

УДК 575.17

DOI: 10.31040/2222-8349-2023-0-2-72-78

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОТНОШЕНИЯ ПОДВИДОВ КИТАЙСКОЙ ВОСКОВОЙ ПЧЕЛЫ *APIS CERANA* ИЗ ЮЖНОЙ КОРЕИ, ВЬЕТНАМА И РОССИИ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОВ *Defensin 1* и *Defensin 2*

© А.К. Кинзикеев, Л.Р. Гайфуллина, А.Н. Гладких,
А.М. Салихова, Р.А. Ильясов, Е.С. Салтыкова

Нами были исследованы гены *Def1* и *Def2* с целью установить зависимость распространения полиморфизма в этих генах и географического расселения подвидов *Apis cerana* в Южной Корее, Вьетнаме и Дальнем Востоке России. На основании полученных нуклеотидных последовательностей были построены филогенетические деревья, которые показывают, что полиморфизм генов *Def1* и *Def2* не связан с географическим расселением.

Ключевые слова: китайская восковая пчела, азиатская пчела, дефенсин, популяции, полиморфизм, Корея, Вьетнам, Дальний Восток.

Введение. Семейство пчел *Apidae* подотряда Стебельчатобрюхие *Apocrita* отряда перепончатокрылые *Hymenoptera Linnaeus* включает около 30 триб, 170 родов и 5000 видов. Самыми известными представителями семейства *Apidae* являются такие виды, как медоносная пчела *Apis mellifera* и восковая пчела *Apis cerana* (Радченко В.Г., 1994). По сравнению с медоносной пчелой, *A. cerana* немного меньше размером, хотя и внешне схожа с ней. Медопродуктивность *A. mellifera* выше, чем у *A. cerana*. Восковая пчела использует для гнездования дуплистые деревья, обладает высокой холодоустойчивостью: на ранних первоцветах начинается сбор взятка, а облеты они могут совершать даже в зимнее время. (Ильясов Р.А., 2014). Она обитает в умеренной и тропической Азии, распространяется от Афганистана до Кореи и Японии, на севере в предгорьях Гималаев, а также востоке России и на юг через Индонезию (Ruttner F., 1988; Crane E., 1999; Radloff S.E., 2011; Koetz A.H., 2013). С момента возникновения *A. cerana* на материковой части

Юго-Восточной Азии ее ареал расширился на тысячи километров до западной, северной и южной Азии (Ruttner F., 1988; Cornuet J.-M.L., & Garnery L., 1991; Willis L.G., Winston M.L., & Honda B.M., 1992; Koetz A.H., 2013).

Северные и южные популяции *A. cerana* были изолированы друг от друга в течение миллионов лет. Эта теория может быть подтверждена генетическими и морфологическими исследованиями *A. cerana*, которые показали, что северная китайская, российская, корейская и японская популяции *A. cerana* являются представителями единой популяционной системы, которая сильно отличается от южных популяций *A. cerana* (Smith D.R. et al., 2000; Takahashi J. et al., 2007; Radloff S.E. et al., 2010). Северные популяции *A. cerana* наиболее интересны для сельского хозяйства и фундаментальной науки, поскольку эти пчелы обладают уникальными особенностями адаптации к критическим условиям окружающей среды с чрезвычайно холодной и продолжительной зимой. Изучение адаптации пчел к изменяющейся

КИНЗИКЕЕВ Артур Камилевич, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, e-mail: kinzikeev@bk.ru
ГАЙФУЛЛИНА Луиза Римовна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: lurim78@mail.ru

ГЛАДКИХ Александр Николаевич, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: gladkih4leksandar@yandex.ru

САЛИХОВА Альфия Мунировна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: alfiam878@mail.ru

ИЛЬЯСОВ Рустем Абузарович – д.б.н., Башкирский государственный аграрный университет, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, e-mail: apismell@mail.ru

САЛТЫКОВА Елена Станиславовна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: saltykova-e@yandex.ru

среде является фундаментальным вопросом в эволюционной биологии и важно для защиты видов в ответ на изменения климата (Chen C. et al., 2018). Южные популяции Вьетнама также обладают рядом редких адаптивных мутаций, которые очень важно было бы зафиксировать во всех селектируемых линиях вида. Сообщалось, что пчелы южных популяций обладают повышенным гигиеническим поведением и способны самостоятельно избавляться от некоторых эктопаразитов, таких как *Varroa destructor* и *Tropilaelaps mercedesae*, а для популяций из Вьетнама и Индонезии было установлено, что они обладают повышенной устойчивостью к вирусу мешотчатого расплода (Chinh P.H., 1990; Oldroyd B.P. & Nanork P., 2009; Raffiudin R. & Crozier R.H., 2007; Choi Y.S. et al., 2010; Putra R.E. & Kinasih I., 2014; Thu H.T. et al., 2016; Vung N.N. et al., 2017; Shouten C. et al., 2019).

A. cerana демонстрирует способность к быстрому расселению (Gloag R., 2016), поэтому точное количество подвидов *A. cerana* в настоящее время не ясно (Tanaka H. et al., 2001). Она достаточно изучена в ареале ее умеренного и тропического распространения в Азии, в таких странах как Таиланд, Китай, Япония и Индия (Smith D.R., 1996; Tan K., 2007), но популяции из Дальнего Востока, Кореи, Вьетнама и Индонезии остаются недостаточно изученными (Smith D.R. & Hagen R.H., 1996; Smith D.R. et al., 2000; Takahashi J. et al., 2007; Lee J.Y. et al., 2016). Предполагается, что популяции островов и полуостровов относятся к отдельным подвидам *A. cerana* и имеют генетические отличия от материковой популяции *A. c. cerana*. Одним из важных вопросов, связанных с *A. cerana*, является установление количества подвидов, так как предыдущие исследования, основанные на полиморфизме отдельных локусов мтДНК, не выявили филогенетической дифференциации азиатских популяций *A. cerana* (Tanaka H. et al., 2001). Для оценки генетического разнообразия *A. cerana* во многих исследованиях использовался внутренний некодирующий спейсер *NC2* между генами *rRNA-Leu* и *COX2* митохондриальной ДНК (мтДНК) (Crozier R. H., 1993; Cornuet J.-M.L., 1991). Хотя эти маркеры и обладают соответствующими достоинствами, их было недостаточно, чтобы раскрыть генетическое разнообразие, изменчивость и биогеографическую историю *A. cerana* (Tanaka H. et al., 2001).

Цель нашего исследования – изучить эволюцию генов и таксономические взаимоотно-

шения популяций (подвидов) пчел *Apis cerana* Кореи, Вьетнама и Дальнего Востока России на основании данных секвенирования генов *Defensin 1 (Def1)* и *Defensin 2 (Def2)*, которые кодируют дефенсины, относящиеся к семейству антимикробных белков (Ильясов Р., 2013). У медоносной пчелы дефенсины представлены в виде двух различных белков – дефенсинов 1 и 2, сходных на 55.8%. У *Apis cerana* 29 различных дефенсин последовательности кДНК (дефенсин1, дефенсин 29), кодирующие 7 различных пептидов дефенсина (обозначенных как AcDe1, AcDe7) (Ильясов Р., 2013). Исследование этих генов может обосновать биологические и экологические различия между подвидами и экотипами пчел, предоставляя хорошую возможность для их генетического улучшения путем селекции и дальнейшего отбора (Ильясов Р.А. и др., 2019). Маркеры ДНК являются полезными инструментами в филогенетической реконструкции и эволюционном исследовании перепончатокрылых (Cornuet J.M., Garnery L. & Solignac M., 1991; Ильясов et al., 2018; 2019).

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

Материалы и методы. Tanaka (Tanaka H. et al.; 2001) в своей работе пишет, что было бы особенно интересно исследовать популяции *A. cerana* островов и полуостровов. Поэтому нами были выбраны образцы *A. cerana* с Корейского полуострова, Вьетнама, находящегося на полуострове Индокитай, и Дальнего Востока России, так как популяции из этих стран пока не имеют точного таксономического статуса. Были отобраны пробы *Apis cerana* 46 семей из трех стран: России ($n=16$), Южной Кореи ($n=16$) и Вьетнама ($n=14$).

Отобранные из каждой семьи живые рабочие пчелы фиксировались в 96% этаноле и хранились до выделения ДНК при -30°C . ДНК выделяли из мышц торакса с использованием на-

бора GeneJet (Thermo Scientific, USA). Качество и количество тотальной ДНК анализировали на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo, USA).

Для амплификации генов использовали праймеры:

F: 5'-GAAGATCTATTTTATTGTCGC-3' и R: 5'-CATCGTTGAAACTTCATAATGGCAC-3' для гена *Def1* (Klaudiny et al., 2005).

F: 5'-CTTTGTGCTAGGGAAGATG-3' и R: 5'-TCACTCGTTGTGCAAGAAGA-3' для гена *Def2* (Klaudiny et al., 2005).

ПЦР-анализ проводили в термоциклере BIO-RAD T100 в объеме 15 мкл. Смесь ПЦР 150 мкл (×10) состоит из 120 мкл дистиллированной воды, 15 мкл магниевого буфера, dNTP 10 мкм по 3 мкл, по 5 мкл F-праймера 2,2 ОЕ и R-праймера 2 ОЕ, 3 мкл Taq-полимеразы. Смесь изготовили на 40 образцов, которую раскапали по 15 мкл. Режим ПЦР: 5 минут 94°C, затем 30 циклов с денатурацией 30 сек. при 94°C, отжигом 30 сек. при 54.5°C, элонгацией 60 сек. при 72°C и конечной элонгацией 7 мин при 72°C. Продукты амплификации визуализировали в 8% ПААГ.

Секвенирование было выполнено методом Сэнгера в ООО "Синтол" (Москва). F- и R-последовательности фрагментов ДНК были отредактированы в Unipro UGENE и выровнены на референсные последовательности генов. Последовательности генов были депонированы в GenBank под следующими номерами: OK157957-OK157984, OK625820-OK625835.

Нуклеотидные последовательности *Apis dorsata* (Gene ID: 102672730), *Apis mellifera* (Gene ID: 406143) и *Apis cerana* (Gene ID: 107993803) для гена *Def1* и *Apis mellifera* (Gene ID: 413397) для гена *Def2* были взяты из базы данных геномных последовательностей Национального центра биотехнологической информации (база данных Honeybee Genome Project в NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace.html>) и включены в набор данных для построения филогенетических деревьев.

Нуклеотидные последовательности были выровнены программой MEGA X с использованием алгоритма MUSCLE со стандартными параметрами.

Филогенетические деревья были построены в программе MEGA X. (рис. 1) Для генов *Def1* и *Def2* было рассчитано количество замен оснований на сайт из усреднения по всем парам

последовательностей в каждой группе. Оценки стандартной ошибки были получены с помощью процедуры начальной загрузки (500 повторений). Анализы проводились с использованием двухпараметрической модели Кимуры и модели коррекции Пуассона для экзона *Def2*. Включенные положения кодона были 1st. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления). Эволюционная история была выведена с использованием метода Neighbor-Joining. Рядом с ветвями показан процент повторяющихся деревьев, в которых ассоциированные таксоны сгруппированы вместе в бутстреп-тесте (500 повторов). Дерево нарисовано в масштабе с длинами ветвей в тех же единицах, что и эволюционные расстояния, используемые для вывода филогенетического дерева. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием двухпараметрического метода Кимуры и выражены в единицах количества замен оснований на сайт. Включенные положения кодона были 1st. Все неоднозначные позиции были удалены для каждой пары последовательностей (опция попарного удаления).

Также были применены все другие алгоритмы доступные в программе MEGA X. Полученные результаты были идентичны.

Результаты. В результате ПЦР-амплификации гена *Def1* был получен фрагмент размером 2012 п.н. и имеющий 4 точки полиморфизма в положениях 196 А-Т, 248 G-С, 558 А-С, 894 Т-С в интронной области гена, а также фрагмент гена *Def2* размером 830 п.н., имеющий 4 точки полиморфизма в положениях 26 А-Т в экзоне гена и 100 Т-С, 653 А-С, 682 Т-С в интроне гена. На основании полученных данных была рассчитана частота встречаемости полиморфизма генов для разных географических территорий обитания *Apis cerana* (табл. 1).

Опираясь на данные таблицы, можно сделать вывод, что нуклеотидный полиморфизм гена *Def1* в положении 196 и 248 отличается полной заменой А-Т и G-С для популяций Дальнего Востока России от популяций Вьетнама, где наблюдаются противоположенные результаты. Есть предположение о зависимости между географическим расселением популяций и полиморфизмом в этих точках, а на территории Кореи обитает промежуточный вариант этих популяций, более схожий с популяциями России. Также в популяциях Вьетнама наблюдается кон-

сервативность нуклеотидных последовательностей и отсутствие замен в положении 894 гена *Def1* и в положении 100 для гена *Def2*, что может говорить о некоторой географической изоляции популяций Вьетнама. Для популяций Кореи, напротив, в гене *Def2* появляется замена в точках 26, 653, и 628, которые отсутствуют у популяций России и Вьетнама, что также свидетельствует об обособленности этих популяций. Для подтверждения или опровержения этих предположений требуются дальнейшие исследования с использованием большей выборкой.

На основании полученных нуклеотидных последовательностей были построены филогенетические деревья и филогенетическое дерево на основе аминокислотных последовательностей экзона *Def2* (рис. 1), которые показывают, что полиморфизм генов *Def1* и *Def2* не связан с географическим расселением популяций *A. cerana* в Южной Корее, Вьетнаме и Дальнем Востоке России.

Для установления структуры генов были проанализированы четыре сборки азиатской пчелы *Apis cerana* (ACSNU-2.0, ASM1110058v1, Apiscer_1.0, ApisCC1.0). Из них только одна представлена на хромосомном уровне – ASM1110058v1. Сравнение хромосом этой сборки с референсной сборкой европейской медоносной пчелы *Apis mellifera* Amel_HAv_3.1

показало, что большинство хромосом имеют либо перевернутое положение, либо скаффолды неправильно соединены. Сборка европейской пчелы более точная, поскольку собрана с помощью нескольких технологий секвенирования и картирования, поэтому мы приняли ее за эталон и использовали для установления структуры генов *Def1* и *Def2*.

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

Т а б л и ц а 1

Частота встречаемости однонуклеотидных замен в различных точках полиморфизма генов *Def1* и *Def2* для разных географических территорий обитания *Apis cerana*

Ген	Длина локуса, п.н.	Положение	Ин-трон/экзон	Замена	Частота встречаемости в популяциях					
					России		Вьетнама		Кореи	
					Ед.	%	Ед.	%	Ед.	%
<i>Def1</i>	2012	196	Интрон	A-T	15-A 0-T	100%-A 0%-T	0-A 14-T	100%-A 0%-T	12-A 2-T	86%-A 14%-T
		248	Интрон	G-C	15-G 0-C	100%-G 0%-C	0-G 14-C	0%-G 100%-C	12-G 2-C	86%-G 14%-C
		558	Интрон	A-C	13-C 2-A	87%-A 13%-C	14-C 0-A	100%-C 0%-A	8-C 6-A	57%-C 43%-A
		894	Интрон	T-C	10-T 5-C	67%-T 33%-C	0-T 14-C	100%-T 0%-C	4-T 10-C	29%-T 71%-C
<i>Def2</i>	830	26	Экзон	A-T	0-A 16-T	0%-A 100%-T	0-A 5-T	0%-A 100%-T	3-A 10-T	23%-A 77%-T
		100	Интрон	T-C	10-T 6-C	62%-T 38%-C	0-T 5-C	0%-T 100%-C	6-T 7-C	46%-T 54%-C
		653	Интрон	A-C	16-A 0-C	100%-A 0%-C	5-A 0-C	100%-A 0%-C	2-A 11-C	15%-A 85%-C
		682	Интрон	T-C	0-T 16-C	0%-T 100%-C	0-T 5-C	0%-T 100%-C	2-T 11-C	15%-T 85%-C

Примечания: *А – аденин, Т – тимин, G – гуанин, С – цитозин.

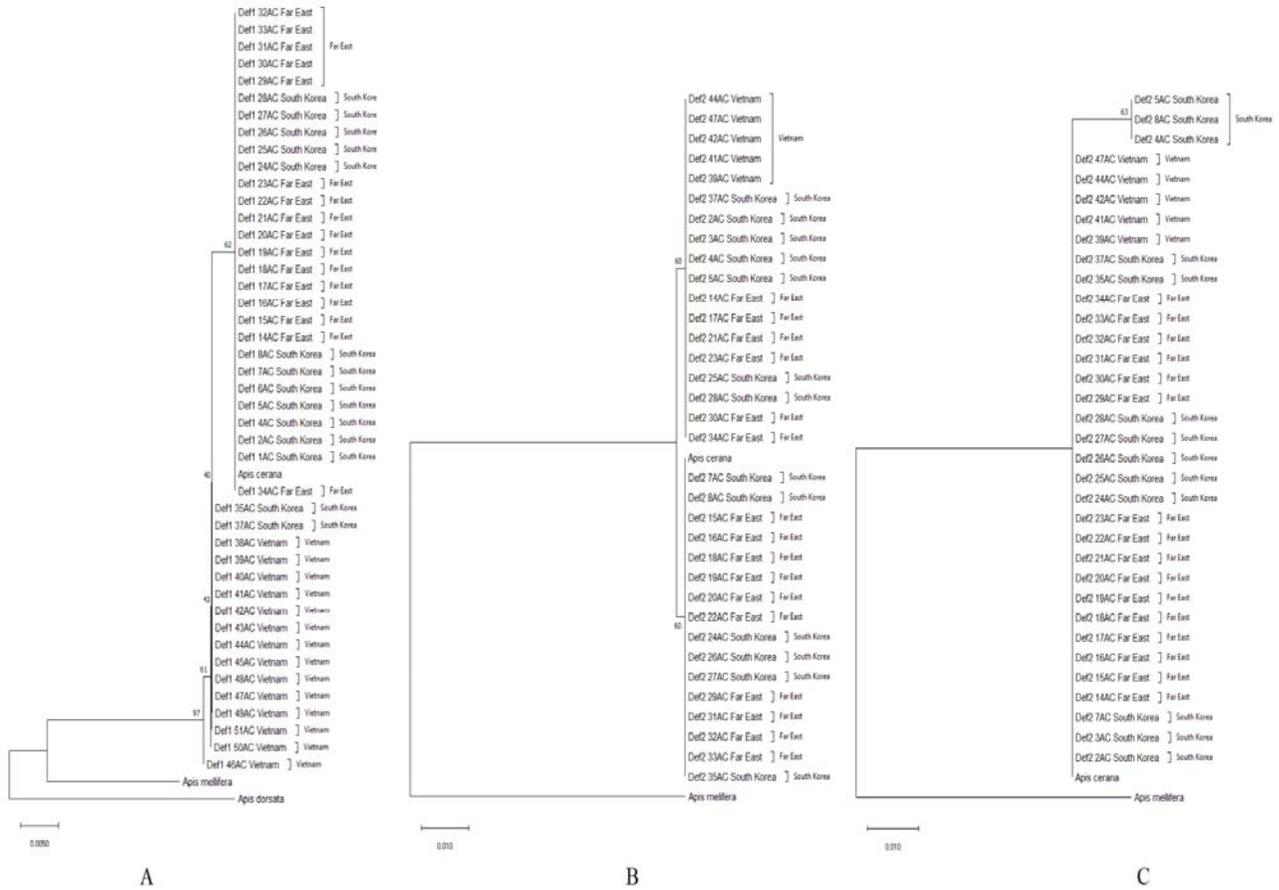


Рис. 1. Филогенетические деревья *Apis Cerana*: А – филогенетическое дерево *Apis Cerana*, построенное на основе нуклеотидного полиморфизма гена *Def1*; В – филогенетическое дерево *Apis Cerana*, построенное на основе нуклеотидного полиморфизма гена *Def2*; С – филогенетическое дерево для аминокислотных последовательностей экзона гена *Def2*

Т а б л и ц а 2

Характеристика генов *Def1* и *Def2* в сборках генома *Apis cerana* и *Apis mellifera*

Сборка	Ген	Хромосома	Стартовая позиция	Конечная позиция	Ориентация гена	Размер
ACSNU-2.0	<i>Def1</i>	Chr6	635671	636905	+	1234
	<i>Def2</i>	Chr16	5545169	5546106	-	937
ApisCC1.0	<i>Def1</i>	Chr6	8844889	8846317	+	1428
	<i>Def2</i>	Chr16	5569323	5570252	-	929
Apiscer_1.0	<i>Def1</i>	Chr6	7729444	7730870	+	1426
	<i>Def2</i>	Chr16	4838978	4839915	-	937
ASM1110058v1	<i>Def1</i>	Chr6	8334547	8335960	+	1413
	<i>Def2</i>	Chr16	1936701	1937642	+	941
Amel_HAv3.1	<i>Def1</i>	Chr6	8673495	8675023	+	1528
	<i>Def2</i>	Chr16	5139659	5140578	+	919

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

Нами были исследованы гены компонентов противoinфекционной защиты яДНК *Def1* и *Def2* с целью установить зависимость распространения однонуклеотидного полиморфизма в этих генах и географического расселения подвидов *Apis cerana* в Южной Корее, Вьетнаме и России. Мы выбрали эти географические точки взятия проб для изучения, так как популяции *A. cerana* в этих местах обитания пока не имеют точного таксономического статуса. Предполагается, что эти полуостровные популяции относятся к отдельным подвидам *A. cerana* и имеют генетические отличия от материковой популяции. Предыдущие исследования не выявили филогенетической дифференциации азиатских популяций *A. cerana*. На основании полученных нуклеотидных последовательностей для этих генов были построены филогенетические деревья, а также дерево для аминокислотных последовательностей экзона гена *Def2*, которые показали, что генетический полиморфизм генов *Def1* и *Def2* не связан с географическим расселением *A. cerana*.

Исследования выполнены при поддержке гранта № 19-54-70002 е-Азия_т «Эволюция генов и таксономические взаимоотношения популяций (подвидов) пчел *Apis cerana* России, Кореи, Вьетнама и Индонезии».

Литература

1. Радченко В.Г., Песенко Ю.А. Биология пчел (*Hymenoptera, Apoidea*) / под ред. Г.С. Медведева // Российская академия наук. 1994.
2. Ильясов Р.А. и др. Популяция *Apis cerana* на Дальнем Востоке России // Биомика. 2014. Т. 6. № 3. С. 139–144.
3. Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honeybees // Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 288 p.
4. Crane E. The world history of beekeeping and honey hunting // Routledge, New York. 1999.
5. Radloff S.E., Hepburn C., Hepburn H.R., Fuchs S., Hadisoesilo S., Tan K., Engel M.S., Kuznetsov V. Population structure and classification of *Apis cerana* // *Apidologie*. 2010. V. 41. P. 589–601.
6. Koetz A. H., 2013. Ecology, behaviour and control of *Apis cerana* with a focus on relevance to the Australian incursion // *Insects*. V. 4. P. 558–592.

7. Cornuet J.-M.L., Garnery L. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications // *Apidologie*. 1991. V. 22. P. 627–642.
8. Willis L.G., Winston M.L., Honda B.M. Phylogenetic relationships in the honeybee (genus *Apis*) as determined by the sequence of the cytochrome oxidase II region of mitochondrial DNA // *Molecular phylogenetics and evolution*. 1992. T. 1. № 3. P. 169–178.
9. Smith D.R. et al. Biogeography of *Apis cerana* F. and *A. nigrocincta* Smith: insights from mtDNA studies // *Apidologie*. 2000. T. 31. № 2. P. 265–279.
10. Takahashi J. et al. Geographic variation in the Japanese islands of *Apis cerana japonica* and in *A. cerana* populations bordering its geographic range // *Apidologie*. 2007. T. 38. № 4. P. 335–340.
11. Radloff S.E., Hepburn C., Hepburn H.R., Fuchs S., Hadisoesilo S., Tan K., Engel M.S., Kuznetsov V. Population structure and classification of *Apis cerana* // *Apidologie*. 2010. V. 41. P. 589 – 601.
12. Chen C. et al. Population genomics provide insights into the evolution and adaptation of the eastern honey bee (*Apis cerana*) // *Molecular Biology and Evolution*. 2018. T. 35. № 9. P. 2260–2271.
13. Chinh P.H. A disease of bee larvae *A. cerana* // *Agriculture Hanoi, Vietnam*. 1990.
14. Oldroyd B. P., Nanork P. Conservation of Asian honey bees // *Apidologie*. 2009. T. 40. № 3. C. 296–312.
15. Raffiudin R., Crozier R.H. Phylogenetic analysis of honey bee behavioral evolution // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2007. V. 43. P. 543–552. doi: 10.1016/j.ympev.2006.10.013.
16. Choi Y.S., Lee M.Y., Hong I.P., Kim N.S., Kim H.K., Lee K.G. et al. Occurrence of sacbrood virus in Korean apiaries from *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) // *Journal of Apiculture (Korea)*. 2010. V. 25. P. 187–191.
17. Putra R.E., Permana A.D., Kinasih I. Application of Asiatic honey bees (*Apis cerana*) and stingless bees (*Trigona laeviceps*) as pollinator agents of hot pepper (*Capsicum annum* L.) at local Indonesia farm system // *Psyche*. 2014. T. 2014.
18. Thu H.T. et al. Prevalence of bee viruses among *Apis cerana* populations in Vietnam // *Journal of Apicultural Research*. 2016. T. 55. № 5. P. 379–385.
19. Vung N.N., Lee M.L., Lee M.Y., Kim H.K., Kang E.J., Kim J.E., Choi Y.S. Breeding and Selection for Resistance to Sacbrood Virus for *Apis cerana* // *Journal of Apiculture*. 2017. V. 32(4). P. 345–352. DOI: 10.17519/apiculture.2017.11.32.4.345.
20. Schouten C., Lloyd D., Lloyd H. Beekeeping with the Asian honey bee (*Apis cerana javana* Fabr) in the Indonesian islands of Java, Bali, Nusa Penida, and Sumbawa // *Bee world*. 2019. T. 96. № 2. P. 45–49.
21. Gloag R. et al. An invasive social insect overcomes genetic load at the sex locus // *Nature ecology & evolution*. 2016. T. 1. № 1. P. 1–6.

22. Tanaka H. et al. Phylogenetic position of *Apis nuluensis* of northern Borneo and phylogeography of *A. cerana* as inferred from mitochondrial DNA sequences // *Insectesociaux*. 2001. Т. 48. № 1. P. 44–51.
23. Smith D.R., Hagen R.H. The biogeography of *Apis cerana* as revealed by mitochondrial DNA sequence data // *Journal of the Kansas Entomological Society*. 1996. P. 294–310.
24. Tan K., Warrit N., Smith D.R. Mitochondrial DNA diversity of Chinese *Apis cerana* // *Apidologie*. 2007. Т. 38. № 3. P. 238–246.
25. Lee J.Y. et al. Mitochondrial DNA variations in Korean *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) and development of another potential marker // *Apidologie*. 2016. Т. 47. № 1. P. 123–134.
26. 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. Т. 128. № 2. P. 393–403.
27. Ilyasov R. A. et al. Defensins in the honeybee antiinfectious protection // *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*. 2013. Т. 49. № 1. P. 1–9.
28. Ильясов Р. А. и др. Обзор современной таксономии азиатских и европейских пчел рода *apis* // *Биомика*. 2019. Т. 11. № 2. P. 212–241.



PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF SUBSPECIES OF THE CHINESE WAX BEE APIS CERANA FROM SOUTH KOREA, VIETNAM AND RUSSIA BASED ON THE NUCLEOTIDE SEQUENCE DATA OF THE Defensin 1 and Defensin 2 GENES

© A.K. Kinzikeev¹, L.R. Gaifullina¹, A.N. Gladkikh¹, A.M. Salikhova¹, P.A. Ilyasov^{2,3}, E.S. Saltykova¹

¹ Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
71, prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

² Bashkir State Agrarian University,
34, ulitsa 50th anniversary of October, 450001, Ufa, Russian Federation

³ Vavilov Institute of General Genetics RAS,
3, ulitsa Gubkina, 119991, Moscow, Russian Federation

We have studied the *Def1* and *Def2* genes in order to establish the relationship between the distribution of polymorphism in these genes and the geographical distribution of *Apis cerana* populations in South Korea, Vietnam, and Russia. Based on the obtained nucleotide sequences, phylogenetic trees were built, which show that the polymorphism of the *Def1* and *Def2* genes is not associated with geographical distribution of *A. cerana* populations.

Keywords: Asian honey bee, eastern honey bee, defensin, populations, polymorphism, Korea, Vietnam, Far East.