

Національна академія наук України
Українська академія аграрних наук
Академія медичних наук України
Українське товариство генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

Avtor e-mail: apismell@hotmail.com

ДОСЯГНЕННЯ І ПРОБЛЕМИ ГЕНЕТИКИ, СЕЛЕКЦІЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЇ

Збірник наукових праць

ТОМ 1

Присвячено:

120-літтю
від дня народження
академіка НАН України
М.І. Вавилова

40-літтю від часу заснування
Українського товариства генетиків і селекціонерів
ім. М.І. Вавилова

Il'iasov R.A., Poskriakov A.V., Nikolenko A.G. Lokal'nye populiacii medonosnoj pchely podvida Apis mellifera mellifera L. na Urale. Materialy mezhdunarodnoj konferencii "Dosiagnennia i problemi genetiki, selkciii ta biotehnologii". Kiev. 2007. T. 1. S. 231-235.

Київ
ЛОГОС
2007

Выводы

Инверсия в гене *yellow*, образовавшаяся между двумя *hobo* элементами и распространившаяся в популяции Умани, сама оказывается полиморфной из-за полиморфизма, обнаруженного в соседних с геном *yellow* областях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 05-04-48838 и Программой Президиума РАН "Биоразнообразие и динамика генофондов".

Литература

1. Голубовский М.Д., Захаров И.К., Соколова О.А. Анализ нестабильных аллелей гена *yellow*, выделенных из природной популяции дрозофил в период вспышки мутабельности // Генетика.— 1987.— Т. 23, № 9.— С. 1595–1603.
2. Захаров И.К., Иванников А.В., Скибицкий Е.Э. и др. Генетические свойства аллелей генов X-хромосомы, выделенных из природных популяций *Drosophila melanogaster* в период вспышки мутаций // Доклады Академии наук.— 1995.— Т. 341, № 1.— С. 126–129.
3. Грачева Е.М., Захаров И.К., Волошина М.А. и др. Вспышки мутаций гена *yellow* в природной популяции *Drosophila melanogaster* связаны с инсерцией транспозона *hobo* // Генетика.— 1998.— Т. 34, № 4.— С. 462–468.
4. Захаренко Л.П., Захаров И.К., Романова О.А. и др. "Мода на мутацию" в природной популяции *Drosophila melanogaster* Умани вызвана распространением индуцированной *hobo*-элементом нестабильной инверсии регуляторной части гена *yellow* // Генетика.— 2000.— Т. 36, № 6.— С. 740–748.
5. Захаренко Л.П., Захаров И.К., Волошина М.А. и др. Причина сохранения высокой нестабильности по гену *yellow* в линиях *Drosophila melanogaster*, выделенных в период "моды на мутацию" в популяции Умани // Генетика.— 2004.— Т. 40, № 3.— С. 316–321.

Резюме

Исследовали полиморфизм по гену *yellow* из популяции *Drosophila melanogaster* Умани. Показано, что *hobo* обусловленная инверсия регуляторной зоны гена *yellow*, распространившаяся в популяции, сама оказывается полиморфной из-за полиморфизма в прилежащих к гену *yellow* последовательностях ДНК.

We studied the polymorphism of *yellow* gene in the population of *Drosophila melanogaster* from Uman. We demonstrate that *hobo*-mediated inversion of *yellow* regulatory region prevalent in the population is polymorphic itself due to the polymorphism of *yellow*-neighbouring DNA sequences.

ИЛЬЯСОВ Р.А., ПОСКРЯКОВ А.В., НИКОЛЕНКО А.Г.

Институт биохимии и генетики

Уфимского научного центра Российской академии наук,
450054, республика Башкортостан, г.Уфа, Пр.Октября, 71.
e-mail: apismell@hotmail.com

ЛОКАЛЬНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ ПОДВИДА *APIS MELLIFERA MELLIFERA* L. НА УРАЛЕ

Медоносная пчела *Apis mellifera* L. по современной классификации подразделяется на 25 подвидов (Engel, 1999), которые населяли территорию всей Африки, Европы, Ближнего и Среднего Востока. Подвид *Apis mellifera mellifera* L. (темная европейская пчела, среднерусская пчела) занимал протяжённую территорию от Британских островов до Урала вдоль северной границы естественного видового ареала.

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 1980-х годах в Западной Европе невозможно было найти негибридизованные семьи

A.m.mellifera. В России *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 небольшие популяции *A.m.mellifera* (Петухов с соавт., 1996; Филатов, 2004). 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. Целью данной работы был дальнейший поиск популяций *A.m.mellifera* на Урале и анализ их генетической структуры.

Материалы и методы

В исследованиях на основе ПЦР-анализа полиморфизма фрагмента гена дефензина, двух микросателлитных локусов ar243 и 4a110 (ядерная ДНК), фрагмента гена второй субъединицы NADH-дегидрогеназы (ND2) и локуса, расположенного между генами цитохром оксидазы I и II (межгенный локус COI-COII) митохондриальной ДНК (мтДНК) 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 по ранее описанному методу (Chomezynski, Sacchi, 1987). Для секвенционного анализа фрагмента гена ND2 мтДНК использовали по три пчелы из четырех выделенных популяций *A.m.mellifera* на Урале, а также из представителей подвида *Apis mellifera macedonica* Ruttner из Украины, любезно предоставленных А.Д.Комиссаром со своей пасеки под Киевом. Был просеквенирован фрагмент гена ND2 мтДНК с 502 п.н. по 1134 п.н. относительно последовательности полной мтДНК *Apis mellifera ligustica* Spinola из генбанка NCBI (NC 001566)) у 15 пчел. Определение нуклеотидной последовательности проводили на автоматическом секвенаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Результаты и обсуждение

Поиск локальных популяций *A.m.mellifera* проводили методом ПЦР-анализа на предмет изучения структурного полиморфизма межгенного локуса COI-COII мтДНК. Ранее нами было показано (Никоноров с соавт., 1998), что подвиду *A.m.mellifera* соответствует комбинация элементов PQQ, а южным подвидам (*Apis mellifera ligustica* Spinola, *Apis mellifera caucasica* Gorbatshev и *Apis mellifera carnica* Pollmann) – только один элемент Q. Пчелы с пасек Уинского района Пермского края и Иглинского района Республики Башкортостан характеризовались частотой встречаемости комбинации PQQ 0,71 и 0,57, соответственно, что вызвано, несомненно, гибридизацией. Иглинская популяция также, в целом, оказалась гибридной, хотя пасеки Кугейко и Орловская характеризовались высокой частотой встречаемости комбинации PQQ 0,90 и 0,93, соответственно. Вместе с тем данные пасеки не могли 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 (свыше 0,98) характеризовались пасеки Вишерского района Пермского края — вишерская популяция *A.m.mellifera*, пасеки Нытвенского, Пермского, Ординского, Осинского и Частинского районов Пермского края — южно-при-

камская 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*. 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.

По результатам анализа частот аллелей фрагмента гена дефензина и микросателлитных локусов ar243 и 4a110 были рассчитаны генетические расстояния D по M.Nei (1978) между популяциями пчел на Урале, 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 гибридной иглинской популяцией и популяциями *A.m.mellifera* генетические расстояния имели большие значения и изменялись в пределах от 0,049 до 0,116, что несомненно является следствием гибридизации иглинской популяции. Значение коэффициента дифференциации Fst (Weir, Cockerham, 1984) между популяциями *A.m.mellifera* изменялось в пределах от 0,001 до 0,015, что очень близко к нулю и свидетельствует об отсутствии генетической дифференциации популяций, а между гибридной 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*. Значение коэффициента дифференциации для уральской популяции *A.m.mellifera* в целом Fst = 0,012 позволяет нам утверждать об отсутствии статистически значимой дифференциации популяций *A.m.mellifera* на Урале, что позволяет говорить о возможности того, что популяции *A.m.mellifera* на Урале произошли от единой предковой популяции *A.m.mellifera*. Средние значения коэффициента инбридинга субпопуляций Fis = 0,241 и коэффициента инбридинга для всей подразделенной популяции Fit = 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 Ho = 0,354 меньше значения средней ожидаемой гетерозиготности субпопуляций Hs = 0,471 и средней ожидаемой гетерозиготности всей подразделенной популяции Ht = 0,477, что является показателем дефицита гетерозигот в локальных популяциях *A.m.mellifera* на Урале. Значение вероятности P для точного теста Харди-Вайнберга, рассчитанное по методу Фишера (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.

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 международный генбанк NCBI (Ilyasov et al., 2005; Ilyasov et al., 2006). При сравнении по данной последовательности уральских пчел *A.m.mellifera*, украинских пчел *A.m.macedonica* с бурзянской бортовой пче-

лой (DQ181611) наблюдалось 12 нуклеотидных замен. В частности, между уральскими пчелами наблюдалось 5 сайтов замен нуклеотидов, где замена Т на С в позиции 536 двух уральских пчел DQ181614 и DQ181618 приводила к замене в аминокислотной последовательности в положении 12 аминокислоты изолейцин (Ile) на треонин (Thr). При сравнении бурзянской бортовой пчелы (DQ181611) с украинскими пчелами наблюдалось 8 сайтов нуклеотидных замен, где замена А на Т в позиции 987 являлась трансверсией. На дендрограмме, построенной по результатам сравнения нуклеотидных последовательностей фрагмента гена ND2 не наблюдалось дифференциации между представителями разных локальных популяций *A.m.mellifera* на Урале, что является показателем их тесного генетического родства. Украинские же пчелы отличались между собой всего одной нуклеотидной заменой Т на С в позиции 1099. В дальнейшем нами сравнивались последовательности *A.m.mellifera* уральских популяций со всеми доступными в генбанке NCBI последовательностями большинства подвидов *A.mellifera*. На полученной дендрограмме наблюдалась группировка образцов на четыре эволюционные ветви, сходная с подразделением подвидов *A.mellifera*, предложенного F.Ruttner et al. (1978). Однако по подвидовому составу групп наблюдались различия. Подвидовой состав четырех эволюционных ветвей предложенных M.C.Agiar, W.S.Sheppard (1996), P.Franck et al. (2000) с использованием этого же локуса оказался очень похожим на наш.

Представители уральских и европейских популяций *A.m.mellifera* кластеризовались в одну группу, названную 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 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.Agiar, W.S.Sheppard (1996). Однако, в отличие от группировки M.C.Agiar, 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 отделилась небольшая группа, куда вошли *Apis mellifera meda* Skorikov из Сирии, *Apis mellifera syriaca* Buttel-Reepen из Сирии и *Apis mellifera lamarckii* Cockerell из Египта, названная эволюционной ветвью О. Эта ветвь по составу подвидов также имела отличия от ветви О, предложенной F.Ruttner et al. (1988). В четвертую многочисленную группу, названную эволюционной ветвью 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). Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена ND2 мтДНК подвидов *A.mellifera* и двух видов пчел *Apis cerana* Fabricius и *Mellipona bicolor* Lapeletier 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.

Выводы

Нами было показано существование четырёх сохранившихся локальных популяций *Apis mellifera mellifera* L. на Урале: вишерской, южно-прикамской, татышлинской и бурзянской. Исследование полиморфизма отдельных локусов ядерной и митохондриальной ДНК выявило тесное генетическое родство, инбридинг и дефицит гетерозигот в уральских популяциях *A.m.mellifera*. Филогенетический анализ по локусу мтДНК показал генетическое родство уральских и западноевропейских популяций *A.m.mellifera*. Возможно, что подвид *A.m.mellifera* является единственным представителем внутривидовой эволюционной ветви М, а предковой формой подвидов *Apis mellifera* L. могут быть пчелы эволюционной ветви С.

Литература

1. Николенко А.Г., Поскряков А.В. Полиморфизм локуса COI-COII митохондриальной ДНК *Apis mellifera* L. на Южном Урале // Генетика.— 2002.— № 4 — С. 458–462.
2. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г., Вахитов В.А. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала // Генетика.— 1998.— Т. 34. № 11.— С. 1574–1577.
3. Петухов А.В., Шураков А.И., Еськов Е.К., Коробов Н.В., Симанков М.К. Морфологическая характеристика среднерусских пчел верхнекамской популяции // Пчеловодство.— 1996.— № 5.— С. 8–10.
4. Филатов В.С. История красноуфимской популяции среднерусской метизированной пчелы // Пчеловодство.— 2004.— № 2.— С. 54.
5. Arias M.C., Sheppard W.S. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence // Molecular phylogenetics and evolution.— 1996.— V. 5.— P. 557–566.
6. Chomezynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction // Anal. Biochem.— 1987.— V. 162.— P. 156–159.
7. Engel M.S. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; *Apis*) // J. Hym. Res.— 1999.— V. 8.— P. 165–196.
8. Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M. et al. Hybrid origins of the Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica* and *A.m.sicula* // Mol. Ecol.— 2000.— V. 9.— P. 907–923.
9. Guo S.W., Thompson E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles // Biometrics 1992.— V. 48.— P. 361–372.
10. Ilyasov 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.
11. Ilyasov 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.
12. Ruttner F. Biogeography and taxonomy of honey bees. Berlin: Springer-Verlag, 1988.— 288 p.
13. Ruttner F., Tassencourt L., Louveaux J. Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L // Apidology.— 1978.— V. 9.— № 4.— P. 363–381.
14. Weir B.S., Cockerham C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure // Evolution.— 1984.— V. 38.— P. 1358–1370.

Резюме

Нами на Урале были обнаружены четыре сохранившиеся локальные популяции *Apis mellifera mellifera* L., между которыми было выявлено тесное генетическое родство, инбридинг и дефицит гетерозигот. Филогенетический анализ пчел из этих популяций показал их тесное генетическое родство с западноевропейскими популяциями *A.m.mellifera*.

We had been found out in Ural four kept local populations *Apis mellifera mellifera* L. between which has been revealed close genetic relationship, inbreeding and deficit of heterozygots. The phylogenetics analysis of bees from these populations has shown their close genetic relationship with West-European populations *A.m.mellifera*.