

УДК 577.218

ПРИРОДНАЯ ПИЩА ЛИЧИНОК ПЧЕЛ *Apis mellifera* ПО-РАЗНОМУ ВЛИЯЕТ НА ХАРАКТЕР ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В СОДЕРЖАНИИ 5-МЕТИЛЦИТОЗИНА В ДНК МАТОК ПО СРАВНЕНИЮ С РАБОЧИМИ ОСОБЯМИ И ТРУТНЯМИ*

© 2015 А. Страческа**, К. Ольшевски, М. Бьяда,
Е. Деметраки-Палеолог

University of Life Sciences in Lublin, Department of Biological
Basis of Animal Production, Faculty of Biology and Animal Breeding,
Lublin 20-950, Poland; E-mail: aneta.strachecka@up.lublin.pl

Поступила в редакцию 01.12.14
После доработки 29.01.15

Одним из главных эпигенетических механизмов регуляции активации/ингибирования экспрессии генов является метилирование ДНК путем образования 5-метилцитозина. В представленной работе были определены иммуноферментным методом уровни общего метилирования ДНК у личинок, предкуколок, куколок и однодневных взрослых маток, рабочих особей и трутней пчел *Apis mellifera*. Процентное содержание 5-метилцитозина в ДНК личинок всех трех пчелиных каст было низким и одинаковым (~3–5%) вплоть до 4-го дня их развития после вылупления из яиц, однако у личинок трутней и рабочих особей содержание 5-метилцистеина было несколько выше, чем у личинок маток. В целом характер возрастных изменений в уровнях метилирования ДНК различался у маток по сравнению с рабочими особями и трутнями: если у маток на разных стадиях морфогенеза эти уровни были повышены, то у двух других пчелиных каст – понижены. Процентное содержание 5-метилцистеина и весовое содержание метилированной ДНК в предкуколках и куколках маток составляли 15% (9,18 нг) и 21% (10,74 нг) соответственно, т.е. были существенно выше, чем у рабочих пчел и трутней тех же возрастов (2,5–4% (0,03–0,07 нг). Причем только у маток уровни метилирования были примерно вдвое ниже у имаго по сравнению с куколками 12% (6,78 нг) и 21% (10,74 нг) соответственно.) Эти наблюдения представляют несомненный интерес, в частности, для эмпирической геронтологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Apis mellifera*, метилирование ДНК, эпигенетика, медоносная пчела, 5-метилцитозин, онтогенез.

Регуляция экспрессии генов в ответ на изменение окружающей среды осуществляется на различных уровнях, в том числе путем эпигенетической модификации ДНК [1, 2]. Одним из эпигенетических механизмов подавления генной экспрессии является метилирование цитозиновых азотистых оснований [3, 4]. Этот процесс осуществляется ДНК-метилтрансферазами, а в качестве донора –CH₃ групп выступает S-аденозил-L-метионин [5]. Многим организмам присуща фенотипическая пластичность, т.е. существование различных фенотипических форм, обладающих одним и тем же генотипом [6]. Личинки женских особей пчел *Apis mellifera* сохраняют полипотентность вплоть до 3-го дня после вылупления из яиц и могут превращаться

как в маток, так и в рабочих пчел, поэтому 3-й и 4-й дни онтогенеза женских особей являются решающими с точки зрения выбора пути их дальнейшего развития. Для этого личинки будущих маток выкармливаются “королевской” пищей (маточным молочком), а личинки будущих рабочих пчел получают «рабочую» пищу, содержащую пыльцу [7–11]. Личинки будущих трутней развиваются из неоплодотворенных яиц, но также получают особое питание, отличное от пищи маток и рабочих особей. Возникает вопрос, может ли такое различие в естественной диете личинок, определяющее их дальнейший фенотип, сопровождаться эпигенетическими различиями в общих уровнях метилирования ДНК у маток, рабочих пчел и трутней?

Известно, что компоненты «королевской» пищи способны подавлять экспрессию метилтрансфераз у личинок как на уровне генома, так и на посттрансляционном уровне, что приводит к снижению уровня метилирования гена, кодиру-

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 14-326, 22.02.2015.

** Адресат для корреспонденции.

ющего динактин р62, и, в свою очередь, к повышению рождаемости маток и снижению рождаемости рабочих пчел или особей промежуточных каст [6, 11]. Личинки, воспитываемые как матки или рабочие пчелы, различаются по набору экспрессирующихся генов [12]. 4-4-Фенилбутират, а также метаболит — фенилацетилглутаминат, будучи добавленными в пищу личинок рабочих особей, стимулируют экспрессию многих генов, регулирующих развитие и продолжительность жизни пчел [13]. Вилер и Робинсон [14] предположили, что добавление к пище пчел альтернативных источников углеводов (кукурузный сироп или сахароза) могло приводить к многочисленным различиям в экспрессии генов у взрослых рабочих особей. Эти изменения в экспрессии генов могли сказываться на метаболизме белков и процессах оксидоредукции, включая обмен ароматических аминокислот. Более того, наши предыдущие исследования позволяют предположить, что такие соединения как акарициды, кофеин, коэнзим Q, а также промышленные выбросы в атмосферу влияли на метаболизм белков и антиоксидантов у пчел [15–20]. Помимо этого, нами было установлено, что уровни общего метилирования ДНК повышались по мере взросления пчел-имаго; добавление кофеина в пищу существенно снижало уровни метилирования ДНК у стареющих рабочих насекомых [17], а обработка амфотерицином В — приводила к стимуляции метилирования [15]. Все эти наблюдения позволяют предположить, что зависимые от окружающих условий изменения экспрессии различных генов в процессе жизненного цикла пчел могут быть связаны с изменением уровней метилирования их ДНК, и что это метилирование играет ключевую роль в развитии и продолжительности жизни насекомых.

Большинство исследований, касающихся уровней 5-метилтирозина в ДНК пчел, базировались на определении этого соединения в ДНК, изолированной из мозга взрослых насекомых [21]. В свою очередь активность ДНК-метилтрансфераз как индикаторов интенсивности метилирования была определена у личинок и у имаго маток и рабочих пчел [11]. В представленном здесь исследовании мы применили комплексный подход и изучили уровни 5-метилцистеина у личинок на разных стадиях их развития, а также у предкуколок, куколок и молодых имаго разных пчелиных каст. Кушарски с соавт. [6] обнаружили, что интенсивность репликации ДНК была очень высокой у личинок 3–5-дневного возраста, что было обусловлено метилированием или деметилированием генных локусов-мишеней. Эти наблюдения свидетельствовали о

важности 3–5-дневного личиночного периода в онтогенезе женских особей пчел. Ши с соавт. [22] показали, что количество по-разному метилированных генов у 2-, 4- и 6-дневных личинок маток и рабочих пчел составляло 725, 3013 и 5049 соответственно. Многие из этих генов, принимающих участие в процессах развития, воспроизводства и регуляции метаболизма, слабее метилированы у личинок 4- и 6-дневных маток по сравнению с рабочими особями. В доступной литературе нет данных об уровнях общего метилирования ДНК на разных стадиях онтогенеза пчел. По этой причине в круг своего исследования мы включили 3- и 4-дневных личинок всех трех основных пчелиных каст: маток, рабочих особей и трутней. Помимо этого, мы исследовали предкуколки и куколки, поскольку существенные изменения в потреблении кислорода и производстве углекислого газа на этих стадиях метаморфоза могут быть связаны с изменением генной экспрессии. Кроме того, поскольку наблюдаются значительные различия в физиологии и поведении молодых имаго, то мы провели изучение особей различных каст и на этой стадии морфогенеза.

В этой работе проверены следующие гипотезы: 1) характер изменений в общем метилировании ДНК на отдельных стадиях развития пчел различается у маток, рабочих особей и трутней; 2) уровни общего метилирования ДНК повышаются в процессе онтогенеза пчел, как это происходит у других видов животных. Целью наших экспериментов явилось определение общего содержания 5-метилцистеина в ДНК маток, рабочих особей и трутней пчел *Apis mellifera* на разных стадиях их морфогенеза (включая личинок, предкуколок, куколок и молодых имаго). Проведенное нами исследование общего метилирования ДНК будет способствовать лучшему пониманию изменений в экспрессии генов в процессе онтогенеза особей различных пчелиных каст.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологический материал. Каждая из 10-ти пчелиных маток была искусственно осеменена семенем отдельного трутня и внесена в лишенную своей матки колонию пчел, размещенную в садках, состоящих из двух боксов (В1 + В2). Примерно через 1 мес и после начала откладки яиц матки из 5 колоний были изолированы в экранированные садки на три дня; каждый садок содержал по две рамки пустых сот (С1 и С2) для откладки яиц. Затем население каждой из этих пяти колоний было поделено на две равные

части и размещено в боксах В1 и В2. В каждый из пяти боксов В1 помещали по одной рамке с сотами С1 с яйцами и подсаживали маток для выведения из яиц рабочих особей. В боксы В2 помещали 1-дневных личинок, вылупившихся из яиц сот С2 и размещенных в 5-ти специальных пластиковых («Nisoplast», Франция) ячеистых маточных чашках; маток в эти боксы не подсаживали, чтобы выводились новые молодые матки. На 3-й и 4-й дни развития личинок и на стадии предкуколок (на 11-й день онтогенеза) отбирали по 20 образцов из сот С1, а также по 20 соответствующих образцов из маточных чашек каждого бокса В2. На 11-й день чашки из каждого бокса В2 помещали в инкубатор, а на 13-й (куколки) и 16-й дни (молодые матки-имаго) отбирали по 20 образцов из каждой чашки. По 20 аналогичных образцов (куколки и молодые рабочие-имаго) отбирали из сот С1 боксов В1 на 16-й и 21-й дни соответственно. Каждый отобранный образец помещали в пластиковую пробирку («Eppendorf», США) и хранили при -25° для дальнейшего анализа.

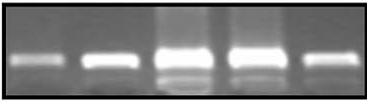
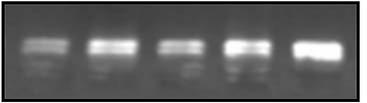
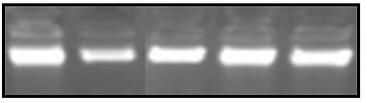
Оставшиеся пять маток обитали в пяти оставшихся колониях в садках, содержащих по одной рамке с пустыми сотами для выведения трутней (С3). На 3-й и 4-й дни развития личинок, на 14-й (предкуколки), 18-й (куколки) и 24-й дни (вышедшие молодые трутни) из каждой колонии отбирали по 20 образцов и замораживали их для дальнейшего анализа, как было указано выше.

Выделение ДНК и ее количественный и качественный анализ. Для экстракции ДНК использовали образцы цельных размороженных 3- и

4-дневных личинок, предкуколок и куколок, а также головы и грудные части однодневных имаго. Экстракцию проводили с использованием набора DNeasy Tissue Kit 250 («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и чистоту ДНК определяли по поглощению при 230, 260 и 280 нм на спектрофотометре BioPhotometer («Eppendorf», США). Для оценки степени метилирования использовали образцы ДНК с $A_{260}/A_{280} = 1,7-2,0$. Анализ состава препаратов ДНК проводили методом электрофореза в 1%-ном агарозном геле при 70 В в течение 60 мин с использованием прибора фирмы «Bio-Rad» (США). Гели окрашивали этидий бромидом и визуализировали полосы ДНК с помощью трансиллюминатора Syngene ВТХ 26М. Результаты анализа представлены в табл. 1.

Количественную оценку уровней общего метилирования ДНК выполняли с использованием набора Imprint Methylated DNA Quantification Kit MDQ1 («Sigma», США) методом иммуноферментного анализа в 96-луночных микропланшетах. В лунки раскапывали по 30 мкл разбавленного раствора ДНК (150 нг/мл) в буфере для связывания и инкубировали при 37° в течение 1 ч. Затем в лунки добавляли по 150 мкл раствора для блокирования и инкубировали в течение 30 мин при 37°. После инкубации раствор сливали и ополаскивали лунки 3 × 150 мкл 1× буфером для промывки. По окончании промывки в лунки добавляли по 50 мкл первичных антител и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем планшеты снова промывали 4 раза, добавляли по 50 мкл/в лунку разбавленного

Таблица 1. Спектрофотометрическая (I) и электрофоретическая (II) характеристика образцов ДНК, изолированных на разных стадиях развития пчел *A. mellifera*

	Матки					Рабочие					Трутни							
	Стадия развития	L3	L4	PP	P	E	Стадия развития	L3	L4	PP	P	E	Стадия развития	L3	L4	PP	P	E
I	Концентрация ДНК, нг/мкл	82	108	744	176	136	Концентрация ДНК, нг/мкл	6	18	81	37	130	Концентрация ДНК, нг/мкл	45	80	475	583	112
	A_{260}/A_{280}	2,17	1,17	1,1	1,21	0,96	A_{260}/A_{280}	1,75	1,41	1,34	1,76	1,96	A_{260}/A_{280}	2,23	1,60	232	1,93	2,12
II																		
		L3	L4	PP	P	E		L3	L4	PP	P	E		L3	L4	PP	P	E

Примечание. L3 и L4 – Личинки на 3-й и 4-й дни развития; PP – предкуколки; P – куколки; E – однодневные имаго.

конъюгата вторичных антител и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Планшеты снова промывали 5 раз, добавляли проявляющий раствор (по 100 мкл/в лунку), инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением стоп-раствора (по 50 мкл в лунку). Поглощение в лунках определяли при 450 нм с использованием ридера для микропланшетов. Расчет процентного содержания 5-метилцитозина в ДНК пчел проводили относительно образца для сравнения, в котором 100% цитозиновых оснований в ДНК было метилировано (МС), и использовали следующее уравнение: $[(A_{450}S - A_{450}B)/(A_{450}MC - A_{450}B)] \times 100\%$, где $A_{450}S$ – поглощение в лунках с тестируемой ДНК, $A_{450}B$ – в контрольных лунках без образцов ДНК, а $A_{450}MC$ – в лунках с образцом ДНК для сравнения (все значения поглощения были рассчитаны как средние по ≥ 3 лункам). Весовое содержание метилированной ДНК (нг) определяли по следующему уравнению: $[(A_{450}S - A_{450}B) - 0,08208] / 2,68e-3$.

Многомерный статистический анализ. Многомерная генеральная линейная модель (GLM) была построена с учетом следующих параметров: пчелиная каста, стадия развития особи, вид колонии. Параметр «вид колонии» задавался независимо от других, поэтому проводилось сравнение между собой только параметров «пчелиная каста» и «стадия развития особи» соответственно. Анализ проводили с использованием программы для двумерной ANOVA и теста Тукее (Tukey) (SAS Institute Version 9.13, 2002–2003 license 86636). Для определения процентного содержания 5-метилцистеина в ДНК использовали Bliss-преобразование ($y = \arcsin [x/100]^{0,5}$).

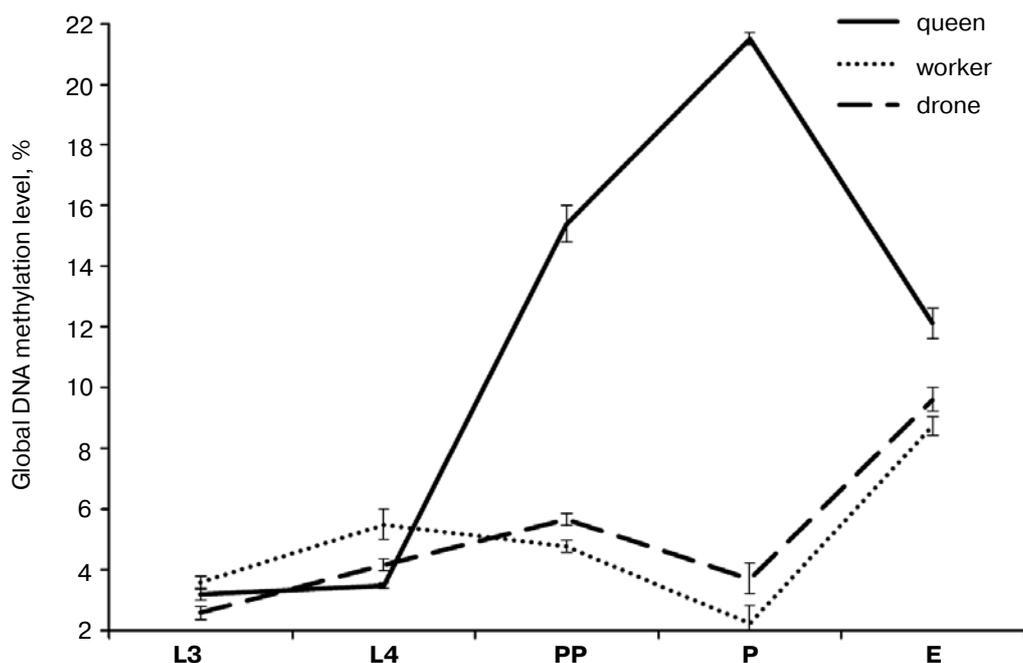
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Как следует из рисунка (см. значения в точках L3 и L4), между 3-м и 4-м днями развития пчел общее метилирование их ДНК (процент содержания 5-метилцистеина) немного возрастало у личинок рабочих особей и трутней, но не изменялось у маток. Однако все эти изменения в процентном содержании 5-метилцистеина были столь малы, что не отражались на весовом содержании метилированной ДНК (табл. 2, строки L3 и L4). Уровни метилирования ДНК значительно повышались у предкуколок и куколок маток, но не рабочих пчел или трутней (рисунок, значения в точках PP и P, а также табл. 2, строки PP и P). Таким образом, у предкуколок и куколок пчелиных маток среднее процентное, а также весовое содержание метилированной

ДНК было, соответственно, в 3 и 5 раз выше, чем у рабочих пчел на этих же стадиях морфогенеза. Впоследствии, начиная со стадии куколок, процентное содержание 5-метилцистеина (рисунок) и весовое количество метилированной ДНК (табл. 2) значительно снижалось у маток-имаго, но продолжало возрастать у взрослых трутней и рабочих пчел. Примечательно, что у однодневных имаго всех трех пчелиных каст уровни метилирования ДНК были очень близки между собой. Самый высокий процент метилирования наблюдался у куколок маток (~21%), а самый низкий – у куколок рабочих особей (~2,5%) (рисунок). Можно заключить, что зависящие от возраста пчел изменения характера общего метилирования ДНК сильно различались у маток, с одной стороны, и рабочих пчел и трутней – с другой. Наибольшая разница в уровнях метилирования ДНК наблюдалась между предкуколками и куколками маток, с одной стороны, и рабочими пчелами и трутнями на этих же стадиях морфогенеза – с другой.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее Кухарски с соавт. [6], Цедар и Бергман [23], Миклос и Малечка [24] и Лейко с соавт. [21] выдвинули предположение о том, что факторы окружающей среды, в частности компоненты пищи, влияют на экспрессию генов, а, следовательно, на фенотип и поведение особей различных пчелиных каст. В своем исследовании мы показали, что процентное содержание 5-метилцистеина в ДНК личинок всех пчелиных каст было низким и практически одинаковым вплоть до 4-дневного возраста. Эти результаты соответствовали полученным ранее данным о том, что способность личинок к полипотентному развитию исчезала лишь на 4–5-й дни их развития. Известно, что на 4-й день развития личинок маток уровень ювенильного гормона у них был выше, чем у личинок рабочих особей [22, 25]. Начиная с этого дня, в репродуктивной системе маток начинают формироваться ~150 овариол. Напротив, репродуктивная система рабочих пчел продуцирует только 2–20 овариол, и насекомые остаются стерильными. Кухарски с соавт. [6] установили, что уровни метилирования ДНК под действием ДНК-метилтрансферазы 3 по участкам CpG могут быть ниже у личинок маток, по сравнению с развивающимися рабочими пчелами. В своей работе мы также наблюдали более низкий уровень содержания 5-метилцистеина в ДНК личинок маток, чем в личинках рабочих пчел на начальных и промежуточных стадиях их развития (рисунок, L3 и L4).



Comparison of each caste with all the others (each column) separately

QUEEN	A	C	A	A	A
WORKER	A	A	B	B	B
DRONE	B	B	C	C	C

Comparison of each developmental stage with all the others (each row) separately

QUEEN	A	A	B	C	D
WORKER	A	B	B	C	D
DRONE	A	B	C	B	D

Уровень общего метилирования ДНК (процентное содержание 5-метилцистеина) у пчел *A. mellifera* в зависимости от возраста. В таблицах разные прописные буквы указывают на статистически значимые различия в уровнях метилирования ДНК при $P \leq 0,01$. Результаты сравнения представлены отдельно для каждой пчелиной касты (верхняя таблица) и каждой стадии развития (нижняя таблица). L3 и L4 – 3-й и 4-й дни развития личинок; PP – предкуколки; P – куколки; E – молодые однодневные имаго

Таблица 2. Весовое содержание метилированной ДНК в образцах из трех пчелиных каст *A. mellifera* на разных стадиях развития насекомых

Стадия развития	Матки*	Рабочие*	Трутни*
L3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
L4	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
PP	9,18 ± 1,25	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,04
P	10,74 ± 1,44	0,03 ± 1,15	0,05 ± 0,01
E	6,78 ± 0,61	5,63 ± 1,09	5,89 ± 0,94

* Средние значения ± s.d., н.г.; L3 и L4 – 3- и 4-дневные личинки; PP – предкуколки; P – куколки; E – однодневные имаго.

В большинстве работ авторы концентрировали свое внимание только на личиночном периоде развития пчел и на сравнении онтогенеза только маток и рабочих особей [9, 11, 21]. Здесь мы представили одно из первых исследований, включающее в себя изучение флуктуаций в метилировании ДНК у предкуколок и куколок пчел, причем, не только у женских особей, но и у трутней. Мы установили, что на ранних этапах развития характер возрастных изменений в общем метилировании ДНК у маток значительно отличался от изменений метилирования у рабочих пчел и трутней; у двух последних наблюдались сходные картины этих изменений (рисунок и табл. 2). И это несмотря на то, что рабочие пчелы развиваются из оплодотворенных яиц, а трутни – из неоплодотворенных [26], и на то, что трутни анатомически и поведенчески значительно отличаются от рабочих особей и получают разную личиночную пищу. Тем не менее было обнаружено, что флуктуации уровней ювенильного гормона во время развития личинок трутней имеют тот же характер, что и у личинок маток, в то время как общие титры этого гормона у трутней являются промежуточными между высокими – у маток и низкими – у рабочих пчел [27]. Скорость/уровни синтеза ювенильного гормона в *corpora alba* личинок трутней были, однако, почти такими же, как у личинок рабочих пчел. Анализ титров эрдистероидов показал, что активность эндокринной системы у личинок трутней была такой же, как и у личинок рабочих пчел (см. обзор [7]). Таким образом, наблюдаемые нами сходные возрастные изменения (флуктуации) в метилировании ДНК в процессе онтогенеза рабочих особей и трутней (см. рисунок) могут соответствовать характеру возрастных флуктуаций активности эндокринной системы у насекомых этих двух каст, которые были обнаружены другими исследователями. Изучение физиологического развития трутней в сравнении с матками и рабочими пчелами ранее не привлекало внимание исследователей, поэтому выявление общих для этих пчелиных каст биохимических и эпигенетических закономерностей может способствовать лучшему пониманию механизмов регуляции экспрессии генов. Более того, существующее до сих пор предположение о том, что рабочие пчелы являются эволюционно более поздней кастой, чем матки и трутни [27], скорее всего не верно, о чем свидетельствует общий характер биохимических и эпигенетических изменений, происходящих в организме трутней и рабочих особей в процессе онтогенеза. Не исключено, что каста маток (суперсамок) появилась эволюционно позднее, чем касты рабочих особей (обычных самок) и трутней, и яви-

лась результатом природной селекции. Возможно также, что касты рабочих пчел (неполноценных матки) и маток эволюционировали одновременно.

Эванс и Вилер [28], а также Барчук с соавт. [7] идентифицировали несколько сотен генов, которые по-разному экспрессировались у личинок маток и рабочих особей. Личинки маток демонстрировали повышенную экспрессию групп генов, участвующих в метаболических процессах и определяющих восприимчивость к элементам пищи, в том числе гены, кодирующие компоненты инсулиновой или инсулиноподобной сигнальной систем, а также гены-мишени рапамицин (TOR)-зависимого сигнального пути [7, 29]. Подавление у личинок уровня экспрессии протеинкиназы TOR и субстрата киназы инсулинового рецептора с помощью интерферирующих РНК приводило к появлению у индивидов, развивающихся как матки, некоторых черт рабочих пчел [8, 29, 30]. Рескон и соавт. [31] предположили, что подавление инсулин-зависимого и TOR-зависимого пути сопровождалось снижением титров ювенильного гормона и увеличением уровней метилирования ДНК, что могло быть связано с развитием личинок по пути их превращения в маток после 7-го дня онтогенеза. Все биохимические различия между личинками маток и рабочих пчел проявлялись уже между 3-м и 5-м днями их развития. Этим можно объяснить наблюдаемые нами высокие уровни метилирования ДНК у предкуколок и куколок маток по сравнению с рабочими особями и трутнями на этих же стадиях морфогенеза (рисунок, табл. 2). Высокие уровни метилирования ДНК у предкуколок и куколок маток могут быть обусловлены метилированием и деактивацией генов, ответственных за физиологию, поведение и полиэтизм у рабочих пчел [32, 33]. Однако, это сложный вопрос, требующий дальнейшего изучения. Кажется странным, что процентное содержание 5-метилцитозина в ДНК у молодых маток-имаго было выше, чем у рабочих-имаго, несмотря на то, что продолжительность жизни маток выше, чем у рабочих, а старение было обычно связано с постепенным повышением метилирования ДНК [6, 9, 34, 35].

Самым необычным из наших наблюдений явилось то, что у маток после максимального увеличения уровня метилирования ДНК куколок наблюдалось его почти двукратное снижение в течение двух дней, причем, у однодневных маток-имаго уровни метилирования были примерно такими же, как у однодневных рабочих пчел и трутней. Это наблюдение представляет значительный интерес для эмпирической геронтологии [6, 36, 37]. Кроме того, если сниже-

ние уровня метилирования ДНК у маток-имаго и повышение этих уровней у имаго рабочих пчел и трутней наступает в течение 1–2 дней после выхода из куколок, то может быть получен ответ на вопрос, поставленный в последнем предложении предыдущего абзаца.

Падение во всем мире численности популяций пчел стимулировало изучение генетики паразитов, поражающих этих насекомых [38, 39, 40]. Флуктуации уровней метилирования ДНК пчел в процессе онтогенеза должно простимулировать изучение эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов у пчелиных паразитов.

На основании полученных данных можно сделать следующие заключения.

1. Приобретенные новые знания о характерных изменениях общего метилирования ДНК трутней в процессе онтогенеза и предкуколок и куколок пчел всех каст открывают новые направления для дальнейших исследований. В частности, необходимо получить ответы на следующие вопросы: а) почему уровни общего метилирования ДНК предкуколок и куколок маток

значительно превышают уровни метилирования у рабочих особей и трутней на этих же стадиях морфогенеза? б) почему же все-таки в ДНК молодых маток-имаго процентное содержание 5-метилцистеина выше, чем у рабочих пчел и трутней? в) какова причина значительного снижения процентного содержания 5-метилцистеина в ДНК молодых маток-имаго по сравнению с предкуколками и куколками, из которых появляются эти взрослые насекомые?

2. Поскольку эпигенетические изменения, наблюдающиеся в процессе онтогенеза у трутней и рабочих пчел, имеют общий характер, то можно сделать вывод о ложности предположения о том, что рабочие особи появились эволюционно позднее, чем матки и трутни. Не исключено, что каста маток (суперсамок) появилась эволюционно позднее, чем каста рабочих пчел (обычных самок).

Работа выполнена в рамках исследовательского проекта ZKB/MN/5 2012–2014 Министерства науки и высшего образования Польши.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Foret, S., Kucharski, R., Pittelkow, Y., Lockett, G., and Maleszka, R. (2009) Epigenetic regulation of the honey bee transcriptome: unravelling the nature of methylated genes, *BMC Genom.*, DOI: 10.1186/1471-2164-10-472.
- Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M.E., Sanchez, F.J., Sinsheimer, J.S., Horvath, S., and Vilain, E. (2011) Epigenetic predictor of age, *PLoS*, **6**, 1–6.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.*, **16**, 6–21.
- Suzuki, M.M., Kerr, A.R.W., De Sousa, D., and Bird, A. (2007) CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome, *Genome Res.*, **17**, 625–631.
- Rogalska, S.M., Achrem, M., and Wojciechowski, A. (2010) *Chromatyna. Molekularne mechanizmy epigenetyczne* (in Poland), Wydawnictwo UP, Poznan, pp. 15–80.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., and Maleszka, R. (2008) Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation, *Science*, **319**, 1827–1830.
- Barchuk, A.R., Cristino, A.S., Kucharski, R., Costa, L.F., Simoes, Z.L., and Maleszka, R. (2007) Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*, *BMC Dev. Biol.*, **7**, DOI: 10.1186/1471-213X-7-70.
- Patel, A., Fondrk, M.K., Kaftanoglu, O., Emore, C., Hunt, G., Frederic, K., and Amdam, G. (2007) The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development, *PLoS One*, **2**, DOI: 10.1371/journal.pone.0000509.
- Maleszka, R. (2008) Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honeybees, *Epigenetics*, **3**, 188–192.
- Kamakura, M. (2011) Royalactin induces queen differentiation in honeybees, *Nature*, **473**, 478–483.
- Shi, Y.Y., Huang, Z.Y., Zeng, Z.J., Wang, Z.L., Wu, X.B., and Wei, Y.Y. (2011) Diet and cell size both affect queen-worker differentiation through DNA methylation in honeybees (*Apis mellifera*, *Apidae*), *PLoS One*, **6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0018808.
- Evan, J., and Wheeler, D. (2000) Expression profiles during honeybee caste determination, *Genome Biol.*, **2**, DOI: 10.1186/gb-2000-2-1-research0001.
- Burzynski, S., Paleolog, J., Patii, S., Ilkowska-Musial, E., Borsuk, G., Olszewski, K., Chittur, S., Gupta, V., Sarangi, R., and Strachecka, A. (2013) Changed gene expression and longevity in honeybees (*Apis mellifera*) fed with phenylbutyrate- and phenylacetylglutamate-supplemented diet, *Med. Weter.*, **69**, 753–759.
- Wheeler, M., and Robinson, G. (2014) Diet-dependent gene expression in honeybees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup, *Sci. Rep.*, **4**, 5726.
- Strachecka, A., Borsuk, G., Olszewski, K., Paleolog, J., Gagos, M., Chobotow, J., Nawrocka, A., Gryzinska, M., and Bajda, M. (2012) The effect of amphotericin B on the lifespan, body-surface protein concentrations and DNA methylation level of the honeybees (*Apis mellifera*), *J. Apic. Sci.*, **56**, 107–113.
- Strachecka, A., Gryzinska, M., and Krauze, M. (2010) The influence of environmental pollution on the protective proteolytic barrier of the honeybee *Apis mellifera mellifera*, *Pol. J. Environ. Stud.*, **19**, 855–859.
- Strachecka, A., Krauze, M., Olszewski, K., Borsuk, G., Paleolog, J., Merska, M., Chobotow, J., Bajda, M., and Grzywnowicz, K. (2014) Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*), *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1192–1201.
- Strachecka, A., Olszewski, K., Krauze, M., Paleolog, J., Borsuk, G., Merska, M., Bajda, M., and Chobotow, J.

- (2014) Coenzyme Q10 treatments influence the lifespan and key biochemical resistance systems in the honeybee, *Apis mellifera*, *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **86**, 165–179.
19. Strachecka, A., Paleolog, J., Borsuk, G., and Olszewski, K. (2012) Influence of formic acid on the body surface proteolytic system in different developmental stages of *Apis mellifera* L. workers, *J. Apic. Res.*, **51**, 252–262.
 20. Strachecka, A., Paleolog, J., Borsuk, G., Olszewski, K., and Bajda, M. (2012) DNA methylation in the honeybee (*Apis mellifera*) and its importance for biological research, *Med. Weter.*, **68**, 391–396.
 21. Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., and Maleszka, R. (2010) The honeybee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers, *PLoS Biol.*, **8**, 1–12.
 22. Shi, Y., Yan, W., Huang, Z., Wang, Z., Wu, X., and Zeng, Z. (2013) Genomewide analysis indicates that queen larvae have lower methylation levels in the honeybee (*Apis mellifera*), *Naturwiss.*, **100**, 193–197.
 23. Cedar, H., and Bergman, Y. (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms, *Nature Rev. Genet.*, **10**, 295–304.
 24. Miklos, G., and Maleszka, R. (2011) Epigenomic communication systems in humans and honeybees: from molecules to behavior, *Horm. Behav.*, **59**, 399–406.
 25. Hartfelder, K., Tozetto, S., and Rachinsky, A. (1993) Sex-specific developmental profiles of juvenile hormone synthesis in honeybee larvae, *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **202**, 176–180.
 26. Winston, M. (1987) *The biology of honey bee*, Harvard Univ. Press, Cambridge, pp. 46–213.
 27. Harfelder, K., and Engels, W. (1998) Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **40**, 45–77.
 28. Evans, J., and Wheeler, D. (1999) Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **96**, 5575–5580.
 29. Wheeler, D., Buck, N., and Evans, J. (2006) Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honeybee, *Apis mellifera*, *Insect Mol. Biol.*, **15**, 597–602.
 30. Wolschin, F., Mutti, N.S., and Amdam, G.V. (2011) Insulin receptor substrate influences female caste development in honeybees, *Biol. Lett.*, **7**, 112–115.
 31. Rascon, B., Mutti, N., Tolfsen, C., and Amdam, G. (2011) in *Mechanisms of Life History Evolution. Honeybee life history plasticity: development, behavior, and aging* (Flatt, T., and Heyland, A., eds) Vol. 1, Oxford University Press Inc., N.Y., pp. 253–266.
 32. Page, R., Scheiner, R., Erber, J., and Amdam, G. (2006) The development and evolution of division of labor and foraging specialization in a social insect (*Apis mellifera* L.), *Curr. Top. Dev. Biol.*, **74**, 253–286.
 33. Amdam, G., Ihle, K., and Pand, R. (2009) in: *Hormones, Brain and Behavior. Regulation of honey bee (Apis mellifera) life-histories by vitellogenin* (Pfaff, D., Arnold, A., Fahrbach, S., Etgen, A., and Rubin, R., eds) Vol. 4, Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 1003–1025.
 34. Beye, M., Hunt, G.J., Page, R.E., Fondrk, M., Grohmann, L., and Moritz, R. (1999) Unusually high recombination rate detected in the sex locus region of the honeybee (*Apis mellifera*), *Genetics*, **153**, 1701–1708.
 35. Ikeda, T., Furukawa, S., Nakamura, J., Sasaki, M., and Sasaki T. (2011) CpG methylation in the hexamerin 110 gene in the European honeybee, *Apis mellifera*, *J. Insect Sci.*, **74**, 1–11.
 36. Lyko, F., and Maleszka, R. (2011) Insect as innovative models for functional studies of DNA methylation, *Trends Genet.*, **27**, 127–164.
 37. Shao, X., He, S., Zhauang, X., Fan, Y., Li, Y., and Yao, Y. (2014) mRNA expression and DNA methylation in three key genes involved in caste differentiation in female honeybees (*Apis mellifera*), *Zool. Res.*, **35**, 92–98.
 38. Cornman, R., Schatz, M., Johnston, J., Chen, Y., Pettis, J., Hunt, G., Bourgeois, L., Elsik, C., Anderson, D., Grozinger, C., and Evans, J. (2010) Genomic survey of the ectoparasitic mite *Varroa destructor*, a major pest of the honey bee *Apis mellifera*, *BMC Genom.*, **11**, DOI: 10.1186/1471-2164-11-602.
 39. Fries, I. (2010) *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*), *J. Invert. Pathol.*, **103**, 573–579.
 40. Ptaszynska, A.A., Borsuk, G., Wozniakowski, G., Gnat, S., and Malek, W. (2014) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis* and *N. ceranae* in honeybees, *FEMS Microbiol. Lett. Fed. Europ. Microbiol. Sci.*, **357**, 40–48.

**NATURAL LARVAL DIET DIFFERENTLY
INFLUENCES THE PATTERN OF DEVELOPMENTAL
CHANGES IN DNA 5-METHYLCYTOSINE LEVELS
IN *Apis mellifera* QUEENS AS COMPARED
WITH WORKERS AND DRONES**

**A. Strachecka*, K. Olszewski, M. Bajda,
J. Demetraki-Paleolog**

*University of Life Sciences in Lublin, Department of Biological
Basis of Animal Production, Faculty of Biology and Animal
Breeding, Lublin 20-950, Poland;
E-mail: aneta.strachecka@up.lublin.pl*

Received December 1, 2014
Revision received January 29, 2015

The principal mechanism of gene activation/silencing is DNA 5-methylcytosine methylation. This study was aimed at determining global DNA methylation levels in larvae, prepupae, pupae, and 1-day-old adults of *Apis mellifera* queens, workers, and drones. The Imprint Methylated DNA Quantification Kit MDQ1 was used. Percentages of DNA 5-methylcytosine were low and relatively similar in the larvae of all the castes until the fourth day of larval development (3–5%). However, they were higher in the drone and worker larvae than in the queen larvae. Generally, the developmental patterns of changes in DNA methylation levels were different in the queens in comparison with the drones and workers. While methylation increased in the queens, it decreased in the drones and workers. Methylated DNA methylcytosine percentages and weights in the queen prepupae (15%; 9,18 ng) and pupae (21%; 10,74 ng) were, respectively, three and four times higher than in the worker/drone brood of the same age (2,5–4%; 0,03–0,07 ng). Only in the queens, after a substantial increase, did DNA methylation decrease almost two-fold between the pupal stage and queen emergence (from 21% and 10,74 ng to 12% and 6,78 ng). This finding seems very interesting, particularly for experimental gerontology.

Key words: Apis mellifera, DNA methylation, epigenetics, honeybee castes, 5-methylcytosine, ontogenesis