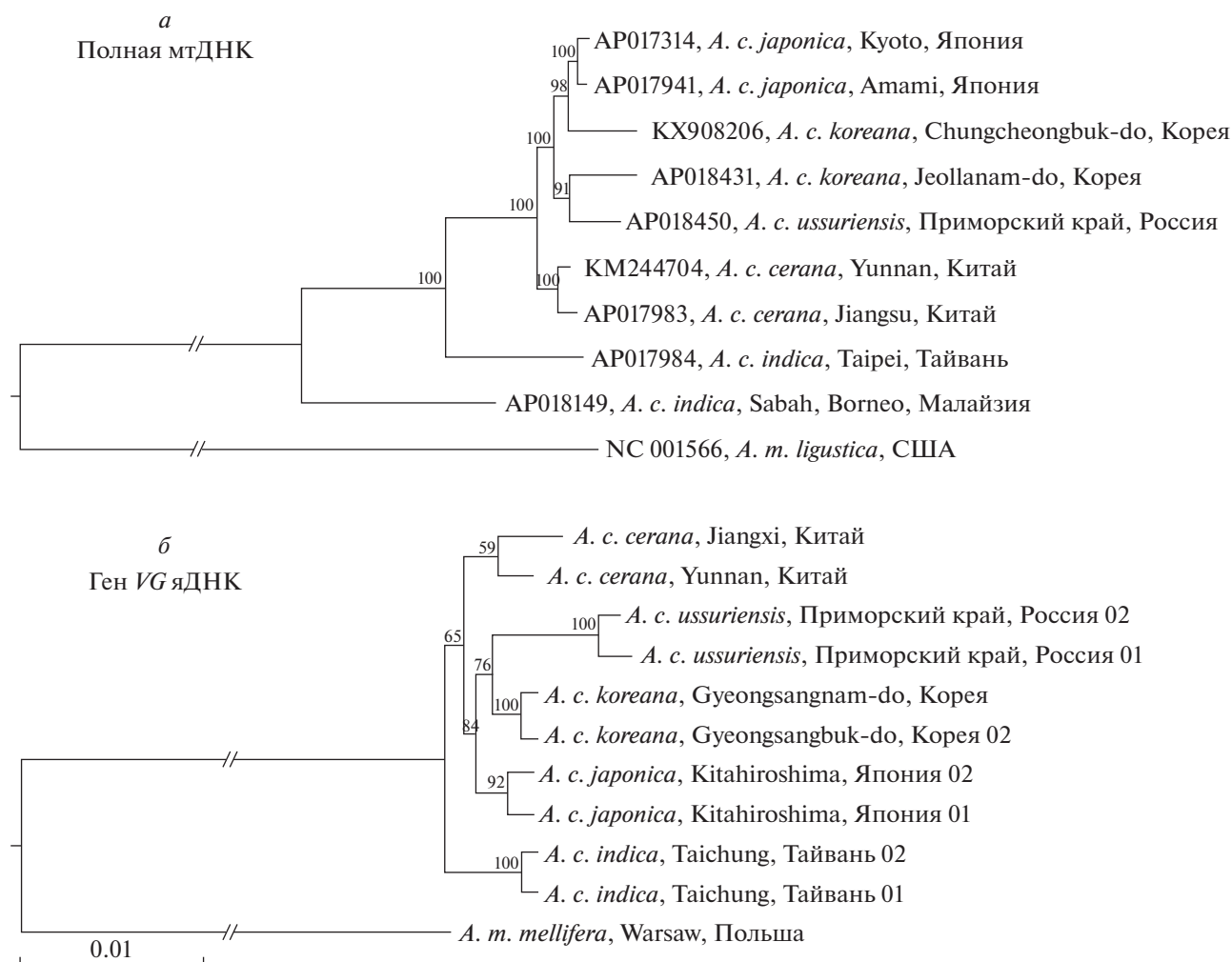


Рис. 3. Филогенетические взаимоотношения представителей *A. cerana* разных популяций на основе кластерного анализа методом ближайшего соседа и генетических дистанций Jukes–Cantor. *а* – на основе последовательности полной мтДНК; *б* – на основе последовательности гена *VG* яДНК.

естественного отбора и адаптивной эволюции *A. cerana* в условиях резко континентального климата Приморского края.

Локальные свойства мутационного процесса можно описывать не только вероятностью однонуклеотидных мутаций на сайт, но и соотношением транзиций (*tr*) к трансверсиям (*tv*). Отношение *tr/tv* считается базовой характеристикой мутационного процесса и является широко употребляемой однопараметрической характеристикой мутационного спектра. Для большинства известных эукариот в норме отношение *tr/tv* > 1, в то время как *tr/tv* < 1 свидетельствует о том, что повысилась частота однонуклеотидных мутаций, инсерций или делеций (инделов) или понизилась эффективность репарации ДНК. Изменчивость отношения *tr/tv* в геноме может свидетельствовать в пользу локальной смены мутационного механиз-

ма в ходе адаптации к сменяющимся условиям окружающей среды [42–44].

Отношение транзиций к трансверсиям полной мтДНК было 2.46 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. cerana*; 2.14 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. japonica*; 2.11 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. koreana*; 2.39 между *A. c. ussuriensis* и *A. c. indica*; 0.47 между *A. c. ussuriensis* и *A. m. ligustica* (табл. 3), что сходно с соотношением *tr/tv* мтДНК 2.06 между *Drosophila melanogaster* и *D. yakuba* [45]. Наименьшее значение отношения *tr/tv* между *A. cerana* и *A. mellifera* 0.47 является свидетельством смены мутационного механизма в ходе приспособления к сменяющимся условиям окружающей среды в результате дивергенции и аллопатрического видообразования.

Генетические дистанции Jukes–Cantor, Tamura–Nei, *p*-distance по полной мтДНК и *VG* яДНК показали, что их абсолютные значения не расходятся сильно и могут быть успешно использованы в

кластерном анализе. По каждому из дистанций можно получить сходный паттерн кластеризации. Было выявлено, что подвид *A. c. ussuriensis* генетически более близок к *A. c. japonica* (дивергенция 1.10% по мтДНК и 0.93% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.005 по мтДНК и 0.009 по гену *VG* яДНК) и *A. c. koreana* (дивергенция 1.30% по мтДНК и 0.90% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.005 по мтДНК и 0.012 по гену *VG* яДНК), *A. c. cerana* (дивергенция 2.55% по мтДНК и 1.25% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.006 по мтДНК и 0.012 по гену *VG* яДНК), чем к *A. c. indica* (дивергенция 5.15% по мтДНК и 1.50% по гену *VG* яДНК; дистанции Jukes–Cantor 0.032 по мтДНК и 0.013 по гену *VG* яДНК) (табл. 4, 5). Таким образом, по генетическим дистанциям и дивергенции наблюдается подразделение подвидов на две группы – Северной и Южной Азии.

Филогенетические деревья, построенные по полной мтДНК и гену *VG* яДНК, показали сходство в кластеризации на две группы – Южной и Северной Азии (рис. 3). Образцы *A. mellifera* располагаются отдельно и служат в качестве внешней группы. Все подвиды *A. cerana*, за исключением *A. c. koreana*, группируются в отдельные кластеры по полной мтДНК и гену *VG* яДНК, что свидетельствует о том, что отцовская и материнская составляющие генома географически распространялись совместно. Это возможно при естественной миграции, а также при перемещении пчеловодом семей пчел. В случае с *A. c. koreana* представители этого подвида группировались по мтДНК как с *A. c. japonica*, так и с *A. c. ussuriensis*, что может быть следствием потока генов по материнской линии от этих подвидов в популяцию *A. c. koreana*, ареал которой расположен географически между ними. Такое может произойти в результате импорта маток *A. c. japonica* и *A. c. ussuriensis* в Южную Корею, где они в дальнейшем скрещивались с местными трутнями *A. c. koreana*.

Как известно, диапазон генетической дивергенции 0.80–8.00% и генетическая дистанция Jukes–Cantor 0.005–0.100 соответствовали диапазону внутривидовых уровней различий у насекомых [19, 25, 46, 47]. Значения генетической дивергенции и генетической дистанции по мтДНК и гену *VG* яДНК между *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica* находятся в пределах внутривидовых различий между подвидами.

Поскольку дивергенция мтДНК идет со скоростью 2.3% на 1 млн лет [48, 49], можно рассчитать, что возраст изоляции и последующей дивергенции *A. c. ussuriensis* может составлять 0.50 млн лет (1.10%) с *A. c. japonica*, 0.56 млн лет (1.30%) с *A. c. koreana*, 1.1 млн лет (2.55%) с *A. c. cerana*, 2.2 млн лет (5.15%) с *A. c. indica* (табл. 4, 5). Можно предполо-

жить, что вероятное время возникновения подвидов *A. cerana* около 2–1 млн лет назад.

Таким образом, *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 наименее изученный из всех подвидов в связи с тем, что встречается редко и только в диком виде в лесах Приморского и Хабаровского краев до 47°54' с.ш. Генетические исследования подвида представляют большой интерес для науки, поскольку подвид подвержен естественному отбору и адаптивной эволюции, где все признаки пчел должны формироваться критическими условиями Северной Азии. Мы секвенировали и аннотировали последовательности полной мтДНК пчел подвидов *A. c. ussuriensis* (AP018450) и *A. c. koreana* (AP018431) и шести экзонов гена вителлогенина *VG* яДНК подвидов *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica*. Последовательность мтДНК имеет длину 15919 пн, содержит АТ 84% и GC 16%, включает 22 гена тРНК, 13 белок-кодирующих генов, два гена рибосомной РНК *16S* и *12S rRNA*, один АТ-богатый регион и четыре некодирующие межгенные области *NC1–4*. Все белок-кодирующие гены начинаются с кодонов АТТ и АТГ, за исключением гена *ATP8* со стартовым кодоном АТС, а заканчивается стоп-кодонами ТАА и TAG. Было показано, что по *NC1* участку *A. c. koreana* относится к гаплотипу *ACNC110*, а *A. c. ussuriensis* – к гаплотипу *ACNC111*, тогда как по участку *NC2* оба подвида относятся к гаплотипу *Japan1*. Методом кластерного анализа последовательностей мтДНК и гена *VG* яДНК было показано разделение подвидов пчел на две группы – южных регионов (*A. c. indica*) и северных регионов (*A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*). Было показано, что подвид *A. c. ussuriensis* генетически более сходен с *A. c. japonica*, *A. c. koreana* и *A. c. cerana*, чем с *A. c. indica*. Значения генетической дивергенции (0.80–8.00%) и генетической дистанции Jukes–Cantor (0.005–0.100) по мтДНК и гену *VG* яДНК между подвидами *A. c. ussuriensis* Ilyasov et al., 2019, *A. c. koreana* Ilyasov et al., 2019, *A. c. japonica* Radoszkowski, 1887, *A. c. cerana* Fabricius, 1793, *A. c. indica* Fabricius, 1798 находятся в пределах внутривидовых различий между подвидами.

Авторы благодарны доктору Hisashi Okuyama за помощь в секвенировании, а также фонду e-ASIA JRP (The East Asia Science and Innovation Area Joint Research Program) за поддержку в выполнении проекта (<https://www.the-easia.org>).

Работа выполнена при поддержке государственного задания (регистрационный номер АААА-А21-121011990120-7) (И.Р.), гранта Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (№ 19-54-70002 e-Asia_t) (Н.А.) и программ постдокторских исследований в Инчхонском Национальном университете за 2017–2019 годы (И.Р.).

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.* Breeding Techniques and Selection for Breeding of the Honeybee. Derby, UK: British Isles Bee Breeders Association, 1988. 150 p.
2. *Прощалькин М.Ю., Новомодный Е.В., Безбородов В.Г., Кошкин Е.С.* Первые современные находки восковой пчелы *Apis cerana* Fabricius, 1793 (Hymenoptera, Apidae) в Хабаровском крае // Евразийский энтомолог. журн. 2014. Т. 13. № 3. С. 295–298.
3. *Кузнецов В.Н.* Китайская восковая пчела *Apis cerana* F. (Hymenoptera, Apidae) на Дальнем Востоке России. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2005. 112 с.
4. *Behura S.K.* Analysis of nuclear copies of mitochondrial sequences in honeybee (*Apis mellifera*) genome // Mol. Biol. Evol. 2007. V. 24. № 7. P. 1492–1505. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm068>
5. *Choi Y.S., Lee M.Y., Hong I.P. et al.* Occurrence of sacbrood virus in Korean apiaries from *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) // J. Apiculture. 2010. V. 25. № 3. P. 187–191.
6. *Koetz A.H.* Ecology, behaviour and control of *Apis cerana* with a focus on relevance to the Australian incursion // Insects. 2013. V. 4. № 4. P. 558–592. <https://doi.org/10.3390/insects4040558>
7. *Vung N., Lee M.-L., Lee M.-Y. et al.* Breeding and selection for resistance to sacbrood virus for *Apis cerana* // J. Apiculture. 2017. V. 32. P. 345–352. <https://doi.org/10.17519/apiculture.2017.11.32.4.345>
8. *Песенко Ю.А., Лелей А.С., Радченко В.Г., Филаткин Г.Н.* Китайская восковая пчела *Apis cerana cerana* F. (Hymenoptera, Apidae) на Дальнем Востоке СССР // Энтомолог. обозрение. 1989. Т. 68. № 3. С. 527–548.
9. *Zhuang D.* New subspecies of *Apis cerana* (in Chinese) // Southwest China J. Agricultural Sci. 1989. V. 2. P. 61–65.
10. *Zhen-ming J., Yang G., Huang S. et al.* The advancement of beekeeping science and technology in China // Honeybees in Mountain Agriculture / Ed. Verma L.R. New Delhi: Oxford and IBH Publ. Co., 1992. 274 p.
11. *Diniz-Filho J.A.F., Malapsina O., Pignata M.I.B.* Geographic variation in *Apis cerana indica* F.: A spatial autocorrelation analysis of morphometric patterns // J. Apicultural Res. 1993. V. 32. № P. 65–72. <https://doi.org/10.1080/00218839.1993.11101289>
12. *Engel M.S.* The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera, Apidae, Apis) // J. Hymenoptera Res. 1999. V. 8. № 2. P. 165–196. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-718>
13. *Sugawara M.* Feral colonies of Japanese honey bees, *Apis cerana japonica* and their life history. 2. Natural nests and swarming // Mitsubachi Kagaku (Honeybee Science). 2000. V. 21. № 1. P. 35–39.
14. *Hepburn H.R., Smith D.R., Radloff S.E., Otis G.W.* Intraspecific categories of *Apis cerana*: morphometric, allozymal and mtDNA diversity // Apidologie. 2001. V. 32. № 1. P. 3–23. <https://doi.org/10.1051/apido:2001108>
15. *Takahashi J., Yoshida T.* The origin of Japanese honey bee *Apis cerana japonica* inferred from mitochondrial DNA // Mitsubachi Kagaku (Honeybee Science). 2003. V. 24. № 2. P. 71–76.
16. *Radloff S.E., Hepburn C., Hepburn R.H. et al.* Population structure and classification of *Apis cerana* // Apidologie. 2010. V. 41. № 6. P. 589–601. <https://doi.org/10.1051/apido/2010008>
17. *Takahashi J., Wakamiya T., Kiyoshi T. et al.* The complete mitochondrial genome of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) // Mitochondrial DNA Part B. 2016. V. 1. № 1. P. 156–157. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1144108>
18. *Ilyasov R.A., Park J., Takahashi J., Kwon H.W.* Phylogenetic uniqueness of honeybee *Apis cerana* from the Korean peninsula inferred from the mitochondrial, nuclear, and morphological data // J. Apicultural Sci. 2018. V. 62. № 2. P. 189–214. <https://doi.org/10.2478/Jas-2018-0018>
19. *Ilyasov R.A., Han G.Y., Lee M.L. et al.* Phylogenetic relationships of Russian Far-East *Apis cerana* with other north Asian populations // J. Apicultural Sci. 2019. V. 63. № 2. P. 297–322. <https://doi.org/10.2478/JAS-2019-0024>
20. *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. № 2. P. 393–403.
21. *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. № 3. P. 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1992.tb00170.x>
22. *Garnery L., Mosshine E.H., Oldroyd B.P., Cornuet J.-M.* Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations // Mol. Ecol. 1995. V. 4. P. 465–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1995.tb00240.x>
23. *Arias M.C., Sheppard W.S.* Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence // Molecular Phylogenet. Evol. 1996. V. 5. № 3. P. 557–566. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0050>
24. *Songrarn O., Sittipraneed S., Klinbunga S.* Mitochondrial DNA diversity and genetic differentiation of the honeybee (*Apis cerana*) in Thailand // Biochem. Genet. 2006. V. 44. № 5–6. P. 256–269. <https://doi.org/10.1007/s10528-006-9030-5>
25. *Tan H.W., Liu G.H., Dong X. et al.* The complete mitochondrial genome of the Asiatic cavity-nesting honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) // PLoS One.

2011. V. 6. № 8. P. e23008.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023008>
26. Kent C.F., Issa A., Bunting A.C., Zayed A. 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.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05299.x>
27. Bernt M., Donath A., Jühling F. et al. MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. V. 69. № 2. P. 313–319.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023>
28. Lowe T.M., Eddy S.R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence // Nucl. Ac. Res. 1997. V. 25. № 5. P. 955–964.
<https://doi.org/10.1093/nar/25.5.0955>
29. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with Chain-terminating inhibitors // PNAS USA 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
30. Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of protein molecules // Mammalian Protein Metabolism / Ed. Munro H.N. N. Y.: Acad. Press, 1969. P. 21–132.
31. Tamura K., Battistuzzi F.U., Billings-Ross P. et al. Estimating divergence times in large molecular phylogenies // PNAS USA. 2012. V. 109. № 47. P. 19333–19338.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1213199109>
32. Nei M., Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000. 333 p.
33. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
34. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. V. 4. № 4. P. 406–425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
35. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. № 3. P. 512–526.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
36. 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.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x>
37. Okuyama H., Tingek S., Takahashi J. The complete mitochondrial genome of the cavity-nesting honeybee, *Apis cerana* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) from Borneo // Mitochondrial DNA Part B. 2017. V. 2. № 2. P. 475–476.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1361344>
38. Kent C.F., Minaei S., Harpur B.A., Zayed A. Recombination is associated with the evolution of genome structure and worker behavior in honey bees // PNAS USA. 2012. V. 109. № 44. P. 18012–18017.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1208094109>
39. Lee J.Y., Wang A.R., Choi Y.S. et al. Mitochondrial DNA variations in Korean *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) and development of another potential marker // Apidologie. 2016. V. 47. № 1. P. 123–134.
<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0381-y>
40. Tan Y.D., Wan C.L., Zhu Y.F. et al. An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm // Genetics. 2001. V. 157. № 3. P. 1277–1284.
41. Smith C.R., Smith C.D., Robertson H.M. et al. Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus* // PNAS USA. 2011. V. 108. № 14. P. 5667–5672.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007901108>
42. Tian D., Wang Q., Zhang P. et al. Single-nucleotide mutation rate increases close to insertions/deletions in eukaryotes // Nature. 2008. V. 455. № 7209. P. 105–108.
<https://doi.org/10.1038/nature07175>
43. McDonald M.J., Wang W.C., Huang H.D., Leu J.Y. Clusters of nucleotide substitutions and insertion/deletion mutations are associated with repeat sequences // PLoS Biology. 2011. V. 9. № 6. P. e1000622.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000622>
44. Koren A., Polak P., Nemesh J. et al. Differential relationship of DNA replication timing to different forms of human mutation and variation // Am. J. Hum. Genet. 2012. V. 91. № 6. P. 1033–1040.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.10.018>
45. Seplyarskiy V.B., Kharchenko P., Kondrashov A.S., Bazzykin G.A. Heterogeneity of the transition/transversion ratio in *Drosophila* and Hominidae genomes // Mol. Biol. Evol. 2012. V. 29. № 8. P. 1943–1955.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mss071>
46. Han T., Lee W., Lee S. et al. 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>
47. Eimanifar A., Kimball R.T., Braun E.L. et al. 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>
48. DeSalle R., Freedman T., Prager E.M., Wilson A.C. Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila* // J. Mol. Evol. 1987. V. 26. № 1–2. P. 157–164.
<https://doi.org/10.1007/BF02111289>
49. Johns G.C., Avise J.C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial Cytochrome B gene // Mol. Biol. Evol. 1998. V. 15. P. 1481–1490.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025875>

Genetic Properties and Evolution of Ussurian Wax Bee *Apis cerana ussuriensis* from the Primorsky Territory of Russia

R. A. Ilyasov^{a, b, *}, G. Y. Han^b, M. L. Lee^b, K. W. Kim^b, M. Y. Proshchalykin^c, A. S. Lelej^c,
J. H. Park^{b, d}, J. I. Takahashi^e, H. W. Kwon^{b, **}, and A. G. Nikolenko^a

^aUfa Federal Research Center, Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^bDivision of Life Sciences, Major of Biological Sciences, Incheon National University Convergence Research Center for Insect Vectors, Incheon National University, Incheon, 22012 Korea

^cFederal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

^dBioinformatics Company 3BIGS CO.LTD, Hwaseong-si, 18454 Korea

^eFaculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Kyoto, 603-8555 Japan

*e-mail: apismell@hotmail.com

**e-mail: hwkwon@inu.ac.kr

A. c. ussuriensis is the most northern subspecies of the honey bee *A. cerana*, distributed in the taiga of Primorsky and Khabarovsk territories up to 47°54' N. Genetic studies of this subspecies are of great interest for science and beekeeping, since all adaptive characters were formed under the influence of the environment without human intervention. We sequenced and annotated the complete mitochondrial DNA (*mtDNA*) sequences of honey bee subspecies *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 (*AP018450*) from Primorsky Territory and *Apis cerana koreana* Ilyasov et al., 2019 (*AP018431*) from South Korea and six exons of the gene vitellogenin *VG E2–E7* of nuclear DNA (nDNA) of honey bee subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, and *A. c. indica* Fabricius, 1798. The method of cluster analysis of the sequences of *mtDNA* and the gene *VG* of nDNA showed the separation of bees into two groups, including the southern subspecies *A. c. indica* and northern subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*. Based on genetic divergence, it was shown that the subspecies *A. c. ussuriensis* is genetically close to *A. c. japonica*, *A. c. koreana* and *A. c. cerana* than with a subspecies *A. c. indica*. Values of genetic divergence (0.80–8.00%) and Jukes-Cantor genetic distance (0.005–0.100) for *mtDNA* and gene *VG* of nDNA between *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica* are within intraspecies differences between insect subspecies. The estimated time of origin of *A. cerana* subspecies was rated about 2–1 million years ago.

Keywords: *Apis cerana*, *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica*, mitochondrial genome, subspecies, divergence, evolution, Primorsky Territory, vitellogenin, *mtDNA*, nDNA.

Genetic Properties and Evolution of Asian Honey Bee *Apis cerana ussuriensis* from Primorsky Krai, Russia

R. A. Ilyasov^{a, b, *}, G. Y. Han^b, M. L. Lee^b, K. W. Kim^b, M. Y. Proshchalykin^c,
A. S. Lelej^c, J. H. Park^d, J. I. Takahashi^e, H. W. Kwon^{b, **}, and A. G. Nikolenko^a

^a Ufa Federal Research Center, Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

^b Division of Life Sciences, Major of Biological Sciences, Incheon National University,
Convergence Research Center for Insect Vectors, Incheon National University, Incheon, 22012 Korea

^c Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
Vladivostok, 690022 Russia

^d 3BIGS CO., LTD., Hwaseong-si, 18454 Korea

^e Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University, Kyoto, 603-8555 Japan

*e-mail: apismell@hotmail.com

**e-mail: hwkwon@inu.ac.kr

Received June 16, 2020; revised September 4, 2020; accepted October 9, 2020

Abstract—*Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 is the northernmost subspecies of the Asian honey bee *A. cerana* Fabricius, 1793, common in the forests of Primorsky krai and Khabarovsk krai as far as 47°54' N. Genetic studies of this subspecies are of great interest for science and apiculture, since all its adaptive traits were formed under the influence of the natural environment without human interference. We sequenced and annotated the complete mitochondrial DNA (mtDNA) sequences of bees of subspecies *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 (Genbank accession number AP018450) from Primorsky krai and *Apis cerana koreana* Ilyasov et al., 2019 from South Korea, as well as six exons of the nuclear DNA (nDNA) vitellogenin *VG E2–E7* gene of bee subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica* Radoszkowski, 1887, *A. c. cerana*, and *A. c. indica* Fabricius, 1798. Cluster analysis of the mtDNA and the nDNA *VG* gene sequences showed the division of bees into two groups, the southern subspecies *A. c. indica* and the northern subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, and *A. c. cerana*. On the basis of the genetic divergence, we showed that subspecies *A. c. ussuriensis* was genetically closer to subspecies *A. c. japonica*, *A. c. koreana*, and *A. c. cerana* than to subspecies *A. c. indica*. Values of genetic divergence (0.80%–8.00%) and Jukes–Cantor genetic distance (0.005–0.100) for mtDNA and nDNA *VG* gene between subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, and *A. c. indica* are within the range of intraspecific differences between insect subspecies. The estimated time of the emergence of the *A. cerana* subspecies is from two to one million years ago.

Keywords: *Apis cerana*, *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, *A. c. indica*, mitochondrial genome, subspecies, divergence, evolution, Primorsky krai, vitellogenin, mtDNA, nDNA

DOI: 10.1134/S1022795421050033

INTRODUCTION

The Asian honey bee *Apis cerana* Fabricius, 1793 is the second most important for humans after the honey bee *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Until recently, their natural distribution ranges did not overlap, being limited to Europe and Africa for *A. mellifera* and Asia for *A. cerana*. Both bee species are adapted to a wide range of climatic zones, from cold temperate to hot equatorial [1]. In Asian countries, *A. cerana* is bred in apiaries; in Russia, it is only found in the wild in the Far Eastern forests in the Khabarovsk krai and Primorsky krai as far as 47°54' N and is included in the Red Book [2, 3]. V.N. Kuznetsov [3] found wild *A. cerana* families living in the hollows of 80 trees and suggested that more than 1000 families of the Asian honey bee

inhabit the forests of the Primorsky krai and Khabarovsk krai as far as 47°54' N.

The Asian honey bee *A. cerana* is a well-known important pollinator of agricultural crops in Asia and the producer of honey, wax, royal jelly, and bee pollen [4]; the scale of its commercial use is comparable to the honey bee *A. mellifera* and it possesses high potential for genetic improvement using selective breeding on the basis of molecular markers. Recently, the numbers of *A. cerana* have sharply decreased in Asian countries because of the spread of the sacbrood virus 1 (SBV) and of the mass import of *A. mellifera* [5–7].

According to the published data, there are more than 20 subspecies within *A. cerana*, most of which do not have clear taxonomic diagnoses [8–19]. Preserva-

tion of the gene pool of local *A. cerana* subspecies is possible with the application of marker-mediated identification and selection. Molecular genetic studies provide the means for the development of basic strategies for the conservation of *A. cerana*. Mitochondrial DNA (mtDNA) markers are effective tools in the study of evolution and inter- and intraspecific phylogenetic relationships of honey bees [18, 20–25].

In this study, we sequenced and annotated the complete mitochondrial DNA (mtDNA) sequences of the bees of subspecies *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 (GenBank/DBJ AP018450) (ZooBank 06874b0a-029b-40e2-b4a8-1a20f7692ed3) from the Primorsky krai and *Apis cerana koreana* Ilyasov et al., 2019 (GenBank/DBJ AP018431) (ZooBank 290E12BA-FC5F-4907-AE50-EF0FA8DC8D9C) from South Korea, as well as six exons of the vitellogenin *VG E2–E7* nuclear DNA (nDNA) gene of bee subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, and *A. c. indica*. We assessed the phylogenetic relationships of *A. c. ussuriensis* with other subspecies from South Korea, China, Japan, Taiwan, and Indonesia on the basis of the complete mtDNA and the nDNA *VG* gene.

MATERIALS AND METHODS

Ten adult worker bees were selected from each of the following families: *A. c. ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 from a hollow in the forest in the vicinity of Vladivostok, Primorsky krai, Russia (43°11' N 132°55' E); *A. c. koreana* Ilyasov et al., 2019 from the Gokseong-gun apiary, Gokseong-eup, Hakjung-ri, Jeollanam-do, South Korea (35°24' N, 127°27' E); from the Sangju-si apiary, Gyeongsangbuk-do, South Korea (36°42' N, 128°18' E); from the Sancheong-gun apiary, Gyeongsangnam-do, South Korea (35°36' N., 128°88' E); *A. c. japonica* from the Kitahiroshima apiary, Hokkaido, Japan (42°95' N, 141°53' E); *A. c. indica* from Taichung Apiary, Taiwan (24°04' N, 120°73' E). The species identification of *A. cerana* bees was performed morphometrically according to V.N. Kuznetsov [3].

Total DNA was extracted from the thoracic muscle tissue of each bee using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, Madison, WI, United States) according to the manufacturer's recommendations. DNA samples were stored at –20°C until further use. PCR of exons 2–7 of the vitellogenin gene (*VG*) was conducted in a Applied Biosystems Veriti HID 96-well thermal cycler on the basis of the already developed primers [26] with a TaKaRa PCR kit (100 µL PCR × 100 reactions) (TAKARA BIO INC., Shiga, Japan) according to the manufacturer's instructions. All PCR products were purified using the QIAquick PCR Purification Kit (250) (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions.

One worker from each bee colony was used for mtDNA sequencing using the NextSeq 500/550 High Output Kit v. 2 (75 cycles) (ILLUMINA, United States) and paired-end reads (2 × 150 bp), following the manufacturer's instructions, with an Illumina Next Seq 500 sequencer (ILLUMINA, United States) at Kyoto Sangyo University (Kyoto, Japan). Genomic libraries were prepared using a Nextera DNA library preparation kit (ILLUMINA, United States) according to the manufacturer's instructions. Genomes were assembled on the basis of 1 662 000 reads with a 75x mean coverage using Geneious R9 (BIOMATTERS, New Zealand). The genome was annotated using MITOS (Germany) [27] and tRNAscan-SE (CA, USA) [28]. One worker from each bee colony was used for sequencing exons of the nDNA vitellogenin *VG* gene from both ends using the Sanger method [29] with the ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 kit on an ABI 3130 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) at Incheon National University (Incheon, South Korea).

The complete mtDNA nucleotide sequences were deposited into the GenBank/DBJ databases under accession numbers AP018431 for *A. c. koreana* (15925 bp) (ZooBank 290E12BA-FC5F-4907-AE50-EF0FA8DC8D9C) (Gokseong-gun, Jeollanam-do, South Korea) and AP018450 for *A. c. ussuriensis* (15 919 bp) (ZooBank 06874b0a-029b-40e2-b4a8-1a20f7692ed3) (Primorsky krai, Russia). The nucleotide sequences of exons 2–7 of the *VG* gene were deposited under the accession numbers MH755745, MH755780, MH755815, MH755850, MH755885, and MH755920 (4125 bp) and MH755746, MH755781, MH755816, MH755851, MH755886, and MH755921 (4125 bp) for two specimens of *A. c. ussuriensis* (Primorskiy krai, Russia); accession numbers MH755735, MH755770, MH755805, MH755840, MH755875, and MH755910 for *A. c. koreana* (Sancheong, Gyeongsangnam-do, South Korea); MH755741, MH755776, MH755811, MH755846, MH755881, and MH755916 (4125 bp) and MH755742, MH755777, MH755812, MH755847, MH755882, and MH755917 (4125 bp) for *A. c. japonica* (Kitahiroshima, Hokkaido, Japan); and MH755747, MH755782, MH755817, MH755852, MH755887, and MH755922 (4128 bp) and MH755748, MH755783, MH755818, MH755853, MH755888, and MH755923 (4128 bp) for *A. c. indica* (Taichung, Taiwan).

Comparative analysis of total mtDNA was performed using the following sequences from Genbank: *A. c. japonica* AP017314 (15 917 bp) (Kyoto, Japan), *A. c. japonica* AP017941 (15 778 bp) (Amami, Japan), *A. c. cerana* AP017983 (15 460 bp) (Jiangsu, China), *A. c. cerana* KM244704 (15 712 bp) (Yunnan, China), *A. c. indica* AP017984 (15 376 bp) (Taipei, Taiwan), *A. c. indica* AP018149 (15884 bp) (Sabah, Borneo, Malaysia), *A. c. koreana* AP018431 (15 925 bp) (Jeollanam-do, South Korea), *A. c. koreana* KX908206 (15904 bp) (Chungcheongbukdo, South Korea), and

A. m. ligustica NC 001566 (16 324 bp) (outgroup, United States). Comparative analysis of the *VG*nDNA gene was performed using the following sequences from Genbank: *A. c. cerana* KT725235 (4125 bp) (Yunnan, China), *A. c. cerana* ApisCC1.0 (4125 bp, fragment 781683–788069 from the genomic sequence KZ288206) (Yunnan, China), *A. m. mellifera* JN557295, JN557387, JN557201, JN557573, JN557481, and JN557109 (4074 bp) (outgroup, isolate M2261, Warsaw, Poland).

Divergence of nucleotide sequences and genetic Jukes–Cantor distance [30], Tamura–Nei distance [31], and *p*-distance [32] were calculated using Unipro UGENE 1.28 (UNIPRO, Russia) and CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Denmark). Phylogenetic analysis based on the DNA sequences was performed using MEGA7 [33] and Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, United States) and JMP14 (SAS Institute Inc., North Carolina, United States). Phylogenetic trees were constructed using the neighbor joining method [34] based on Jukes–Cantor distances with 1000 bootstrap replications and the Reltime [35] method for estimating the branch lengths. A physical map of the complete mitochondrial genome was constructed using CLC Genomics Workbench 11 (CLCbio, Denmark) and Artemis 17.0.1 (The Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK).

RESULTS

The mitochondrial genome of *A. c. ussuriensis* (Primorsky krai, Russia) contains 42% A, 42% T, 6% G, and 10% C nucleotides, is AT-enriched by 84%, and contains the highest frequencies of dinucleotides AA (19%), AT (18%), TT (18%), and TA (16%) and the lowest frequencies of dinucleotides GG (1%), GC (1%), CG (1%), and CC (2%), which is typical of the majority of Hymenoptera [25, 36, 37]. The average GC content in mtDNA of *A. c. ussuriensis* is 16%, and the maximum level does not exceed 40%. The value of genetic diversity and variability is in direct proportion to the GC composition: the higher the GC content, the higher the genetic diversity and gene variability. The GC content in mtDNA below 40% is considered low [38] (Table 1).

MtDNA of *A. c. ussuriensis* (15 919 bp) is slightly shorter than mtDNA of *A. mellifera* (16 343 bp) and *Drosophila yakuba* (16 019 bp). The sum of all intergenic noncoding regions of *A. c. ussuriensis* mtDNA (1252 bp) is also slightly shorter than that of *A. mellifera* (1639 bp) and *D. yakuba* (1262 bp) [36].

The mitochondrial genome of *A. c. ussuriensis* contains 30 protein-coding genes (CDS), 22 transport RNA (tRNA) genes, two genes of the ribosomal RNA (rRNA) subunits (*16S rRNA* and *12S rRNA*), and four noncoding intergenic regions (*NC1–NC4*). The synteny of *A. c. ussuriensis* mtDNA is similar to the mtDNA synteny in most Hymenoptera with slight dif-

ferences [25, 36]. The majority of the genes (*ATP6*, *ATP8*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *CYTB*, *ND2*, *ND3*, *ND6*, *tRNA-Ala*, *tRNA-Asn*, *tRNA-Asp*, *tRNA-Gln*, *tRNA-Glu*, *tRNA-Gly*, *tRNA-Ile*, *tRNA-Leu(UUR)*, *tRNA-Lys*, *tRNA-Met*, *tRNA-Ser(AGN)*, *tRNA-Ser(UCN)*, *tRNA-Thr*, and *tRNA-Trp*) are located on the light mtDNA strand, with the exception of four subunit genes (*ND1*, *ND4*, *ND4L*, and *ND5*), two rRNA genes (*12S* and *16S rRNA*), and eight tRNA genes (*tRNA-Arg*, *tRNA-Cys*, *tRNA-His*, *tRNA-Leu(CUN)*, *tRNA-Phe*, *tRNA-Pro*, *tRNA-Tyr*, and *tRNA-Val*), which are located on the heavy mtDNA strand (Table 2, Fig. 1).

Protein-coding genes *ND3*, *ND4L*, *ND5*, *COX1*, *ND6*, *COX2*, *ND1*, and *ND2* have the ATT start codon; genes *COX3*, *ATP6*, and *CYTB* have the ATG start codon; gene *ND4* has the ATA start codon, and gene *ATP8* has the ATC start codon. All protein-coding mtDNA genes of *A. c. ussuriensis* have the common TAA stop codon. Some mtDNA genes (*tRNA-Gln* and *tRNA-Ala* (4 bp), *ND2* and *tRNA-Cys* (1 bp), *COX1* and *tRNA-Leu(UUR)* (5 bp), *COX2* and *tRNA-Asp* (1 bp), and *ATP8* and *ATP6* (19 bp)) of *A. c. ussuriensis* typically have an overlap, which is possibly inherited from the prokaryotic genome with a polycistronic transcription type (Table 2).

The length of all protein-coding mtDNA genes of *A. c. ussuriensis* is 11 058 bp and they encode 3686 amino acids. The rRNA genes of *A. c. ussuriensis* mtDNA have a total size of 2116 bp (*12S rRNA* is 787 bp and *16S rRNA* is 1329 bp). The length of tRNA genes of *A. c. ussuriensis* mtDNA ranges from 60 bp (*tRNA-Ser(AGN)*) to 78 bp (*tRNA-Pro*).

The mtDNA of *A. c. ussuriensis* contains four noncoding intergenic regions (*NC1–NC4*), which is typical of all subspecies of *A. cerana* [39]. The noncoding intergenic region *NC1* (228 bp) is located between the *tRNA-Met* and *tRNA-Gln* genes, *NC2* (89 bp) is between the *tRNA-Leu* (TAA) and *COX2* genes, *NC3* (68 bp) is between the *COX3* and *tRNA-Gly* genes, and *NC4* (51 bp) is between the *tRNA-Pro* and *ND6* genes. All noncoding intergenic and AT-rich regions in *A. c. ussuriensis* amount to less than 8% of the total mtDNA size. Noncoding intergenic and AT-rich regions are regulatory and contain repetitive motifs. The AATTAATT motif was found in mtDNA of *A. c. ussuriensis* 48 times; the AATAAATT motif, 74 times; and the TACTTA motif, a likely binding site for the mitochondrial transcription terminator (mtTERM), 8 times [40].

Noncoding intergenic region *NC2* in *A. c. ussuriensis* was identical to the haplotype *Japan01* (sequences KP064995 and AP018431) and was not identical to any of the ten published haplotypes (*ACNC101–ACNC110*) [18, 19, 39]; it was designated as haplotype *ACNC111* (Fig. 2). The *ACNC111* haplotype is the most similar to the *ACNC101* haplotype (sequences KP064870 and KP064972) and differs in the 31inst

Table 1. Characteristics of nucleotide composition of complete mtDNA in *A. c. ussuriensis* from Primorsky krai, Russia

Nucleotides	Number (frequency)
GC composition	2540 (0.16)
AT composition	13 373 (0.84)
Adenine A	6729 (0.42)
Cytosine C	1542 (0.10)
Guanine G	998 (0.06)
Thymine T	6644 (0.42)
Dinucleotide AA	2973 (0.19)
Dinucleotide AC	475 (0.03)
Dinucleotide AG	358 (0.02)
Dinucleotide AT	2921 (0.18)
Dinucleotide CA	675 (0.04)
Dinucleotide CC	239 (0.02)
Dinucleotide CG	70 (0.01)
Dinucleotide CT	558 (0.04)
Dinucleotide GA	471 (0.03)
Dinucleotide GC	116 (0.01)
Dinucleotide GG	136 (0.01)
Dinucleotide GT	275 (0.02)
Dinucleotide TA	2609 (0.16)
Dinucleotide TC	712 (0.05)
Dinucleotide TG	432 (0.03)
Dinucleotide TT	2886 (0.18)
Nucleotide A in position 1/2/3	240 (0.47)/128 (0.25)/249 (0.48)
Nucleotide C in position 1/2/3	37 (0.07)/70 (0.14)/22 (0.04)
Nucleotide G in position 1/2/3	50 (0.1)/19 (0.04)/11 (0.02)
Nucleotide T in position 1/2/3	188 (0.37)/298 (0.58)/233 (0.45)
Size, bp	15919
Strain weight, kDa	4904.98

insertion relative to the beginning of the *NCI* sequence (Fig. 2).

Comparative analysis of the complete mtDNA sequence made it possible to calculate transitions and transversions between bees in different populations of *A. cerana*. Similar to the genomes of most organisms, transitions in *A. cerana* are more frequent than transversions. Transitions and transversions between the *A. cerana* bees in different populations were calculated for the total mtDNA, as well as only for the protein-coding mtDNA genes. This makes it possible to assess the contribution of the coding and noncoding parts of the mitochondrial genome to the genetic variability. Notably, the role of the noncoding part of mtDNA in maintaining genetic variability is greater than that of the coding part (Table 3).

The divergence (%) between *A. c. japonica* and *A. c. cerana* was 2.85 and 0.80 based on mtDNA and

the *VG* nDNA gene, respectively; between *A. c. japonica* and *A. c. indica*, 5.26 and 0.85; between *A. c. japonica* and *A. c. koreana*, 1.33 and 0.80; between *A. c. cerana* and *A. c. indica*, 4.95 and 0.80; between *A. c. cerana* and *A. c. koreana*, 2.85 and 0.80; between *A. c. koreana* and *A. c. indica*, 5.45 and 0.88; between *A. c. ussuriensis* and *A. c. cerana*, 2.55 and 1.25; between *A. c. ussuriensis* and *A. c. japonica*, 1.10 and 0.93%; between *A. c. ussuriensis* and *A. c. koreana*, 1.30 and 0.90; between *A. c. ussuriensis* and *A. c. indica*, 5.15 and 1.50; between *A. c. ussuriensis* and *A. mellifera*, 21.05 and 9.05; between *A. c. koreana* and *A. mellifera*, 21.70 and 8.75; between *A. c. cerana* and *A. mellifera*, 21.70 and 8.70; between *A. c. japonica* and *A. mellifera*, 20.45 and 8.70; and between *A. c. indica* and *A. mellifera*, 21.35 and 8.75 (Tables 4 and 5).

On the basis of the cluster analysis of the complete sequences of mtDNA and of the nDNA *VG* gene, we constructed dendrograms for all the *A. cerana* speci-

Table 2. Annotation of complete mtDNA of *A. c. ussuriensis* from Primorsky krai, Russia

No.	Gene	Start position	Stop position	Size, bp
1	<i>tRNA-Ser(AGN)</i>	1	60	60
2	<i>tRNA-Glu</i>	64	129	66
3	<i>tRNA-Met</i>	164	229	66
4	<i>tRNA-Gln</i>	462	527	66
5	<i>tRNA-Ala</i>	524	589	66
6	<i>tRNA-Ile</i>	608	673	66
7	<i>ND2</i>	674	1669	996
8	* <i>tRNA-Cys</i>	1669	1734	66
9	* <i>tRNA-Tyr</i>	1740	1808	69
10	<i>tRNA-Trp</i>	1825	1893	69
11	<i>COX1</i>	1894	3459	1566
12	<i>tRNA-Leu(UUR)</i>	3455	3524	70
13	<i>COX2</i>	3614	4294	681
14	<i>tRNA-Asp</i>	4294	4361	68
15	<i>tRNA-Lys</i>	4368	4439	72
16	<i>ATP8</i>	4446	4607	162
17	<i>ATP6</i>	4589	5266	678
18	<i>COX3</i>	5284	6063	780
19	<i>tRNA-Gly</i>	6136	6202	67
20	<i>ND3</i>	6203	6556	354
21	* <i>tRNA-Arg</i>	6577	6645	69
22	<i>tRNA-Asn</i>	6665	6732	68
23	* <i>tRNA-Phe</i>	6751	6821	71
24	* <i>ND5</i>	6828	8495	1668
25	* <i>tRNA-His</i>	8496	8561	66
26	* <i>ND4</i>	8579	9910	1332
27	* <i>ND4L</i>	9913	10176	264
28	<i>tRNA-Thr</i>	10200	10266	67
29	* <i>tRNA-Pro</i>	10282	10359	78
30	<i>ND6</i>	10411	10923	513
31	<i>CYTB</i>	10936	12084	1149
32	<i>tRNA-Ser(UCN)</i>	12108	12174	67
33	* <i>ND1</i>	12187	13101	915
34	* <i>tRNA-Leu(CUN)</i>	13102	13170	69
35	* <i>16S rRNA</i>	13171	14499	1329
36	* <i>tRNA-Val</i>	14500	14566	67
37	* <i>12S rRNA</i>	14567	15353	787
	Complete mtDNA	1	15919	15919

* Gene transcribing from the heavy chain of mtDNA.

mens showing the phylogenetic relationships of *A. cerana* bees from different populations (Fig. 3). Specimens of *A. m. mellifera*, which were located separately from *A. cerana*, were used as an outgroup. Specimens

of *A. c. ussuriensis*, *A. c. cerana*, *A. c. japonica*, and *A. c. indica*, with the exception of *A. c. koreana*, were clustered on both dendrograms separately from each other. On the dendrogram based on mtDNA,

Table 4. Genetic distances (above diagonal) and genetic differences (below diagonal) between complete mtDNA sequences of *A. cerana* samples

<i>A. cerana</i> representatives		AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Primorsky krai, Russia	KM244704, <i>A. c. cerana</i> , Yunnan, China	AP017983, <i>A. c. cerana</i> , Jiangsu, China	AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Japan	AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Japan	KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Korea	AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Korea	AP017984, <i>A. c. indica</i> Taipei, Taiwan	AP018149, <i>A. c. indica</i> Sabah, Borneo, Malaysia	NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , United States
		Jukes–Cantor / Tamura–Nei / <i>p</i> -distances									
AP018450, <i>A. c. ussuriensis</i> , Primorsky krai, Russia		0.006/ 0.002/ 0.002	0.006/ 0.002/ 0.002	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.006/ 0.006	0.042/ 0.013/ 0.013	0.159/ 0.097/ 0.088	
KM244704, <i>A. c. cerana</i> , Yunnan, China	1.8/ 85/ 13		0.002/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.007/ 0.003/ 0.003	0.022/ 0.005/ 0.005	0.040/ 0.013/ 0.013	0.155/ 0.096/ 0.087	
AP017983, <i>A. c. cerana</i> , Jiangsu, China	3.3/ 90/ 16	1.5/ 35/ 5		0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.001/ 0.001	0.008/ 0.003/ 0.003	0.022/ 0.005/ 0.005	0.037/ 0.013/ 0.013	0.152/ 0.096/ 0.087	
AP017314, <i>A. c. japonica</i> , Kyoto, Japan	0.9/ 44/ 7	2.8/ 77/ 13	3.5/ 84/ 16		0.002/ 0.001/ 0.001	0.003/ 0.001/ 0.001	0.003/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.005/ 0.005	0.042/ 0.014/ 0.014	0.158/ 0.096/ 0.087	
AP017941, <i>A. c. japonica</i> , Amami, Japan	1.2/ 44/ 8	2.2/ 78/ 14	2.9/ 85/ 17	0.7/ 11/ 3		0.005/ 0.001/ 0.001	0.006/ 0.002/ 0.002	0.022/ 0.005/ 0.005	0.041/ 0.014/ 0.014	0.156/ 0.096/ 0.087	
KX908206, <i>A. c. koreana</i> , Chungcheongbuk-do, Korea	1.1/ 56/ 13	1.9/ 94/ 19	3.4/ 98/ 22	0.9/ 39/ 12	1.2/ 37/ 13		0.003/ 0.003/ 0.003	0.023/ 0.006/ 0.006	0.044/ 0.014/ 0.014	0.159/ 0.096/ 0.087	
AP018431, <i>A. c. koreana</i> , Jeollanam-do, Korea	1.5/ 82/ 12	2.4/ 116/ 19	3.9/ 123/ 22	1.3/ 88/ 15	1.9/ 90/ 16	1.1/ 87/ 17		0.024/ 0.007/ 0.008	0.043/ 0.014/ 0.014	0.159/ 0.097/ 0.088	
AP017984, <i>A. c. indica</i> , Taipei, Taiwan	5.5/ 336/ 46	4.5/ 339/ 48	3.1/ 338/ 47	5.7/ 333/ 45	5.12/ 331/ 44	5.6/ 345/ 51	6.1/ 367/ 52		0.038/ 0.014/ 0.014	0.148/ 0.095/ 0.087	
AP018149, <i>A. c. indica</i> , Sabah, Borneo, Malaysia	4.8/ 647/ 89	5.5/ 611/ 88	6.7/ 559/ 85	4.9/ 649/ 87	5.3/ 627/ 90	4.9/ 671/ 93	5.2/ 654/ 95	6.9/ 573/ 93		0.156/ 0.095/ 0.087	
NC 001566, <i>A. m. ligustica</i> , United States	20.6/ 2221/ 585	21.2/ 2151/ 585	22.2/ 2071/ 583	20.5/ 2210/ 581	20.9/ 2162/ 580	20.5/ 2223/ 588	20.6/ 2219/ 587	22.2/ 2011/ 584	20.5/ 2186/ 590		

vided into two groups: mainland Asia and Sundaland [41]. On the basis of the nucleotide sequence of *NC2*, *A. c. ussuriensis* belongs to the mainland Asia haplotype *Japan I*. It is likely that the presence of the *Japan I* haplotype in all populations of *A. cerana* in Asia indicates the common origin of the entire population of *A. cerana* and its subsequent distribution over Asia. Thus, on the basis of the noncoding intergenic *NC1* and *NC2* regions, *A. c. ussuriensis* belongs to the continental Asian group *A. cerana* and is different from the

populations of *A. c. cerana*, *A. c. koreana*, and *A. c. japonica*. The genetic differences of *A. c. ussuriensis* are presumably the result of natural selection and adaptive evolution of *A. cerana* in the sharply continental climate of Primorsky krai.

The local properties of the mutation process can be described not only by the probability of single nucleotide mutations per site but also by the ratio of transitions (*tr*) to transversions (*tv*). The *tr/tv* ratio is considered a basic property of the mutation process and is

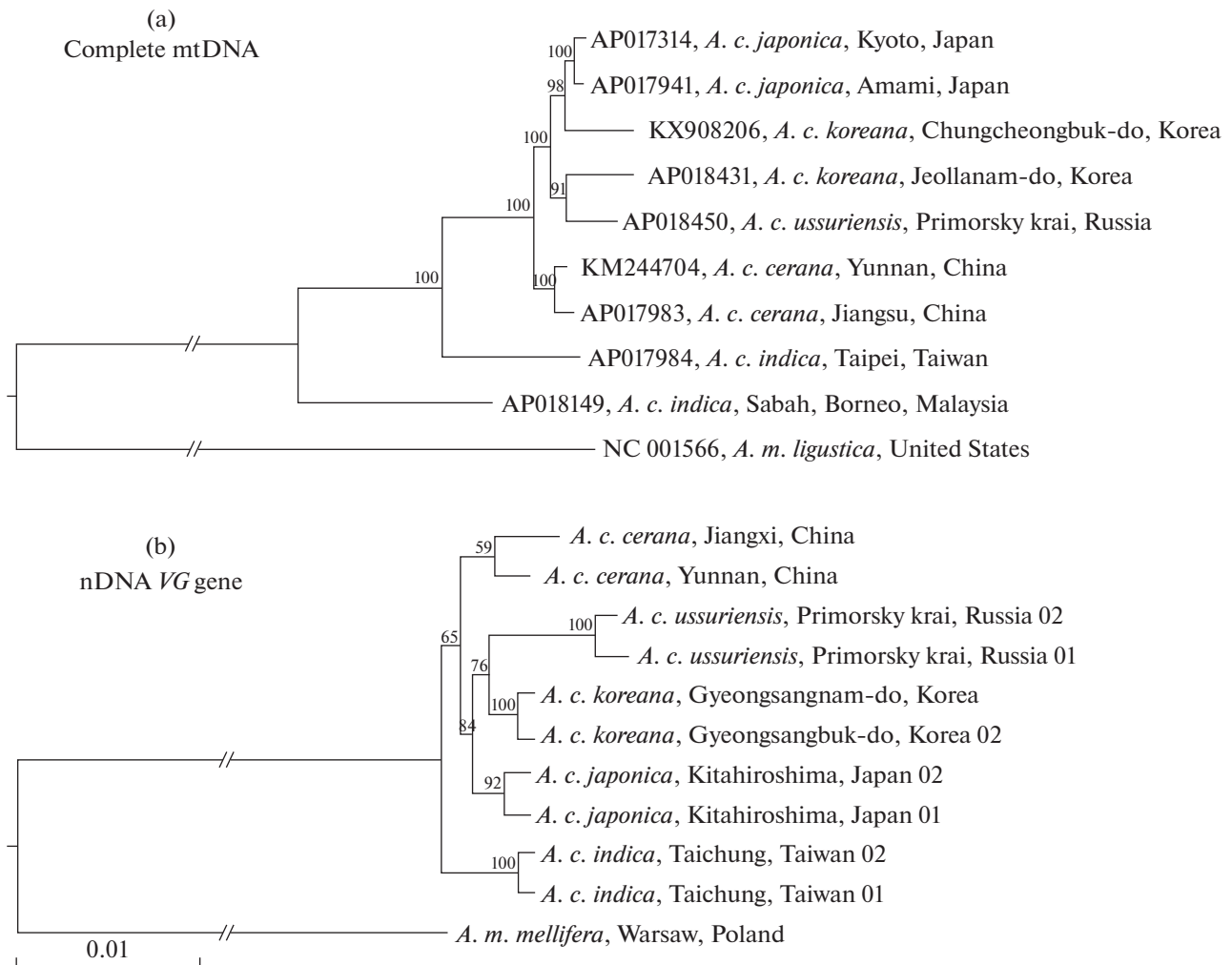


Fig. 3. Phylogenetic relationships between representatives of different *A. cerana* populations based on cluster analysis by the neighbor-joining method and Jukes–Cantor genetic distances. (a) On the basis of the complete mtDNA sequence; (b) on the basis of the sequence of nDNA *VG* gene.

a widely used one-parameter characteristic of the mutation spectrum. For the majority of known eukaryotes, the normal ratio is $tr/tv > 1$, while $tr/tv < 1$ indicates the increased frequency of single nucleotide mutations, insertions, or deletions (indels) or the decreased efficiency of DNA repair. The variability of the tr/tv ratio in the genome may indicate a local change in the mutational mechanism during adaptation to changing environmental conditions [42–44].

The ratio of transitions to transversions in total mtDNA was 2.46 between *A. c. ussuriensis* and *A. c. cerana*, 2.14 between *A. c. ussuriensis* and *A. c. japonica*, 2.11 between *A. c. ussuriensis* and *A. c. koreana*, 2.39 between *A. c. ussuriensis* and *A. c. indica*, and 0.47 between *A. c. ussuriensis* and *A. m. ligustica* (Table 3), which is similar to the 2.06 tr/tv ratio for mtDNA between *Drosophila melanogaster* and *D. yakuba* [45]. The smallest value of the tr/tv ratio between *A. cerana* and *A. mellifera* of 0.47 is indicative of a change in the

mutational mechanism during adaptation to changing environmental conditions as a result of divergence and allopatric speciation.

The Jukes–Cantor genetic distance, Tamura–Nei distance, and p -distance for total mtDNA and the nDNA *VG* gene showed that their absolute values do not differ very much and can be successfully used in cluster analysis. For each distance, a similar clustering pattern can be obtained. It was revealed that *A. c. ussuriensis* subspecies was genetically closer to *A. c. japonica* (the divergence was 1.10% for mtDNA and 0.93% for *VG* nDNA gene; the Jukes–Cantor distances were 0.005 for mtDNA and 0.009 for *VG* nDNA gene) and *A. c. koreana* (the divergence was 1.30% for mtDNA and 0.90% for the *VG* nDNA gene); the Jukes–Cantor distances were 0.005 for mtDNA and 0.012 for the *VG* nDNA gene), *A. c. cerana* (the divergence was 2.55% for mtDNA and 1.25% for *VG* nDNA gene; the Jukes–Cantor distances were 0.006 for mtDNA and 0.012 for

Table 5. Genetic distances (above diagonal) and genetic differences (below diagonal) between sequences of *VG* gene in nDNA of *A. cerana* samples

<i>A. cerana</i> representatives	<i>A. c. ussuriensis</i> , Primorsky krai, Russia 01	<i>A. c. ussuriensis</i> , Primorsky krai, Russia 02	<i>A. c. cerana</i> , Jiangxi, China	<i>A. c. cerana</i> , Yunnan, China	<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Japan 01	<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Japan 02	<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangbuk-do, South Korea	<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangnam-do, South Korea	<i>A. c. indica</i> , Taichung, Taiwan 01	<i>A. c. indica</i> , Taichung, Taiwan 02	<i>A. m. mellifera</i> , Warsaw, Poland
	Jukes–Cantor / Tamura–Nei / <i>p</i> -distances										
<i>A. c. ussuriensis</i> , Primorsky krai, Russia 01		0.002/ 0.003/ 0.001	0.013/ 0.013/ 0.005	0.013/ 0.013/ 0.005	0.008/ 0.008/ 0.004	0.009/ 0.009/ 0.004	0.010/ 0.010/ 0.005	0.010/ 0.011/ 0.005	0.014/ 0.014/ 0.005	0.014/ 0.014/ 0.005	0.081/ 0.082/ 0.026
<i>A. c. ussuriensis</i> , Primorsky krai, Russia 02	0.3/ 12/ 6		0.012/ 0.012/ 0.004	0.012/ 0.012/ 0.005	0.010/ 0.010/ 0.004	0.010/ 0.010/ 0.005	0.008/ 0.008/ 0.004	0.008/ 0.008/ 0.004	0.013/ 0.012/ 0.004	0.013/ 0.013/ 0.004	0.081/ 0.082/ 0.026
<i>A. c. cerana</i> , Jiangxi, China	1.3/ 52/ 22	1.2/ 48/ 22		0.007/ 0.007/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.006/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.009/ 0.009/ 0.001	0.009/ 0.010/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022
<i>A. c. cerana</i> , Yunnan, China	1.3/ 53/ 26	1.2/ 49/ 24	0.8/ 27/ 6		0.008/ 0.008/ 0.002	0.006/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.006/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022
<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Japan 01	0.8/ 32/ 20	1.0/ 40/ 22	0.8/ 30/ 6	0.8/ 31/ 10		0.002/ 0.002/ 0.001	0.007/ 0.007/ 0.002	0.007/ 0.007/ 0.002	0.009/ 0.009/ 0.002	0.008/ 0.008/ 0.002	0.076/ 0.077/ 0.023
<i>A. c. japonica</i> , Kitahiroshima, Japan 02	0.9/ 37/ 20	1.0/ 41/ 22	0.7/ 25/ 4	0.7/ 26/ 8	0.2/ 7/ 2		0.006/ 0.006/ 0.001	0.005/ 0.005/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.007/ 0.008/ 0.001	0.075/ 0.076/ 0.022
<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangbuk-do, South Korea	1.0/ 42/ 24	0.8/ 32/ 18	0.8/ 30/ 6	0.8/ 27/ 8	0.8/ 28/ 8	0.7/ 25/ 6		0.002/ 0.002/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.008/ 0.008/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022
<i>A. c. koreana</i> , Gyeongsangnam-do, South Korea	1.0/ 43/ 25	0.8/ 31/ 19	0.8/ 27/ 7	0.8/ 28/ 9	0.8/ 27/ 9	0.7/ 24/ 7	0.2/ 7/ 1		0.008/ 0.008/ 0.001	0.009/ 0.009/ 0.001	0.078/ 0.079/ 0.022
<i>A. c. indica</i> , Taichung, Taiwan 01	1.4/ 56/ 24	1.4/ 54/ 24	0.9/ 36/ 8	0.8/ 31/ 10	0.9/ 36/ 8	0.8/ 31/ 6	0.8/ 32/ 8	0.9/ 33/ 9		0.001/ 0.001/ 0.001	0.077/ 0.078/ 0.022
<i>A. c. indica</i> , Taichung, Taiwan 02	1.4/ 56/ 23	1.4/ 54/ 23	1.0/ 38/ 9	0.8/ 31/ 11	0.9/ 34/ 9	0.8/ 29/ 7	0.9/ 34/ 9	0.9/ 35/ 10	0.1/ 4/ 1		0.076/ 0.077/ 0.022
<i>A. m. mellifera</i> , Warsaw, Poland	9.0/ 311/ 157	9.1/ 312/ 158	8.7/ 296/ 143	8.7/ 297/ 145	8.7/ 295/ 146	8.6/ 292/ 144	8.7/ 298/ 147	8.8/ 300/ 148	8.8/ 297/ 145	8.7/ 295/ 146	

VG nDNA gene) than to *A. c. indica* (divergence was 5.15% for mtDNA and 1.50% for the *VG* nDNA gene; Jukes–Cantor distances were 0.032 for mtDNA and 0.013 for the *VG* nDNA gene) (Tables 4 and 5). Thus, on the basis of the genetic distances and divergence, the subspecies are subdivided into two groups: North and South Asia.

Phylogenetic trees constructed from the complete mtDNA and the *VG* nDNA gene showed similarities by clustering into two groups: South and North Asia

(Fig. 3). Specimens of *A. mellifera* are located separately and function as an outgroup. All *A. cerana* subspecies, with the exception of *A. c. koreana*, are grouped into separate clusters based on the complete mtDNA and the *VG* nDNA gene, which indicates that the paternal and maternal components of the genome were geographically distributed together. This is possible during natural migration, as well as when the beekeeper moves bee colonies. In the case of *A. c. koreana*, specimens of this subspecies were grouped on the

basis of mtDNA both with *A. c. japonica* and with *A. c. ussuriensis*, which may be due to the flow of genes along the maternal line from these subspecies to the *A. c. koreana* population, the distribution range of which is geographically located between them. This can be a result of the import of *A. c. japonica* and *A. c. ussuriensis* queen bees to South Korea, where they were later bred with the local *A. c. ussuriensis* drones.

As we know, the range of genetic divergence of 0.80–8.00% and the Jukes–Cantor genetic distance of 0.005–0.100 correspond to the range of intraspecific differences in insects [19, 25, 46, 47]. Values of genetic divergence and genetic distance based on mtDNA and the *VG* nDNA gene between *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, and *A. c. indica* are within the range of intraspecific differences between insect subspecies.

Since the divergence of mtDNA proceeds at a rate of 2.3% per 1 Ma [48, 49], we can calculate that the age of isolation and subsequent divergence of *A. c. ussuriensis* is probably 0.50 Ma (1.10%) from *A. c. japonica*, 0.56 Ma (1.30%) from *A. c. koreana*, 1.1 Ma (2.55%) from *A. c. cerana*, and 2.2 Ma (5.15%) from *A. c. indica* (Tables 4 and 5). The probable time of the emergence of *A. cerana* subspecies is approximately 2–1 Ma.

Thus, *Apis cerana ussuriensis* Ilyasov et al., 2019 is the least studied of all subspecies owing to the fact that it is rare and only occurs in the wild in the forests of Primorsky krai and Khabarovsk krai as far as 47°54' N. Genetic studies of this subspecies are of great interest for science, since this subspecies was subjected to natural selection and adaptive evolution, where all the features of these bees would have been formed under the critical conditions of North Asia. We sequenced and annotated the complete mtDNA sequences of the subspecies *A. c. ussuriensis* (AP018450) and *A. c. koreana* (AP018431) and six exons of the vitellogenin *VG* nDNA gene of subspecies *A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, *A. c. cerana*, and *A. c. indica*. The mtDNA sequence is 15 919 bp in length, contains 84% AT and 16% GC, and includes 22 tRNA genes, 13 protein-coding genes, two rRNA genes (*16S rRNA* and *12S rRNA*), one AT-rich region, and four noncoding intergenic regions *NC 1–4*. All protein-coding genes begin with the ATT and ATG codons, with the exception of the *ATP8* gene with the ATC start codon, and end with the TAA and TAG stop codons. We show that, on the basis of the *NC1* region, *A. c. koreana* belongs to the *ACNC110* haplotype and *A. c. ussuriensis* belongs to the *ACNC111* haplotype, while on the basis of the *NC2* region, both subspecies belong to the *Japan1* haplotype. Cluster analysis of the mtDNA and the *VG* nDNA gene sequences showed the division of bees into two groups: the southern subspecies (*A. c. indica*) and the northern subspecies (*A. c. ussuriensis*, *A. c. koreana*, *A. c. japonica*, and *A. c. cerana*). We show that subspecies *A. c. ussuriensis* is genetically

more similar to *A. c. japonica*, *A. c. koreana*, and *A. c. cerana* than to *A. c. indica*. The values of genetic divergence (0.80%–8.00%) and Jukes–Cantor genetic distance (0.005–0.100) for the mtDNA and *VG* nDNA gene between subspecies *A. c. ussuriensis* Ilyasov et al., 2019, *A. c. koreana* Ilyasov et al., 2019, *A. c. japonica* Radoszkowski, 1887, *A. c. cerana* Fabricius, 1793, and *A. c. indica* Fabricius, 1798 are within the intraspecific differences between subspecies.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Hisashi Okuyama for the assistance with sequencing.

FUNDING

The present study was supported by the government assignment (registration no. 01201350736) (IR), by the Russian Foundation for Basic Research (no. 19-54-70002 e-Asia_t) (NA)), and by the postdoctoral research programs of Incheon National University 2017–2019 (IR).

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Ruttner, F., *Breeding Techniques and Selection for Breeding of the Honeybee*, Derby, UK: British Isles Bee Breeders Association, 1988.
2. Proshchalykin, M.Yu., Novomodnyi, E.V., Bezborodov, V.G., and Koshkin, E.S., The first modern findings of a wax bee *Apis cerana* Fabricius, 1793 (Hymenoptera, Apidae) in Khabarovsk Krai, *Euras. Entomol. Zh.*, 2014, vol. 13, no. 3, pp. 295–298.
3. Kuznetsov, V.N., *Kitaiskaya voskovaya pchela Apis cerana cerana F. (Hymenoptera, Apidae) na Dal'nem Vostoke Rossii* (Chinese Wax Bee, *Apis cerana cerana* F. (Hymenoptera, Apidae) in the Russian Far East), Moscow: KMK, 2005.
4. Behura, S.K., Analysis of nuclear copies of mitochondrial sequences in honeybee (*Apis mellifera*) genome, *Mol. Biol. Evol.*, 2007, vol. 24, no. 7, pp. 1492–1505. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm068>
5. Choi, Y.S., Lee, M.Y., Hong, I.P., et al., Occurrence of sacbrood virus in Korean apiaries from *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae), *J. Apic.*, 2010, vol. 25, no. 3, pp. 187–191.
6. Koetz, A.H., Ecology, behaviour and control of *Apis cerana* with a focus on relevance to the Australian incursion, *Insects*, 2013, vol. 4, no. 4, pp. 558–592. <https://doi.org/10.3390/insects4040558>

7. Vung, N., Lee, M.-L., Lee, M.-Y., et al., Breeding and selection for resistance to sacbrood virus for *Apis cerana*, *J. Apic.*, 2017, vol. 32, pp. 345–352. <https://doi.org/10.17519/apiculture.2017.11.32.4.345>
8. Pesenko, Yu.A., Lelei, A.S., Radchenko, V.G., and Filatkin, G.N., Chinese wax bee *Apis cerana cerana* F. (Hymenoptera, Apidae) in the Soviet Far East, *Entomol. Obozr.*, 1989, vol. 68, no. 3, pp. 527–548.
9. Zhuang, D., New subspecies of *Apis cerana* (in Chinese), *Southwest China J. Agric. Sci.*, 1989, vol. 2, pp. 61–65.
10. Zhen-Ming, J., Yang, G., Huang, S., et al., *The advancement of beekeeping science and technology in China, Honeybees in Mountain Agriculture*, Verma, L.R., Ed., New Delhi: Oxford and IBH Publ., 1992.
11. Diniz-Filho, J.A.F., Malapsina, O., and Pignata, M.I.B., Geographic variation in *Apis cerana indica* F.: a spatial autocorrelation analysis of morphometric patterns, *J. Apic. Res.*, 1993, vol. 32, pp. 65–72. <https://doi.org/10.1080/00218839.1993.11101289>
12. Engel, M.S., The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera, Apidae), *J. Hymenoptera Res.*, 1999, vol. 8, no. 2, pp. 165–196. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-718>
13. Sugawara, M., Feral colonies of Japanese honey bees, *Apis cerana japonica* and their life history: 2. Natural nests and swarming, *Mitsubachi Kagaku (Honeybee Sci.)*, 2000, vol. 21, no. 1, pp. 35–39.
14. Hepburn, H.R., Smith, D.R., Radloff, S.E., and Otis, G.W., Intraspecific categories of *Apis cerana*: morphometric, allozymal and mtDNA diversity, *Apidologie*, 2001, vol. 32, no. 1, pp. 3–23. <https://doi.org/10.1051/apido:2001108>
15. Takahashi, J. and Yoshida, T., The origin of Japanese honey bee *Apis cerana japonica* inferred from mitochondrial DNA, *Mitsubachi Kagaku (Honeybee Sci.)*, 2003, vol. 24, no. 2, pp. 71–76.
16. Radloff, S.E., Hepburn, C., Hepburn, R.H., et al., Population structure and classification of *Apis cerana*, *Apidologie*, 2010, vol. 41, no. 6, pp. 589–601. <https://doi.org/10.1051/apido/2010008>
17. Takahashi, J., Wakamiya, T., Kiyoshi, T., et al., The complete mitochondrial genome of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* (Insecta: Hymenoptera: Apidae), *Mitochondrial DNA, Part B*, 2016, vol. 1, no. 1, pp. 156–157. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1144108>
18. Ilyasov, R.A., Park, J., Takahashi, J., and Kwon, H.W., Phylogenetic uniqueness of honeybee *Apis cerana* from the Korean peninsula inferred from the mitochondrial, nuclear, and morphological data, *J. Apic. Sci.*, 2018, vol. 62, no. 2, pp. 189–214. <https://doi.org/10.2478/Jas-2018-0018>
19. Ilyasov, R.A., Han, G.Y., Lee, M.L., et al., Phylogenetic relationships of Russian Far-East *Apis cerana* with other north Asian populations, *J. Apic. Sci.*, 2019, vol. 63, no. 2, pp. 297–322. <https://doi.org/10.2478/JAS-2019-0024>
20. Cornuet, J.-M., Garnery, L., and Solignac, M., Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA, *Genetics*, 1991, vol. 128, no. 2, pp. 393–403.
21. Garnery, L., Cornuet, J.-M., and Solignac, M., Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis, *Mol. Ecol.*, 1992, vol. 1, no. 3, pp. 145–154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1992.tb00170.x>
22. Garnery, L., Mosshine, E.H., Oldroyd, B.P., and Cornuet, J.-M., Mitochondrial DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations, *Mol. Ecol.*, 1995, vol. 4, pp. 465–472. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1995.tb00240.x>
23. Arias, M.C. and Sheppard, W.S., Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 1996, vol. 5, no. 3, pp. 557–566. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0050>
24. Songrarn, O., Sittipraneed, S., and Klinbunga, S., Mitochondrial DNA diversity and genetic differentiation of the honeybee (*Apis cerana*) in Thailand, *Biochem. Genet.*, 2006, vol. 44, nos. 5–6, pp. 256–269. <https://doi.org/10.1007/s10528-006-9030-5>
25. Tan, H.W., Liu, G.H., Dong, X., et al., The complete mitochondrial genome of the Asiatic cavity-nesting honeybee *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae), *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 8, e23008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023008>
26. Kent, C.F., Issa, A., Bunting, A.C., and Zayed, A., Adaptive evolution of a key gene affecting queen and worker traits in the honey bee, *Apis mellifera*, *Mol. Ecol.*, 2011, vol. 20, no. 24, pp. 5226–5235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05299.x>
27. Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., et al., MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation, *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2013, vol. 69, no. 2, pp. 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023>
28. Lowe, T.M. and Eddy, S.R., tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence, *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, no. 5, pp. 955–964. <https://doi.org/10.1093/nar/25.5.0955>
29. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
30. Jukes, T.H. and Cantor, C.R., *Evolution of protein molecules, Mammalian Protein Metabolism*, Munro, H.N., Ed., New York: Acad. Press, 1969, pp. 21–132.
31. Tamura, K., Battistuzzi, F.U., Billings-Ross, P., et al., Estimating divergence times in large molecular phylogenies, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, vol. 109, no. 47, pp. 19333–19338. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213199109>
32. Nei, M. and Kumar, S., *Molecular Evolution and Phylogenetics*, New York: Oxford Univ. Press, 2000.
33. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K., MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
34. Saitou, N. and Nei, M., The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees,

- Mol. Biol. Evol.*, 1987, vol. 4, no. 4, pp. 406–425.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
35. Tamura, K. and Nei, M., Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees, *Mol. Biol. Evol.*, 1993, vol. 10, no. 3, pp. 512–526.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
 36. Crozier, R.H. and Crozier, Y.C., The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization, *Genetics*, 1993, vol. 133, no. 1, pp. 97–117.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00131.x>
 37. Okuyama, H., Tingek, S., and Takahashi, J., The complete mitochondrial genome of the cavity-nesting honeybee, *Apis cerana* (Insecta: Hymenoptera: Apidae) from Borneo, *Mitochondrial DNA, Part B*, 2017, vol. 2, no. 2, pp. 475–476.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1361344>
 38. Kent, C.F., Minaei, S., Harpur, B.A., and Zayed, A., Recombination is associated with the evolution of genome structure and worker behavior in honey bees, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, vol. 109, no. 44, pp. 18012–18017.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1208094109>
 39. Lee, J.Y., Wang, A.R., Choi, Y.S., et al., Mitochondrial DNA variations in Korean *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) and development of another potential marker, *Apidologie*, 2016, vol. 47, no. 1, pp. 123–134.
<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0381-y>
 40. Tan, Y.D., Wan, C.L., Zhu, Y.F., et al., An amplified fragment length polymorphism map of the silkworm, *Genetics*, 2001, vol. 157, no. 3, pp. 1277–1284.
 41. Smith, C.R., Smith, C.D., Robertson, H.M., et al., Draft genome of the red harvester ant *Pogonomyrmex barbatus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, vol. 108, no. 14, pp. 5667–5672.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007901108>
 42. Tian, D., Wang, Q., Zhang, P., et al., Single-nucleotide mutation rate increases close to insertions/deletions in eukaryotes, *Nature*, 2008, vol. 455, no. 7209, pp. 105–108.
<https://doi.org/10.1038/nature07175>
 43. McDonald, M.J., Wang, W.C., Huang, H.D., and Leu, J.Y., Clusters of nucleotide substitutions and insertion/deletion mutations are associated with repeat sequences, *PLoS Biol.*, 2011, vol. 9, no. 6. e1000622.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000622>
 44. Koren, A., Polak, P., Nemesh, J., et al., Differential relationship of DNA replication timing to different forms of human mutation and variation, *Am. J. Hum. Genet.*, 2012, vol. 91, no. 6, pp. 1033–1040.
<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.10.018>
 45. Seplyarskiy, V.B., Kharchenko, P., Kondrashov, A.S., and Bazykin, G.A., Heterogeneity of the transition/transversion ratio in *Drosophila* and Hominidae genomes, *Mol. Biol. Evol.*, 2012, vol. 29, no. 8, pp. 1943–1955.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mss071>
 46. Han, T., Lee, W., Lee, S., et al., Reassessment of species diversity of the subfamily Denticollinae (Coleoptera: Elateridae) through DNA barcoding, *PLoS One*, 2016, vol. 11, no. 2. e0148602.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148602>
 47. Eimanifar, A., Kimball, R.T., Braun, E.L., et al., The complete mitochondrial genome of the Egyptian honey bee, *Apis mellifera lamarekii* (Insecta: Hymenoptera: Apidae), *Mitochondrial DNA, Part B*, 2017, vol. 2, no. 1, pp. 270–272.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2017.1325343>
 48. DeSalle, R., Freedman, T., Prager, E.M., and Wilson, A.C., Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*, *J. Mol. Evol.*, 1987, vol. 26, nos. 1–2, pp. 157–164.
<https://doi.org/10.1007/BF02111289>
 49. Johns, G.C. and Avise, J.C., A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene, *Mol. Biol. Evol.*, 1998, vol. 15, pp. 1481–1490.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025875>

Translated by A. A. Lisenkova

SPELL: 1. sacbrood