

ПОЛИМОРФИЗМ ГИПЕРВАРИАБЕЛЬНОГО УЧАСТКА ГЕНА *csd* В ПОПУЛЯЦИИ *Apis mellifera* L. НА ЮЖНОМ УРАЛЕ

© 2019 г. М. Д. Каскинова^{1, *}, А. Р. Гатауллин¹, Е. С. Салтыкова¹,
Л. Р. Гайфуллина¹, А. В. Поскряков¹, А. Г. Николенко¹

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра
Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

Поступила в редакцию 20.03.2018 г.

После доработки 18.06.2018 г.

Принята к публикации 19.06.2018 г.

У медоносных пчел пол определяется аллельной комбинацией гена *csd*. Низкое аллельное разнообразие по гену *csd* приводит к потере силы семьи вследствие появления нежизнеспособных диплоидных трутней из гомозиготных по гену пола яиц, поэтому в пчеловодстве существует острая необходимость идентификации и мониторинга аллелей гена *csd*. В данной работе представлены результаты анализа полиморфизма гипервариабельного участка (ГВУ) гена *csd* в локальной популяции *Apis mellifera mellifera* L. на Южном Урале. Среди 42 аминокислотных последовательностей, кодируемых аллелями ГВУ, выявлены 20 различных последовательностей, пять из которых ранее были неизвестны. Показано, что аллельное разнообразие по гену пола для данной популяции соответствует показателям, известным для других популяций *A. mellifera* L.

Ключевые слова: *Apis mellifera* L., секвенирование ДНК, генетика медоносной пчелы, ген *csd*.

DOI: 10.1134/S0016675819020097

Пол у медоносных пчел контролируется аллельной комбинацией гена, названного *csd* (*complementary sex determiner*) [1]. При этом самки развиваются из оплодотворенных яиц, несущих гетерозиготные аллели гена *csd*, а трутни развиваются из неоплодотворенных яиц, несущих гемизиготные аллели. Из оплодотворенных, но гомозиготных по гену пола яиц развиваются диплоидные трутни, которые уничтожаются рабочими пчелами. Низкое аллельное разнообразие по гену *csd* приводит к потере силы семьи вследствие появления нежизнеспособных диплоидных трутней, поэтому идентификация аллелей гена *csd* является важной задачей для селекционных программ, особенно для тех, где используется искусственное осеменение маток.

Селекция медоносных пчел традиционно основывается на оценке хозяйственно полезных признаков, таких как зимостойкость, гигиеническое поведение, медовая продуктивность и др. Если при селекции сельскохозяйственных животных для усиления экономически важных признаков используют инбридинг, то в случае с медоносными пчелами он может быстро привести к летальному исходу в силу особенностей определения пола. Примером организации, использующей как оценку хозяйственно полезных призна-

ков, так и оценку аллельного разнообразия гена *csd*, служит пчеловодческая организация *Betta Bees* из Новой Зеландии [2]. Такая программа разведения позволяет поддерживать генетическое разнообразие в условиях закрытого типа разведения.

Генетическая структура гена *csd*, его функциональный и эволюционные механизмы рассмотрены в обзорной работе [3]. Считается, что основной вклад в формирование функционального белка *csd* вносит домен PSD (*potential specifying domain*), находящийся под действием балансирующего отбора [4]. Этот домен включает в себя аргинин-сериновый (шестой экзон) и гипервариабельный (ГВУ, седьмой экзон) участки. Аргинин-сериновый участок принимает участие в межбелковых взаимодействиях [1], а гипервариабельный участок определяет аллельную специфичность гена *csd* [2, 5]. Мутации в ГВУ происходят в 2.4 раза быстрее, чем в микросателлитах [6], что обеспечивает быстрое формирование новых аллелей.

Цель данной работы — оценка аллельного разнообразия гена *csd* пчелиных семей с племенной пасеки на Южном Урале, специализирующейся на разведении *A. m. mellifera* L.

Проанализированы 42 трутня из 15 семей (по 2–3 трутня с семьи) *A. m. mellifera* L. из племенной пасеки Иглинского района Республики Башкор-

Таблица 1. Аминокислотные последовательности, кодируемые аллелями гипервариабельного участка *csd*, в исследуемой выборке

Номер семьи	АК последовательности	L
1	NNTIHNNNNYKYNNNNNYNNYSKKLYYNIINIEQI	34
13, 52	NKTIHNNNNYKYNYNNNKYNYNNNNNYNNNNYNNKLYYKNIINIEQI	46
13	NKTIHNNNNYKYNYNNNYNNNNYKYNINYKLYYNIINIEQI	39
26	NNYHSHYNNNNNNYNNYKLYYNIINIEQI	32
27	NKTIHNNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNYKLYYNIINIEQI	49
27	NNTIHNNNNYKYNYNNNYNNNNYNNNNKLYYNIINIEQI	39
43, 61, 136	NKTIHNNNNYKYNYNNNYNNNNYNNYSKKLYYNIINIEQI	38
43, 45	NNYNNNNYKYNYNNNYNNKLYYKNIINIEQI	33
45	NKTIHNNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNYKLYYNIINIEQI	40
61	NHYNNNNNKYNNYNNNDYKLYYNIINIEQI	30
63	NNYKYSNNNNYNNNSKLYYNIINIEQI	30
63	NNYKYSNNNNYNNNSKLYYNIINIEQI	32
79	KNTIHNNNNYKYNYNNNYNNNYKLYYNIINIEQI	35
79	NKTIHNNNNYKYNYNNNYNNNNHNNNNYKLYYNIINIEQI	41
82	NNTIHNNNNYKYNYNNNKLYYNIINIEQI	28
82	NNYNNNNYNNNNYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	35
96	NKTIHNNNNYNNYKLYYNIINIEQI	26
108	NNYSYNNNNYNNYKLYYNIINIEQI	26
136-2	NKTIHNNNNYNNNYKYNYNNNYNNKLYYNIINIEQI	37
141	NNYNNNNYNNNNYNNNNYNNKLYYNIINIEQI	31

Примечание. L – длина аминокислотной последовательности. Полу жирным шрифтом обозначены пять семей с новыми аллелями.

тостан. Образцы были собраны весной 2016 г. ДНК выделяли из мышц торакса с использованием набора ДНК-ЭКСТРАН-2 (www.syntol.ru). Для анализа использовали праймеры, ограничивающие консервативные участки шестого и восьмого экзонов гена *csd*, которые фланкируют ГБУ. ПЦР-анализ проводили в термоциклере Bio-Rad T100 с использованием праймеров F-GGGA-GAGAAGTTGCAGTAGAG и R-TTGATGCG-TAGGTCCAAATCC. Смесь ПЦР включала 17 мкл дистиллированной воды, 2 мкл 10-кратного *Taq*-буфера (25 mM Mg²⁺), 0.4 мкл dNTP (10 мкМ), 0.6 мкл F- и R-праймера (2 ОЕ) и 0.3 мкл *Taq*-полимеразы. Режим ПЦР: 5 мин 94°C, затем 30 циклов с денатурацией 30 с при 94°C, отжигом 30 с при 54.5°C, элонгацией 60 с при 72°C и конечной элонгацией 7 мин при 72°C. Секвенирование амплифицированных фрагментов выполнено на секвенаторе Applied Biosystem sequencer в фирме “Синтол” (Москва).

Выравнивание последовательностей ДНК выполнили при помощи ClustalW в программном обеспечении MEGA ver. 6 на референсную последовательность гена *csd* (NCBI Reference Sequence: NC_007072.3) и другие последовательности *csd*, представленные в GenBank. Экзоны были опре-

делены при помощи BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Различия в аминокислотных (АК) последовательностях определяли в Unipro UGENE.

Последовательности шестого–восьмого экзонов гена *csd* были зарегистрированы в GenBank под номерами KY502199–KY502249. Среди 42 последовательностей были обнаружены 20 различных последовательностей ГБУ (табл. 1). Общие АК последовательности были обнаружены у семей № 13 и 52, № 43 и 45, № 43, 61 и 136. Согласно данным владельца пасеки трутни из семьи № 13 использовали для осеменения маток из семьи № 52, а в семьях № 43 и 45 матки являются сестрами, что объясняет наличие идентичных аллелей у этих семей. Поскольку в исследуемой пасеке используется искусственное осеменение маток, необходимо объединить отцовские семьи, имеющие одинаковые аллели гена *csd* (т.е. семьи № 13 и 52, № 43 и 45, № 43, 61 и 136), чтобы избежать появления диплоидных трутней в потомстве.

В настоящем исследовании минимальная разница между АК последовательностями, кодируемыми аллелями ГБУ, составила 6 АК (между аллелями из семей № 96 и 108), максимальная – 27 АК между аллелями из семей № 26 и 13. Согласно

Таблица 2. Общие аминокислотные последовательности, кодируемые аллелями гипервариабельного участка *csd*, у исследуемых образцов (Sample ID) и образцов из базы данных GenBank (GB ID)

№ п/п	Sample ID (№ семьи)	GB ID
1	AQZ41178.1 (1)	ART88584.1; ADJ57961.1
2	AQZ41179.1 (13, 52)	ART88579.1
3	AQZ41180.1 (13)	ART88583.1; CCF23530.1
4	AQZ41185.1 (27)	ART88543.1; ADJ57937.1
5	AQZ41186.1 (43, 61, 136)	ART88602.1
6	AQZ41188.1 (43, 45)	ADJ57936.1; AAS86650.1
7	AQZ41194.1 (61)	ADJ57943.1
8	AQZ41199.1 (63)	ART88592.1; CCF23485.1
9	AQZ41197.1 (63)	ART88598.1; CCF23491.1
10	AQZ41200.1 (79)	ART88485.1
11	AQZ41201.1 (79)	AIS73038.1; ART88503.1
12	AQZ41203.1 (82)	ART88513.1
13	AQZ41204.1 (82)	CCF23512.1; ART88560.1
14	AQZ41207.1 (96)	ART88591.1; CCF23474.1
15	AQZ41215.1 (141)	CCF23487.1; ART88505.1

Lechner et al. [6], проанализировавшим 77 пар аллелей *csd* для определения различий между функциональными парами аллелей (гетерозиготами), число АК замен в ГВУ должно быть больше или равно шести. Тогда как в исследовании Beye et al. [7] было показано, что функциональный белок *csd* формируется, если в ГВУ наблюдаются пять АК замен. Различие в 5 АК замен в ГВУ считается минимально необходимым для получения функционального белка *csd* [5].

Мы сравнили полученные АК последовательности с последовательностями, представленными в GenBank (табл. 2). Среди 20 аминокислотных последовательностей, кодируемых аллелями ГВУ, 15 соответствуют уже известным (см. столбец GB ID в табл. 2).

К представленным в GenBank аллелям добавлены пять новых аллелей, обнаруженных в семьях № 26, 27, 45, 108 и 136-2 (обозначены полужирным шрифтом в табл. 1). Наличие 20 различных аллелей в 15 семьях разных линий *A. m. mellifera* свидетельствует о большом генетическом потенциале данной пасеки. Ранее Hyink et al. [2] в 42 семьях выявили 25 аллелей *csd*, а Zareba et al. [5] при анализе двух польских популяций медоносной пчелы обнаружили в одной из них 85 разных аллелей (в 99 семьях) и 74 аллеля в другой (в 94 семьях).

Анализ полиморфизма ГВУ гена пола в локальной популяции *Apis mellifera* L. в целом показал, что аллельное разнообразие данной выборки соответствует ранее полученным показателям для других популяций. Результаты исследования позволят скорректировать программу разведения ме-

доносных пчел с установкой на предотвращение использования трутней из семей, имеющих идентичные аллели *csd*. Таким образом, современные программы разведения пчел должны включать оценку пасек не только на хозяйственно полезные признаки, но и на аллельное разнообразие гена *csd*. Если оценка ХПП позволит отфильтровывать слабые семьи на уровне всей пасеки, то контроль аллельного разнообразия гена *csd* предотвратит появление диплоидных трутней, большая доля которых может привести к снижению численности рабочих пчел и, следовательно, к снижению силы семьи (т.е. контроль на уровне семьи).

Выражаем благодарность к. б. н. В.О. Кугейко за предоставление пчел для исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-44-020648 с использованием ресурсов ЦКП УФИЦ РАН и ЦКП “Коллекция насекомых ИБГ УФИЦ РАН”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beye M., Hasselmann M., Fondrk M.K. et al. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the Honeybee and encodes an SR-type protein // Cell. 2003. V. 114(4). P. 419–429. doi 10.1016/S0092-8674(03)00606-8
2. Hyink O., Laas F., Dearden P. Genetic tests for alleles of complementary-sex-determiner to support honeybee breeding programmes // Apidologie. 2013. V. 44(3). P. 306–313. doi 10.1007/s13592-012-0181-6
3. Каскинова М.Д., Николенко А.Г. Ген *csd* медоносной пчелы: структура, функционирование и эволюция // Генетика. 2017. Т. 53. № 3. С. 279–283.
4. Hasselmann M., Gempe T., Schiott M. et al. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination

- pathway in honeybees // *Nature*. 2008. V. 454(7203). P. 519–522. doi 10.1038/nature07052
5. Zareba J., Blazej P., Laszkiewicz A. et al. Uneven distribution of complementary sex determiner (*csd*) alleles in *Apis mellifera* population // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 2317. doi 10.1038/s41598-017-02629-9
 6. Lechner S., Ferretti L., Schöning C. et al. Nucleotide variability at its limit? Insights into the number and evolutionary dynamics of the sex-determining specificities of the honey bee *Apis mellifera* // *Mol. Biol. Evol.* 2014. V. 31(2). P. 272–287. doi 10.1093/molbev/mst207
 7. Beye M., Seelmann C., Gempe T. et al. Gradual molecular evolution of a sex determination switch through incomplete penetrance of femaleness // *Curr. Biol.* 2013. V. 23(24). P. 2559–2564. doi 10.1016/j.cub.2013.10.070

Polymorphism of Hyper-Variable Region of the *csd* Gene in the *Apis mellifera* L. Population in Southern Ural

M. D. Kaskinova^{a, *}, A. R. Gataullin^a, E. S. Saltykova^a,
L. R. Gaifullina^a, A. V. Poskryakov^a, and A. G. Nikolenko^a

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

^{*}*e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru*

In honey bees, sex is determined by an allelic combination of the *csd* gene. Low allelic diversity in the *csd* gene leads to a loss of colony strength, due to the appearance of nonviable diploid drones from eggs that homozygous for the *csd* gene. Therefore, in beekeeping there is need to identify and monitor the allelic diversity of the *csd* gene. In this paper, we present the results of the polymorphism analysis of hyper-variable region of the *csd* gene in the local population of *Apis mellifera mellifera* L. in Southern Ural. Among 42 amino acid sequences encoded by the alleles of hyper-variable region 20 alleles were identified, 5 of which were previously unknown. It was shown that the allelic diversity for the *csd* gene for a study population corresponds to those known for other populations of *A. mellifera* L.

Keywords: *Apis mellifera* L., DNA sequencing, honeybee genetics, *csd* gene.