

Avtor e-mail: apismell@hotmail.com

Печати
широко использовались
в средние века.
Первоначально
воск брали
естественного цвета,
неокрашенный.



Читайте статью В.Ефимова в номере

Il'iasov R.A., Poskriakov A.V., Nikolenko A.G. Metody identifikacii podvida
A.m.mellifera pchely medonosnoj. Pchelovodstvo. • 8. 2008. S. 8-9.

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОДВИДА

Естественный ареал *Apis mellifera* L. охватывает всю Африку, Европу и Ближний Восток. Отличительная черта вида — значительная внутривидовая дифференциация (Ruttner, 1988). На данный момент общепризнано существование 25 подвидов. На территории Европы известны девять, восемь из которых обитают в Южной и Центральной Европе, и только один подвид, *Apis mellifera mellifera* L. (темная европейская, темная лесная, она же среднерусская пчела), освоил лесостепную и лесную зоны Северной Европы, что делает его очень ценным для пчеловодства северных стран.

К сожалению, в результате непрерывного ввоза пчел с юга в более северные регионы произошла массовая гибридизация аборигенных пчел. В Германии массовый ввоз *A. m. carnica* в 40-х годах XIX в. привел почти к полной замене местных пчел *A. m. mellifera* (Maul, Hahnle, 1994). Аналогичное произошло и на большей части территории скандинавских стран и Британских островов, где сейчас разводят *A. m. ligustica* и *A. m. carnica* (Cooper 1986; Dews, Milner 1991; Jensen, 2005). Такая же ситуация сложилась и в России.

Одно из основных условий сохранения генофонда — его четкая идентификация (Daly, 1991), которая тем точнее, чем совершеннее инструмент (метод) ее проведения. Первоначально анализировали только морфометрические признаки. Так, Г.А.Кожевников (1900) сделал промеры длины хоботка пчелы и предложил методику измерения ее хитиновых частей. Современная морфометрическая классификация *A. mellifera* основывается на работах G.Goetze (1940), В.В.Алпатова (1948) и F.Ruttner et al. (1978). F.Ruttner (1988, 1992), используя мультивариантный анализ морфометрических признаков, разработал метод отличия *A. m. mellifera* от других европейских подвидов, однако не смог найти четких морфометрических различий между *A. m. iberica* и *A. m. mellifera*. Н.И.Кривцов (1998) в своей работе представил стандарты размеров частей тела для подвида *A. m. mellifera*, используя которые, можно довольно точно определить подвидовую принадлежность. Морфометрические стандарты получены и в нашей лаборатории для подвида *A. m. mellifera* башкирских пчел (Саттаров, Николенко, 2002). Однако выяснилось, что эти методы часто не позволяют точно идентифицировать подвиды из-за сильной зависимости морфометрических характеристик пчел от

условий окружающей среды и уровня внутривидовой гибридизации (Guzman-Novoa et al., 1994).

В настоящее время большинство исследователей стало переходить на использование молекулярных маркеров, дающих однозначно интерпретируемые результаты. В 60-х годах прошлого века исследования популяций проводили по данным анализа полиморфизма изоферментов (аллозимов) (Hunter, Market, 1957; Richardson et al., 1986, Behura, 2006). К сожалению, этот метод не получил широкого применения из-за низкого уровня полиморфизма у Hymenoptera (Badino et al., 1982; Sheppard, 1988), и в частности у медоносной пчелы (Sheppard, Berlocher, 1984; Sheppard, 1988). Так, гетерозиготность (H) аллозимов у пчел в среднем равна 0,01 (Pamilo et al., 1978), тогда как у большинства представителей других отрядов насекомых этот показатель в среднем составляет около 0,1 (Lewontin, 1974). Также известно, что из 23 проанализированных ферментных систем полиморфными оказались только две у пчел европейских популяций (Sheppard, Berlocher, 1984), а из 25 — только три у пчел башкирской популяции *A. m. mellifera* (Косарев с соавт., 2000).

Разработка полимеразной цепной реакции (PCR) в 80-х годах (Mullis et al., 1994) сделала возможным изучение полиморфизма ДНК и привела к революции в области молекулярной биологии. Основная идея PCR заключается в многократном увеличении (амплификации) определенного фрагмента ДНК с использованием праймеров, ограничивающих этот фрагмент, что позволяет проводить анализ, пользуясь минимальным числом биологического материала. В дальнейшем на основе PCR появилось множество молекулярных методов исследования.

Впервые в пчеловодстве ДНК-маркеры применили при изучении полиморфизма длин фрагментов рестрикции ДНК (RFLP) с использованием эндонуклеаз (рестриктаз). D.R.Smith, W.M.Brown (1988) показали отличие подвида *A. m. mellifera* от африканизированных пчел в США методом RFLP мтДНК эндонуклеазами BclI, EcoRI, NdeI, XbaI. Недостаток этого метода — необходимость большого количества ДНК. В дальнейшем в различении подвида *A. m. mellifera* стали использовать модифицированный вариант RFLP, основанный на рестрикции амплифицированных фрагментов ДНК. H.G.Hall, D.R.Smith (1991) на основе RFLP

ПЧЕЛЫ МЕДОНОСНОЙ (*A. m. mellifera* L.)

амплифицированных фрагментов генов COI и COII эндонуклеазами EcoRI, HincII, XbaI показали отличия подвида *A. m. mellifera* от других подвидов в Испании. На основе RFLP амплифицированного фрагмента межгенного локуса COI–COII мтДНК с использованием эндонуклеазы DraI установили отличия подвида *A. m. mellifera* от представителей подвидов других эволюционных ветвей на территории Франции (Franck et al., 1998), Италии (Franck et al., 2000), Норвегии, Швеции, Дании, Шотландии, Англии, Ирландии (Jensen et al., 2005).

Параллельно с методом RFLP ДНК развивался и метод изучения полиморфизма длин амплифицированных фрагментов со случайно выбранными праймерами (RAPD). В методе RAPD используют обычно один праймер, который может амплифицировать фрагменты ДНК из любых локусов генома, то есть этот метод не является сайт-специфичным. Метод RAPD нашел применение в исследованиях генома медоносной пчелы (Чудинов, 1999), проведении генетической паспортизации нескольких подвидов пчел, а также в идентификации подвидов *A. m. mellifera* и *A. m. caucasica* на основе праймеров OPA-01 и OPA-04.

Еще один метод идентификации — аллель-специфичная PCR с использованием пары праймеров, ограничивающих амплифицируемый фрагмент. В Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН сотрудники разработали метод быстрой PCR-идентификации подвида *A. m. mellifera* в Республике Башкортостан на основе полиморфизма межгенного локуса COI–COII мтДНК. В дальнейшем наша лаборатория проводила поиск популяций подвида *A. m. mellifera* на территории Республики Башкортостан и Пермского края (Южный и Средний Урал) на основе полиморфизма межгенного локуса COI–COII мтДНК (Саттаров, Николенко, 2000; Николенко, Поскрjakов, 2002). В результате выделили четыре популяции *A. m. mellifera* (Ильясов, 2005; Ильясов с соавт., 2006).

Методика различения подвидов пчел на основе полиморфизма микросателлитных локусов SSR также основана на аллель-специфичной PCR. Микросателлитные локусы располагаются по всему геному и содержат до 100 tandemных повторов размером 2–10 п. н. Многие тесно связаны с консервативными локусами (Loxdale, Lushai, 1998). В последнее время полиморфизм микросателлитных локусов широко используют во всем мире для различения подвидов пчел. Разработано несколько методов: A.Estoup et al. (1995) на основе полиморфизма 7 микросателлитных локусов (B124, A7, A24, A113, A28, A88, A43) и P.Franck

et al. (1998, 2000) на основе полиморфизма 8 микросателлитных локусов — в Европе; P.De La Rua et al. (2002) на основе полиморфизма 8 микросателлитных локусов — в Северо-Восточной Италии; A.Jensen et al. (2005) на основе полиморфизма 11 — в Норвегии, Швеции, Дании, Шотландии, Англии, Ирландии, а также в нашей лаборатории Р.А.Ильясовым (2006) на основе полиморфизма 2 микросателлитных локусов (Ap243, 4a110) на Южном и Среднем Урале на территории Республики Башкортостан и Пермского края.

Секвенирование ДНК, то есть определение ее полной нуклеотидной последовательности, также часто используемый метод идентификации подвидов пчел. J.-M.Cornuet et al. (1991) просеквенировали межгенный локус COI–COII мтДНК пчел и показали отличия *A. m. mellifera* от других подвидов. После изобретения автоматического секвенатора стало доступным исследование большого числа образцов за сравнительно короткое время. M.C.Arias, W.S.Shepherd (1996) на основе секвенирования фрагмента гена ND2 мтДНК показали отличия *A. m. mellifera* от других подвидов пчел в Европе. В нашей лаборатории Р.А.Ильясов с соавторами (2006) на основе этого метода показали отличия *A. m. mellifera* от южных подвидов пчел на Урале. Совсем недавно сотрудники консорциума по секвенированию генома пчелы просеквенировали весь геном медоносной пчелы и выделили различия между *A. m. mellifera* и другими подвидами (Weinstock et al., 2006). Им удалось показать, что подвид *A. m. iberica* очень сходен с *A. m. mellifera* и группируется с ним. Такое положение может быть результатом гибридизации предковых форм иберийских пчел, о чем пишут многие исследователи (De La Rua et al., 2002).

Таким образом, существует ряд методов идентификации подвида *A. m. mellifera* (темной европейской, или темной лесной, или среднерусской пчелы). Как можно заметить, наиболее перспективный на сегодняшний день — метод секвенирования генома, а также методы, основанные на PCR. Наша лаборатория разработала комплекс методов для идентификации генофонда среднерусской пчелы и активно ведет работы по поиску сохранившихся популяций *A. m. mellifera* на территории всей России и их детальной генетической характеристике.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-04-08183-офи И 08-04-97039-р-поволжье-а.

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

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, 450054, г. Уфа, пр. Октября, д. 71