

На правах рукописи



Ильясов Рустем Абузарович

ПОЛИМОРФИЗМ *APIS MELLIFERA MELLIFERA* L. НА УРАЛЕ

Специальность 03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Уфа 2006

e-mail: apismell@hotmail.com
450054, г.Уфа, проспект Октября, 71, Институт биохимии и генетики УНЦ РАН.

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Николенко Алексей Геннадьевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, доцент
Книсс Владимир Александрович
кандидат медицинских наук
Кутуев Ильдус Альбертович

Ведущая организация: Санкт-Петербургский государственный аграрный университет.

Защита диссертации состоится 21 ноября 2006 г. в _____ часов на заседании Регионального диссертационного совета КМ 002.133.01. при Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, Уфа, проспект Октября, 71.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Уфимского научного центра РАН.

Автореферат разослан _____ октября 2006 г.

Ученый секретарь Регионального диссертационного совета, к.б.н.



С.М.Бикбулатова.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Медоносная пчела *Apis mellifera* L. по современной классификации подразделяется на 25 подвидов (Engel, 1999), населяющих территорию всей Африки, Европы, Ближнего и Среднего Востока. Подвид *Apis mellifera mellifera* L. (темная европейская или среднерусская пчела) занимал протяжённую территорию от Британских островов до Урала вдоль северной границы естественного видового ареала. Эволюция этого подвида проходила в суровых природно-климатических условиях, в результате чего он приобрел свойства, обеспечивающие его преимущество перед другими подвидами пчел в Северной Европе (Шафиков с соавт., 2002).

В последнее время в результате хозяйственной деятельности человека произошла интенсивная гибридизация подвидов пчел, вследствие чего были утрачены их некоторые ценные качества. Считалось, что уже в 80-х годах в Западной Европе невозможно было найти негибридизованные семьи *A.m.mellifera*. В СССР *A.m.mellifera* также была подвержена интенсивной гибридизации в результате завоза пчел из южных регионов страны. Однако предполагалось, что в отдельных местах еще могли сохраниться популяции *A.m.mellifera*. А.В.Петухов с соавт. (1996) на основе морфометрических исследований пчел сообщали о сохранении популяций *A.m.mellifera* на территории Пермского края. По мнению В.С.Филатова (2004), популяция *A.m.mellifera* могла сохраниться в лесах Красноуфимского района Свердловской области. На Урале широко известно обитание бортовых пчел *A.m.mellifera* в Бурзянском районе Республики Башкортостан.

Ранее было показано, что морфометрические методы не всегда позволяют достоверно идентифицировать подвидовую принадлежность пчел (Саттаров, Николенко, 2000), поэтому наши исследования проводились с использованием ДНК-маркеров, которые в большинстве случаев позволяют более точно определять таксономическую принадлежность. А.Г.Николенко и А.В.Поскряков (2002) на основе изучения полиморфизма межгенного локуса COI-COII мтДНК подтвердили, что популяция *A.m.mellifera* действительно сохранилась на

территории Бурзянского района Республики Башкортостан. Последующие исследования не позволили расширить перечень популяций *A.m.mellifera* на Урале. Очевидно, что для сохранения генофонда *A.m.mellifera* на Урале желательно иметь несколько генетических резерватов, а также располагать информацией о популяционно-генетической структуре подвида *A.m.mellifera* и границах ареалов составляющих его локальных популяций.

Целью работы являлось изучение полиморфизма, генетической структуры и филогенетики подвида *Apis mellifera mellifera* L. на Урале. Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Найти сохранившиеся популяции *A.m.mellifera* на Урале на основе полиморфизма межгенного локуса COI-COII митохондриальной ДНК.
2. Определить генетическую структуру обнаруженных популяций *A.m.mellifera* на основе полиморфизма ядерной и митохондриальной ДНК.
3. Провести филогенетический анализ подвидов *Apis mellifera* L. на основе нуклеотидного полиморфизма фрагмента гена 2-ой субъединицы NADH дегидрогеназы (ND2) митохондриальной ДНК.

Научная новизна. Было показано существование четырёх сохранившихся локальных популяций *A.m.mellifera* на Урале на основе полиморфизма межгенного локуса COI-COII мтДНК. Одновременно установлено, что уинская популяция, ранее принимаемая по морфометрическим признакам за популяцию *A.m.mellifera*, является гибридной.

Анализ генетической структуры уральских популяций *A.m.mellifera* на основе полиморфизма ядерной и митохондриальной ДНК выявил тесное генетическое родство, небольшую долю инбридинга и дефицит гетерозигот. Таким образом, было показано, что *A.m.mellifera* на Урале существует в виде островной генетически неподразделённой популяции. Кроме того, показано генетическое родство уральских и западноевропейских популяций *A.m.mellifera*.

Сравнительным анализом митотипов фрагмента гена ND2 митохондриальной ДНК показано, что подвид *A.m.mellifera*, вероятно, является единственным представителем внутривидовой эволюционной ветви М, а предковой формой вида *Apis mellifera* L. могли быть пчелы эволюционной ветви С.

Практическая значимость. Уникальный для России комплекс молекулярно-генетических маркёров, применённых в работе, сохранившиеся генетические резерваты *A.m.mellifera*, выделенные в ходе исследований, а также углублённая статистическая обработка данных позволят усовершенствовать разработанную ранее стратегию сохранения генофонда этого ценного подвида.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ «Молекулярно-генетические основы создания породных групп среднерусской пчелы» (06-04-08183-офи).

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на III съезде Всероссийского общества генетиков и селекционеров (Москва, 6-12 июня 2004 г.), конференции «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 4-7 апреля 2005 г.), III Конкурсе научных работ молодых ученых и аспирантов УНЦ РАН и АН РБ (Уфа, 10-18 декабря 2005 г.), Межрегиональном совещании энтомологов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 20-24 сентября 2006 г.) и IX Всероссийском популяционном семинаре «Особь и популяция – стратегии жизни» (Уфа, 2-7 октября 2006 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ, а также депонировано 15 сообщений о нуклеотидных последовательностях в международных генбанках EMBL, NCBI, DDBJ.

Структура диссертации. Работа изложена на 183 страницах, содержит 19 таблиц и 45 рисунков и состоит из введения, обзора литературы (глава I), описания материалов и методов исследований (глава II), результатов исследований и их обсуждения (глава III), заключения, выводов, списка литературы (400 источников, в том числе 280 иностранных) и приложения.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Был проведен обзор литературы по использованию морфометрических методов, полиморфизма ядерных и митохондриальных локусов для изучения пчел и других перепончатокрылых. Представлена проблема глобальной гибридизации подвидов *A.mellifera* и возможные перспективы сохранения популяций подвида *A.m.mellifera* в Западной Европе и России. Выполнен анализ литературы в области филогеографических и филогенетических исследований пчел *A.mellifera*.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В исследованиях использовали пчел с 11 пасек 3 районов Республики Башкортостан и с 11 пасек 7 районов Пермского края. Всего проанализировали ДНК пчел из 550 семей уральских популяций.

ДНК выделяли из мышц торакса фиксированных в 96%-ном этаноле пчел. Выделение проводили смесью гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформа (Chomezynski, Sacchi, 1987). Популяции пчел изучали на основе анализа полиморфизма фрагмента гена дефензина, двух микросателлитных локусов ar243 и 4a110 (ядерная ДНК), фрагмента гена ND2 и межгенного локуса COI-COII (митохондриальная ДНК). ПЦР проводили в термоциклере “Циклотерм” при оптимальном для каждой пары праймеров температуре отжига. Амплификаты разделяли в полиакриламидном и агарозном гелях с использованием TBE-буферного раствора и окрашивали бромистым этидием.

Для секвенционного анализа фрагмента гена ND2 использовали по три пчелы из четырёх выделенных популяций *A.m.mellifera* на Урале, а также из популяции *Apis mellifera macedonica* Ruttner с пасеки А.Д.Комиссара из Украине. Всего просеквенировали фрагмент гена ND2 мтДНК (с 502 п.н. по 1134 п.н. относительно последовательности полной митохондриальной ДНК *Apis mellifera ligustica* Spinola из генбанков EMBL, NCBI, DDBJ (NC 001566)) у 15 пчел. Определение нуклеотидной последовательности проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, USA) с использованием набора для флюоресцентного мечения DYEnamicTMET

согласно протоколу фирмы производителя (Amersham Pharmacia Biotech DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit).

Математическую обработку результатов исследований проводили с использованием программ GENEPOP ver. 3.3 (2001) (Raymond and Rousset, 1995), POPULATION ver. 1.2.28 CNRS UPR9034, STATISTICA ver. 6.0 (StatSoft, Inc., 2003), STATGRAFICS Plus 3.0, DNASTAR ver. 5.05 (1989-2002), CHROMAS 1.45 (McCarthy, 1996-1998), MEGA ver. 3.1 (1993-2005) (Kumar, Tamura and Nei, 2004), netViz professional ver. 6.50.00 Built 688n (1993-2002), NETWORK 4.1.1.2. Copyright 2004 Fluxus Technology Ltd.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поиск сохранившихся популяций *A.m.mellifera* на Урале

Поиск локальных популяций *A.m.mellifera* проводили методом ПЦР-анализа на предмет изучения структурного полиморфизма межгенного локуса COI-COII мтДНК (рис. 1). Ранее Ю.М.Никоноров с соавт. (1998) показали, что подвиду *A.m.mellifera* соответствует комбинация элементов PQQ, а южным подвидам (*Apis mellifera ligustica* Spinola, *Apis mellifera caucasica* Gorbatschev и *Apis mellifera carnica* Pollmann) – только один элемент Q. Результаты анализа показали, что частота встречаемости комбинации PQQ в уральских популяциях пчел варьировала от 0,57 до 1,00 (табл. 1).

Пчелы с пасек Уинского района Пермского края и Иглинского района Республики Башкортостан характеризовались частотой встречаемости комбинации PQQ 0,71 и 0,57, соответственно. Такое значение частоты комбинации PQQ в уинской популяции является показателем ее гибридизации, что противоречит заключению А.В.Петухова с соавт. (1996), проведенному на основе данных морфометрического метода.

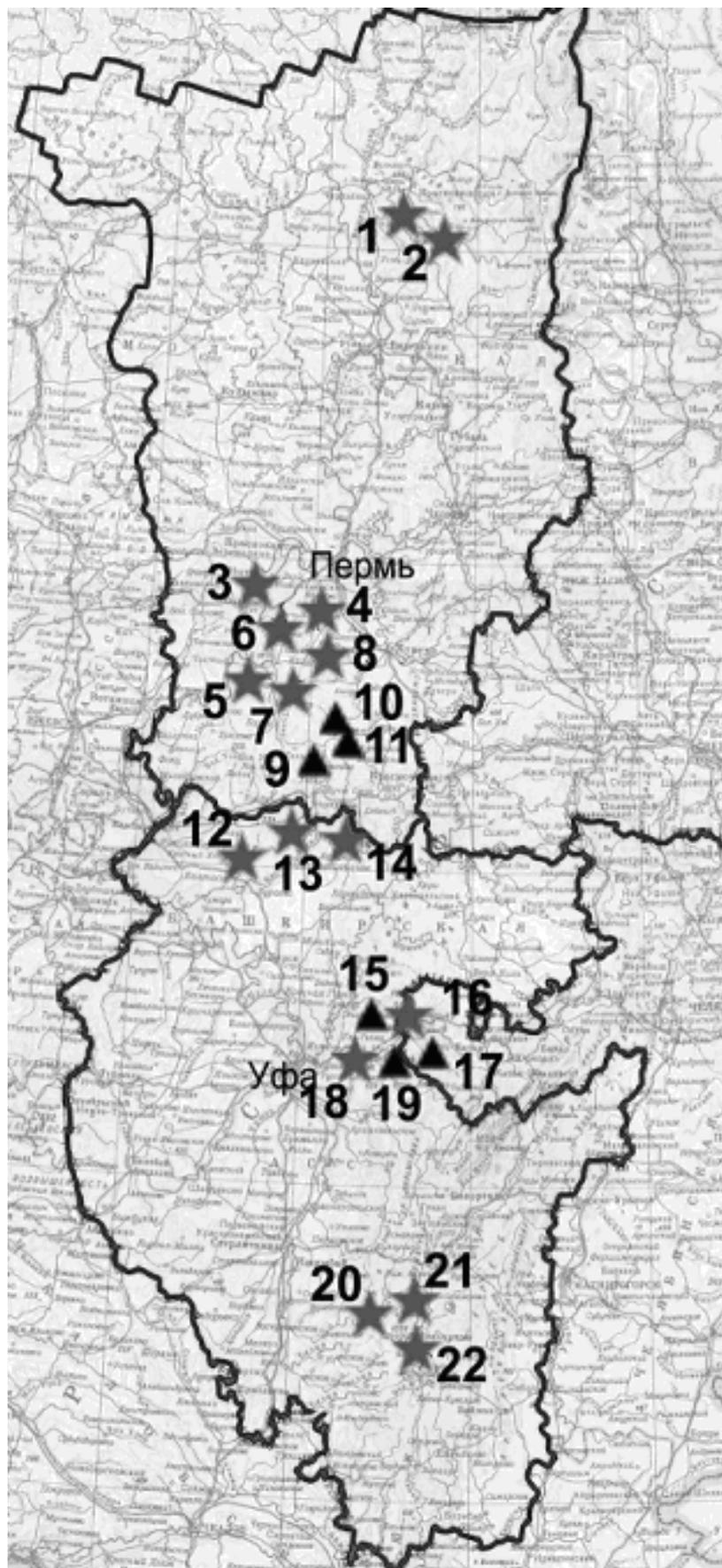
Иглинская популяция, в целом, оказалась гибридной, хотя пасеки Кугейко и Орловская характеризовались частотой встречаемости комбинации PQQ 0,90 и 0,93, соответственно. Вместе с тем данные пасеки не могут быть отнесены к популяции *A.m.mellifera*, так как расположены в массовом окружении пасек с гибридными семьями, между которыми возможен интенсивный поток генов.

Наиболее высокой частотой встречаемости комбинации PQQ характеризовались пасеки Вишерского района Пермского края - вишерская популяция *A.m.mellifera*, пасеки Нытвенского, Пермского, Ординского, Осинского и Частинского районов Пермского края - южно-прикамская популяция *A.m.mellifera*, пасеки и борти Бурзянского района Республики Башкортостан - бурзянская популяция *A.m.mellifera*, а также пасеки Татышлинского района республики Башкортостан - татышлинская популяция *A.m.mellifera*.

Таким образом, высокий уровень частоты встречаемости комбинации PQQ на пасеках позволяет говорить о существовании на данный момент, как минимум, четырех сохранившихся популяций *A.m.mellifera* на Урале: вишерской, южно-прикамской, татышлинской и бурзянской (рис.2). Эти популяции в качестве генетических резерватов могут выступать в качестве особо охраняемых территорий для сохранения генофонда *A.m.mellifera* и служить источником для восстановления генофонда в границах прежнего ареала подвида.

Генетические характеристики популяций *A.m.mellifera* на Урале

Следующим этапом нашей работы было получение генетических характеристик популяций *A.m.mellifera* на Урале на основе анализа данных о вариабельности фрагмента гена дефензина и микросателлитных локусов ar243 и 4a110. По результатам анализа частот аллелей были рассчитаны генетические расстояния D по M.Nei (1978) между популяциями пчел на Урале (табл. 2), которые изменялись в пределах от 0,005 до 0,116. Между популяциями *A.m.mellifera* генетические расстояния были в пределах от 0,005 до 0,031, тогда как между иглинской популяцией и популяциями *A.m.mellifera* генетические расстояния имели большие значения и изменялись в пределах от 0,049 до 0,116.



Номерами обозначены пасеки:

- 1 - И.И.Антипина (вишерская),
- 2 - Н.Т.Антипина (вишерская),
- 3 - с.Григорьевское (южно-прикамская),
- 4 - с.Бершеть (южно-прикамская),
- 5 - с.Частые (южно-прикамская),
- 6 - с.Оса (южно-прикамская),
- 7 - с.Притык (южно-прикамская),
- 8 - д.Ашап (южно-прикамская),
- 9 - д.Верх-Тулва (южно-прикамская),
- 10 - д.Грибаны (южно-прикамская),
- 11 - д.Екатериновка (южно-прикамская),
- 12 - д.Шулганово (татышлинская),
- 13 - к-з Ленина (татышлинская),
- 14 - к-з Салавата (татышлинская),
- 15 – Гареева (иглинская),
- 16 – Орловская (иглинская),
- 17 – Матковыводная (иглинская),
- 18 – Кугейко (иглинская),
- 19 – Громова (иглинская),
- 20 - Капова Пещера (бурзьянская),
- 21 – Борти (бурзьянская),
- 22 - д.Коран-Елга (бурзьянская).

★ - пасеки с содержанием комбинации RQQ больше 90%,
 ▲ - пасеки с содержанием комбинации RQQ меньше 90%.

Рисунок 2. Точки сбора пчел *A.mellifera* на Урале.

Генетические расстояния (D) Nei (1978) между популяциями пчел на Урале

Популяция	Бурзянская	Татышлинская	Вишерская	Южно-Прикамская	Иглинская
Бурзянская	0,000	0,031	0,009	0,015	0,049
Татышлинская		0,000	0,021	0,005	0,116
Вишерская			0,000	0,011	0,089
Южно-Прикамская				0,000	0,100
Иглинская					0,000

Для графического отображения генетической дифференциации популяций на основе полученных генетических расстояний (D) Nei использовали программу STATGRAFICS (рис. 3). Иглинская популяция была наиболее удалена от популяций *A.m.mellifera*, тогда как между популяциями *A.m.mellifera* не наблюдалось статистически значимой генетической дифференциации.

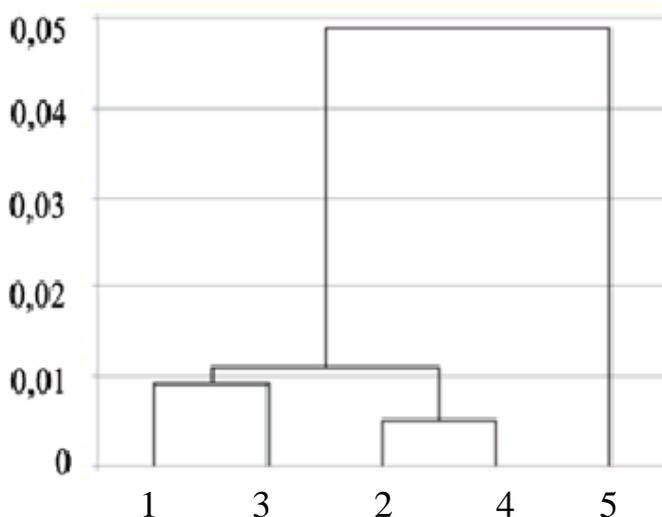


Рисунок 3. Дендрограмма генетического родства популяций пчел на Урале, построенная методом кластеризации ближайшего соседа (Saitou, Nei, 1987) на основе генетических расстояний (D) Nei (1983). Цифрами обозначены популяции: 1 - бурзянская, 2 – татышлинская, 3 – вишерская, 4 – южно-прикамская, 5 – иглинская.

Значение коэффициента дифференциации F_{st} (Cockerham, 1973; Weir, Cockerham, 1984) между популяциями *A.m.mellifera* изменялось в пределах от 0,001 до 0,015 (табл. 3), что очень близко к нулю и свидетельствует об отсутствии

генетической дифференциации популяций. Коэффициент дифференциации между иглинской популяцией и популяциями *A.m.mellifera* изменялся от 0,059 до 0,138, что намного больше такового только между уральскими популяциями *A.m.mellifera*.

В дальнейшем были рассчитаны F-коэффициенты для уральской популяции *A.m.mellifera* в целом. Значение коэффициента дифференциации $F_{st}=0,012$ позволяет нам утверждать об отсутствии статистически значимой дифференциации популяций *A.m.mellifera* на Урале. Возможно, что популяции *A.m.mellifera* на Урале произошли от единой предковой популяции *A.m.mellifera*.

Таблица 3

Коэффициенты дифференциации F_{ST} между популяциями пчел на Урале

Популяция	Татышлинская	Вишерская	Южно-Прикамская	Иглинская
Бурзянская	0,025	0,001	0,008	0,059
Татышлинская		0,015	0,003	0,138
Вишерская			0,004	0,102
Южно-Прикамская				0,116

Средние значения коэффициента инбридинга субпопуляций $F_{is}=0,241$ и коэффициента инбридинга для всей подразделенной популяции $F_{it}=0,250$. Положительные значения этих коэффициентов инбридинга являются показателями дефицита гетерозигот и инбридинга в субпопуляциях и во всей подразделенной популяции *A.m.mellifera* на Урале.

Значение средней наблюдаемой гетерозиготности внутри субпопуляций $H_o=0,354$ меньше значения средней ожидаемой гетерозиготности субпопуляций $H_s=0,471$ и средней ожидаемой гетерозиготности всей подразделенной популяции $H_t=0,477$, что является показателем дефицита гетерозигот в локальных популяциях *A.m.mellifera* на Урале.

Значение вероятности P для точного теста Харди-Вайнберга (таб.4), рассчитанное по методу Фишера (Haldane, 1954; Weir, 1990; Guo, Thompson, 1992) показало, что большинство популяций *A.m.mellifera* на Урале имеет распределение, отличное от ожидаемого по Харди-Вайнбергу ($P < 0,05$). Только для вишерской популяции значение вероятности $P = 0,0852$ ($P > 0,05$), что свидетельствует о том, что она находится в равновесии Харди-Вайнберга (таб. 4).

Таблица 4

Значения критерия значимости Пирсона χ^2 и вероятности P для популяций пчел на Урале

Популяция	$\chi^2_{\text{факт}}$	Число степеней свободы	Вероятность P
Бурзянская	54,80	6	<0,0001
Татышлинская	26,90	6	0,0002
Вишерская	11,10	6	0,0852
Южно-Прикамская	32,80	6	<0,0001
Иглинская	21,50	6	0,0015

Таким образом, на основе вышеперечисленных генетических характеристик можно кратко сказать, что популяции *A.m.mellifera* на Урале в целом характеризовались отсутствием статистически значимой генетической дифференциации, а также небольшим инбридингом, дефицитом гетерозигот и отклонением от равновесия Харди-Вайнберга. Иглинская же популяция, как гибридная, характеризовалась значительной генетической дифференциацией от популяций *A.m.mellifera*.

Вариабельность нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК и филогенетический анализ

Дальнейшие исследования были основаны на секвенционном анализе фрагмента гена ND2 мтДНК (рис. 1). В ходе секвенционного анализа амплифицированного фрагмента гена ND2 мтДНК медоносной пчелы была определена его нуклеотидная последовательность со средним размером 688 п.н.

Нуклеотидные последовательности просеквенированных фрагментов гена ND2 мтДНК пчел были депонированы в международные генбанки EMBL, NCBI, DDBJ (Pyasov et al., 2005; Pyasov et al., 2006).

При сравнении нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК уральских пчел *A.m.mellifera*, украинских пчел *A.m.macedonica* со взятой в качестве референсной нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК бурзянской бортовой пчелы (DQ181611), наблюдали 12 нуклеотидных замен (табл. 5). Нумерация нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК ведется относительно последовательности полной митохондриальной ДНК *A.m.ligustica* из генбанков EMBL, NCBI, DDBJ (NC 001566).

Таблица 5.
Сайты замен нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК пчел при сравнении с пчелой из бурзянской популяции*

№ секвенса	504	536	621	816	861	987	999	1015	1023	1047	1071	1099
DQ181611	T	T	C	T	G	A	T	T	C	T	C	T
DQ181612
DQ181613
DQ181614	.	C**
DQ181615
DQ181616
DQ181617	A
DQ181618	.	C**	.	.	A	C	.	.
DQ181619	.	.	T	C
DQ181620
DQ181621	A
DQ181622
DQ361088	C	.	.	C	.	T	C	C	T	.	T	.
DQ361089	C	.	.	C	.	T	C	C	T	.	T	C
DQ361090	C	.	.	C	.	T	C	C	T	.	T	C

* Нумерация сайтов замен ведется относительно последовательности полной митохондриальной ДНК *A.m.ligustica* из генбанков EMBL, NCBI, DDBJ (NC 001566).

** обозначены транзиции, приводящие к аминокислотной замене Ile на Thr.

В частности, между нуклеотидными последовательностями фрагмента гена ND2 мтДНК уральских пчел наблюдалось 5 сайтов замен нуклеотидов, где замена

T>C в позиции 536 в нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК двух уральских пчел DQ181614 и DQ181618 привела к замене в аминокислотной последовательности в положении 12 аминокислоты изолейцин (Ile) на треонин (Thr). При сравнении нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК украинских пчел с референсной наблюдалось 8 сайтов замен нуклеотидов, где нуклеотидная замена A>T в позиции 987 являлась трансверсией. Украинские же пчелы отличались между собой всего одной нуклеотидной заменой T>C в позиции 1099.

Для графического отображения генетических отношений пчел из локальных популяций *A.m.mellifera* на Урале на основе сравнения нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК использовали программу MEGA (Nei, Kumar, 2000) (рис. 4). На дендрограмме не наблюдалось дифференциации образцов пчел из разных локальных популяций *A.m.mellifera* на Урале по популяциям, что является показателем их тесного генетического родства.

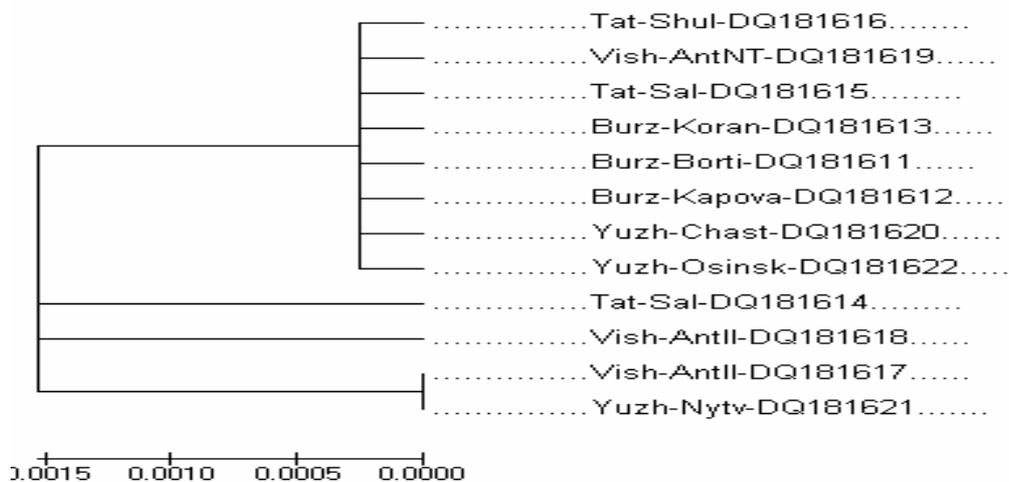


Рисунок 4. Дендрограмма генетических отношений пчел популяций *A.m.mellifera* на Урале, построенная по вариациям нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК с использованием метода кластеризации ближайшего соседа. Обозначены популяции: Tat – татышлинская, Yuzh – южно-прикамская, Vish- вишерская, Burz – бурзянская.

В дальнейшем были сравнены нуклеотидные последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК *A.m.mellifera* уральских популяций со всеми доступными в генбанках EMBL, NCBI, DDBJ нуклеотидными последовательностями этого же локуса большинства подвидов *A.mellifera* с

использованием программы MEGA (Nei, Kumar, 2000) (рис. 5).

На дендрограмме наблюдалась группировка образцов на четыре эволюционные ветви, сходная с подразделением подвидов *A.mellifera*, предложенного F.Ruttner et al. (1978), который использовал морфометрические методы. Однако по подвидовому составу групп наблюдались различия с F.Ruttner et al. (1978). Подвидовой состав четырех эволюционных ветвей предложенных M.C.Arias, W.S.Sheppard (1996), P.Franck et al. (2000) с использованием этого же локуса – фрагмента гена ND2 мтДНК, оказался более похожим на наш. Названия четырех эволюционных ветвей, для упрощения, мы оставили прежними, то есть А, М, С и О, как у F.Ruttner et al. (1978), несмотря на различия в подвидовом составе и только внешнее сходство этих эволюционных ветвей.

Представители уральских и европейских популяций *A.m.mellifera* кластеризовались в одну группу, которую мы назвали эволюционной ветвью М. Но от ветви М, предложенной F.Ruttner et al. (1988), она отличалась тем, что в ее состав вошел только один единственный подвид - *A.m.mellifera*.

Большинство представителей африканских подвидов пчел объединились во вторую группу, названную нами эволюционной ветвью А, по аналогии с F.Ruttner et al. (1988), хотя по составу подвидов наблюдались определенные различия. Эта ветвь разделилась на две подгруппы, объединяющие северо-африканские и южно-африканские подвиды, что сходно с группировкой M.C.Arias, W.S.Sheppard (1996). Однако, в отличие от группировки M.C.Arias, W.S.Sheppard (1996), мы еще наблюдали третью африканскую группу, объединяющую пчел Центральной Африки - *Apis mellifera adansonii* Latreille из Сенегала и *Apis mellifera scutellata* Lapeletier из Кении.

От основания ветви А параллельно отошла небольшая группа, куда вошли *Apis mellifera meda* Skorikov из Сирии, *Apis mellifera syriaca* Buttell-Reepen из Сирии и *Apis mellifera lamarckii* Cockerell из Египта, которую мы назвали эволюционной ветвью О. Эта ветвь по составу подвидов также имела отличия от ветви О, предложенной F.Ruttner et al. (1988).

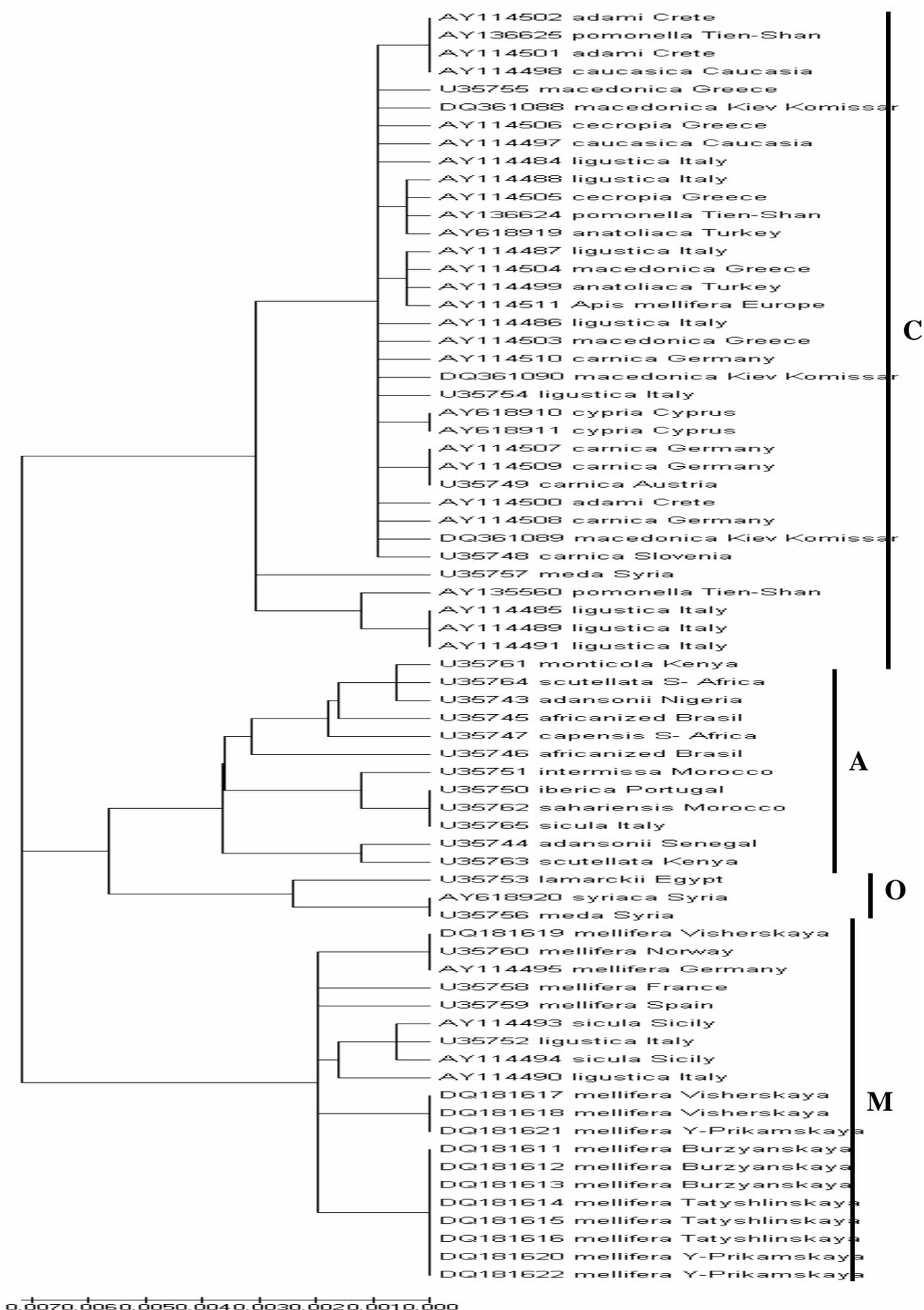


Рисунок 5. Дендрограмма, построенная по вариациям нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК у подвидов *A.mellifera*, используя метод кластеризации ближайшего соседа.

В четвертую многочисленную группу, названную нами как эволюционная ветвь С, вошли пчелы Средиземноморья, Ближнего Востока и Кавказа. Эта эволюционная ветвь по составу подвидов отличалась от состава ветви С, предложенного F.Ruttner et al. (1988).

Дальнейший анализ проводили путем сравнения митотипов всех доступных в генбанках EMBL, NCBI, DDBJ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена ND2 большинства подвидов *A.mellifera* с использованием программы MEGA (Nei, Kumar, 2000) (рис.6). Эта медианная сеть отражает филогенетические связи подвидов *A.mellifera*, которые дифференцировались также на четыре группы - эволюционные ветви, сходные с теми, что получены на дендрограмме.

Внутривидовой анализ показал, что ни один из ныне существующих подвидов *A.mellifera* не может являться предковым по отношению к другим подвидам. Однако, наиболее близкими к предковой форме являются, по результатам наших исследований, представители эволюционной ветви С, что отличается от предположения F.Ruttner (1988), который к предковой форме по отношению к другим подвидам *A.mellifera* относил представителей ветви О. Другим доказательством этого может служить структура межгенного локуса COI-COII мтДНК *A.mellifera*. У представителей эволюционной ветви С межгенный локус COI-COII состоял только из одного элемента Q, тогда как все остальные три эволюционные ветви содержали от 1 до 4 элементов Q плюс элемент Р. Возможно, что эволюционная ветвь С как предковая имела более простую структуру межгенного локуса COI-COII, а возникшие затем из нее другие эволюционные ветви по мере дивергенции стали обретать более сложное строение: приобрели элемент Р и до 4 дубликаций элемента Q.

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК подвидов *A.mellifera* и двух видов пчел *Apis cerana* Fabricius и *Mellipona bicolor* Lereletier показал, что наиболее близкими к предковой форме вида *A.mellifera* являлись представители эволюционной ветви С. Также было показано, что *Apis cerana* не является предковым видом по отношению к *A.mellifera*: они относятся друг к другу как сестринские виды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сохранение генофонда тёмной лесной медоносной пчелы *A.m.mellifera* является базовым моментом для развития пчеловодства и селекции пчел в России, что в свою очередь требует решения целого ряда задач в области фундаментальных и прикладных исследований. Наша работа касалась трёх из них. Нам удалось доказать существование на Урале нескольких генетических резерватов, которые должны стать основой для сохранения генофонда *A.m.mellifera*. Был расширен комплекс генетических маркёров и статистических подходов, используемых для этого. Нам удалось получить новые данные по внутривидовой структуре медоносной пчелы *A.mellifera*. Мы надеемся, что полученные результаты позволят приблизиться к решению проблемы сохранения генофонда *A.m.mellifera* как в России, так и в других странах Северной Европы.

ВЫВОДЫ

1. На основе полиморфизма межгенного локуса COI-COII митохондриальной ДНК показано существование как минимум четырёх сохранившихся локальных популяций *Apis mellifera mellifera* L. на Урале: вишерской, южно-прикамской, татышлинской и бурзянской.
2. Анализ частот встречаемости комбинации PQQ межгенного локуса COI-COII мтДНК показал, что уинская популяция, ранее принимаемая по морфометрическим признакам за популяцию *A.m.mellifera*, является гибридной. Генетическое расстояние между уральской *A.m.mellifera* и гибридной иглинской популяцией может быть принято в дальнейших исследованиях за один из критериев сохранности аборигенной популяции *A.m.mellifera*.

3. Исследование полиморфизма отдельных локусов ядерной и митохондриальной ДНК выявило тесное генетическое родство, небольшую долю инбридинга и дефицит гетерозигот в уральских популяциях *A.m.mellifera*.
4. Филогенетический анализ на основе сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена ND2 митохондриальной ДНК показал генетическое родство уральских и западноевропейских популяций *A.m.mellifera*.
5. Сравнительный анализ митотипов фрагмента гена ND2 митохондриальной ДНК свидетельствует, что подвид *A.m.mellifera*, вероятно, является единственным представителем внутривидовой эволюционной ветви М, в которую, таким образом, не следует включать не только африканские подвиды *Apis mellifera sahariensis* Baldensperger и *Apis mellifera intermissa* Маа, но и испанский подвид *Apis mellifera iberica* Goetze. Обнаружено, что предковой формой вида *Apis mellifera* L., могли быть пчелы эволюционной ветви С, а не О, как считалось ранее.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Ильясов Р.А., Николенко А.Г. Полиморфизм локуса COI-COII митохондриальной ДНК пчелы Пермской области // III Съезд Всероссийского Общества Генетиков и Селекционеров / Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития. Москва. - 2004. - Т.1 - С. 202.
2. Ильясов Р.А., Петухов А.В., Поскрязов А.В., Николенко А.Г. Поиск генетических резерватов *Apis mellifera mellifera* на Урале на основе полиморфизма митохондриальной ДНК // Тезисы докладов XII молодежной научной конференции "Актуальные проблемы биологии и экологии". – Сыктывкар. - 2005. - С. 97-98.

3. Ильясов Р.А. Полиморфизм локуса COI-COII мтДНК медоносной пчелы среднерусской расы *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // Материалы III конкурса научных работ молодых ученых и аспирантов УНЦ РАН и АН РБ. - Уфа. - 2005. - С. 74-76.
4. Plyasov R.A., Baymiev A.K., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Phylogenetics researches in *Apis mellifera mellifera* L. concluded from mitochondrial DNA sequence in Urals // GenBank. - 2005. - accession numbers DQ181611-DQ181622.
5. Plyasov R.A., Komissar A.D., Baymiev A.K., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Phylogenetics researches in *Apis mellifera macedonica* concluded from mitochondrial DNA sequence // GenBank. - 2006. - accession numbers DQ361088-DQ361090.
6. Ильясов Р.А., Петухов А.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г. На Урале сохранились четыре резервата пчелы среднерусской расы *Apis mellifera mellifera* L. // Пчеловодство. - 2006. - №2. - С. 19.
7. Ильясов Р.А., Поскряков А.В. Филогенетика подвидов *Apis mellifera* // Пчеловодство. – 2006. - №7. - С. 18-19.
8. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Митохондриальная ДНК в изучении популяций пчел на Урале // Материалы межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока. – Новосибирск. - 2006. С. 72-74.
9. Ильясов Р.А. Дифференциация популяций медоносной пчелы на Урале // Материалы IX Всероссийского популяционного семинара «Особь и популяция – стратегии жизни». - Уфа. - 2006 г. С. 176-181.