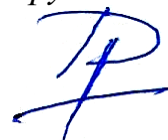


На правах рукописи



ИЛЬЯСОВ РУСТЕМ АБУЗАРОВИЧ

**ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ И
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ ТЕМНОЙ ЛЕСНОЙ ПЧЕЛЫ
APIS MELLIFERA MELLIFERA L. УРАЛА И ПОВОЛЖЬЯ**

03.02.07 - генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Уфа - 2016

**Работа выполнена в лаборатории биохимии адаптивности насекомых
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии и генетики Уфимского научного центра
Российской академии наук**

Научный консультант: Доктор биологических наук, профессор
Николенко Алексей Геннадьевич

Официальные оппоненты:

Долматова Ирина Юрьевна, Федеральное государственное
доктор биологических наук, бюджетное образовательное учреждение
профессор. высшего образования «Башкирский
государственный аграрный
университет», проф. кафедры частной
зоотехнии и разведения животных

Нефедова Лидия Николаевна, Федеральное государственное
доктор биологических наук, бюджетное образовательное учреждение
профессор. высшего образования «Московский
государственный университет имени
М.В.Ломоносова», проф. кафедры
генетики

Политов Дмитрий Владиславович, Федеральное государственное
доктор биологических наук, бюджетное Учреждение науки Институт
профессор. общей генетики им Н.И. Вавилова РАН,
зав. лаб. популяционной генетики

Ведущая организация: Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
"Всероссийский научно-
исследовательский институт
животноводства имени академика
Л.К. Эрнста"

Защита диссертации состоится « 09 » ноября 2016 г. в «10.00» часов на заседании Диссертационного совета Д 002.133.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г. Уфа, пр. Октября, 71. ИБГ УНЦ РАН

С диссертацией можно ознакомиться на сайте ИБГ УНЦ РАН (<http://ibg.anrb.ru>) и в Научной библиотеке Уфимского научного центра РАН (Уфа, просп. Октября, д. 71). E-mail: molgen@anrb.ru
Автореферат разослан « » 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.б.н.



Г.Ф. Корытина

Введение

Актуальность и степень разработанности темы. Семейство пчел *Apidae* подотряда Стебельчатобрюхие Аросcrita отряда Перепончатокрылые Hymenoptera Linnaeus, 1758 включает около 30 триб, 170 родов и 5000 видов (Michener, 1990; 2000). Самыми известными представителями семейства *Apidae* являются такие виды, как медоносная пчела *Apis mellifera*, восковая пчела *Apis cerana* и земляной шмель *Bombus terrestris* (Радченко, Песенко, 1994; Michener, 2007).

Медоносные пчелы - самые активные опылители на планете. Результаты этой деятельности намного превосходят медовую продуктивность. В Европейских странах пчел разводят преимущественно для опыления сельскохозяйственных культур, а продукцию пчеловодства получают в нагрузку (Важов, Панков, 2009; Gallai et al., 2009). Так, в Великобритании некоторые экологи даже хотели бы избавиться от пчел, которые, по их мнению, оккупировали их острова и могут вытеснить аборигенных опылителей - шмелей. То есть британцы не рассматривают пчел как источник меда, а только как опылителей культур.

Пчелы играют важную роль в сохранении природных экосистем, поскольку опыляют 85% цветковых растений - около 300 тыс. видов во всем мире. От их деятельности зависит биоразнообразие природных экосистем (Кривцов, 2008; Neumann, Carreck, 2010). Особо сильно от опыления пчелами зависят природные экосистемы северных регионов Евразии, где естественное таксономическое разнообразие насекомых-опылителей в природе резко ограничено низкими температурами (Schafer et al., 2009; van Engelsdorp, 2009; Genersch, 2010). Большая часть России располагается в северных регионах Евразии с преобладанием зон рискованного пчеловодства. Сохранение численности семей пчел в северных регионах Евразии и в России необходимо для поддержания уровня биоразнообразия экосистем (Лебедев и др., 2015).

Как известно, из всех 30 подвидов пчел только *A. m. mellifera*, именуемый темной лесной пчелой, эволюционировал в Северной Европе и потому пригоден к разведению в данных регионах Евразии. Потеря чистопородности генофонда этого единственного северного подвида в связи с таким низким таксономическим разнообразием в северных регионах может стать критическим как для людей, так и всей экосистемы в целом (Радченко, Песенко, 1994).

В России прослеживается тенденция снижения численности семей пчел. С 1965 г. общая численность пчел в стране сократилась вдвое и в 2015 г. составляла 3.5 млн. семей, сосредоточенных, преимущественно, в частных хозяйствах 77 регионов. Разброс количества семей пчел в регионах очень высок: в Мурманской области - 18 семей, а в Республике Башкортостан - 365 тыс. (Кривцов, 2011; Лебедев и др., 2015).

В России закрепилась другая тенденция хозяйствования - пчел в основном разводят для получения продуктов, а опылительную деятельность не учитывают и не оценивают. Потому численность семей пчел здесь в постоянной зависимости от рыночной стоимости продуктов отрасли. Так,

снижение цен на 30% на продукцию пчеловодства в 2012-2013 гг. обернулась не только снижением рентабельности пасек, но в ряде случаев они стали убыточными (Кривцов, 2011; Лебедев и др., 2013).

Имеется и другая тенденция повышения продуктивности семей пчел за счет улучшения качества их содержания. Так, с 1995 г. по 2015 г. средняя продуктивность одной семьи пчел в России возросла вдвое. В настоящее время медовая продуктивность в стране составляет около 5 млн. т. Следовательно, рост продуктивности пчеловодства в России еще не является показателем увеличения числа семей пчел (Лебедев и др., 2014).

Первая причина сокращения численности семей пчел в России - снижение рентабельности отрасли в результате социально-экономического положения страны; вторая - повышенный уровень смертности под влиянием болезней и загрязнения окружающей среды; третья - потеря чистопородности аборигенного генофонда вследствие гибридизации с интродуцированными “южными” подвидами (Ильясов и др., 2015а; Лебедев и др., 2015).

В результате массовых экспериментов по повышению продуктивности семей пчел и создания искусственных высокопродуктивных гибридных пчел в Европейских странах и России, за минувший век произошло резкое сокращение местного чистопородного генофонда *A. m. mellifera* (Ильясов и др., 2007б). Как выяснилось, пчела никогда не являлась полностью одомашненным видом, потому контролировать ее генофонд человеком было практически невозможно (Jensen et al., 2005). “Южные” гены интродуцированных подвидов пчел быстро и беспрепятственно получали широкое распространение и закрепление в популяциях местных пчел (Maul, Nähnle, 1994).

Аборигенный чистопородный генофонд темной лесной пчелы имеет шансы на сохранение в редких изолированных регионах, таких как острова, горные ущелья и местности без развитой транспортной инфраструктуры. Такие территории были обнаружены в Европе (острова Британии, Франции, Голландии, Дании, Норвегии) и в России (Алтай, Урал и Поволжье) (Ivanova et al., 2007; Ильясов и др., 2007а).

Первоначальные исследования полиморфизма морфологических параметров, аллозимных локусов и локусов мтДНК не позволили получить однозначных выводов о структуре и ареале генофонда сохранившихся изолятов темной лесной пчелы. Оказалось, что в условиях интенсивной гибридизации морфологический полиморфизм не позволяет дифференцировать подвиды пчел. Аллозимный полиморфизм в популяциях пчел показал очень низкую вариабельность, а также оказался непригодным для дифференциации подвидов. Кроме того, аллозимные локусы и морфологические параметры не являлись селективно нейтральными маркерами, были подвержены действию естественного отбора и клинальной изменчивости. Митохондриальные же локусы оказались более информативными, но показывали только материнскую наследственность, не позволяя получить достоверные данные о структуре генофонда (Ильясов и др., 2007б; Muñoz et al., 2009).

Корректную оценку структуры генофонда и ареала сохранившихся изолятов темной лесной пчелы позволяют провести микросателлитные локусы

яДНК в случае использования в анализе достаточного числа локусов. Анализ популяций пчел на основе полиморфизма ядерных и митохондриальных локусов способствует получению более полных данных о структуре генофонда и филогенетическом положении, поскольку охватывает как материнский, так и отцовский типы наследственности (Ильясов, 2006; Зиновьева и др., 2011).

Таким образом, пчелы играют исключительную роль в поддержании биологического и таксономического разнообразия природных и антропогенных экосистем в результате опылительной деятельности, а также в обеспечении человека пищей и биологически активными и лекарственными веществами (Pinto et al., 2012).

Экосистемы северных регионов России, а также Урала и Поволжья особенно сильно зависят от опылительной деятельности пчел. Пчела подвида *A. m. mellifera* является аборигенной для этого региона, максимально приспособленной к местным условиям и экономически выгодной для разведения в этих условиях.

Угроза потери генофонда *A. m. mellifera*, в первую очередь, обусловлена гибридизацией с подвидами из южных регионов России в результате их массовой интродукции. Сохранение генофонда местных пчел становится возможным только при наличии методов, дифференцирующих подвиды (Oleksa et al., 2011; Nedić et al., 2014). Отсюда идентификация сохранившихся популяций и селекция семей темной лесной пчелы в условиях массовой гибридизации становятся актуальными (Форнара, 2012; Ильясов и др., 2015б).

Большой интерес для пчеловодства представляет ареал подвида *A. m. mellifera* на территории Урала и Поволжья, который частично изучен морфометрическими и практически не изучен молекулярно-генетическими методами. Морфометрические методы исследования предполагают возможность сохранения популяций темной лесной пчелы в этом регионе. Для точной оценки современного состояния темной лесной пчелы Урала и Поволжья необходимо провести молекулярно-генетические исследования с использованием маркеров ядерной и митохондриальной ДНК. Исходя из этого, нами была поставлена следующая цель исследования.

Цель исследования - комплексный анализ генетической структуры популяции и филогенетического положения темной лесной пчелы Урала и Поволжья с использованием маркеров ядерной и митохондриальной ДНК.

Задачи исследования:

1. Провести анализ генетической дифференциации представителей пчел эволюционной ветви М на основе полиморфизма нуклеотидной последовательности локуса *COI-COII* мтДНК.

2. Определить информативность генов ядерной и митохондриальной ДНК медоносной пчелы *A. mellifera* для оценки возможности их использования в филогенетических реконструкциях на основе сравнения генов пчел 4 эволюционных ветвей А, М, С, О.

3. Провести поиск информативных SNPs ядерного и митохондриального геномов медоносной пчелы *A. mellifera*, позволяющих дифференцировать темную лесную пчелу *A. m. mellifera* от пчел “южных” подвидов *A. m. carpatica*

и *A. m. caucasica*.

4. Установить генетическое родство темной лесной пчелы *A. m. mellifera* уральской и европейской популяций на основе сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена *VG* яДНК, гена *ND2* мтДНК и локуса *COI-COII* мтДНК.

5. Провести поиск сохранившихся популяций темной лесной пчелы *A. m. mellifera* на Урале и в Поволжье и локализовать их ареал на основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов и локуса *COI-COII* мтДНК.

6. Рассчитать генетические стандарты для семьи и популяции темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья на основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов.

7. Определить уровень интрогрессии “южных” генов по ядерному и митохондриальному геномам в популяции темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья на основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов яДНК и локуса *COI-COII* мтДНК.

8. Разработать методику селекции семей темной лесной пчелы *A. m. mellifera* по генетическим показателям, рассчитанным на основе полиморфизма 9 микросателлитных локусов яДНК.

Научная новизна. На основе сравнительного анализа нуклеотидной последовательности локуса *COI-COII* мтДНК впервые предлагается дифференциация митотипов темной лесной пчелы *A. m. mellifera* эволюционной ветви М. Путем сравнительного анализа нуклеотидной последовательности 7 генов (*ND2*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*, *COI*, *COIII*) мтДНК и гена *VG* яДНК показана возможность дифференциации подвидов пчел. Впервые выявлены SNPs в генах *ND2* мтДНК и *VG* яДНК, позволяющие дифференцировать темную лесную пчелу *A. m. mellifera* от пчел “южных” подвидов *A. m. carpatica* и *A. m. caucasica*. Подтверждено тесное генетическое родство уральской и европейских популяций темной лесной пчелы *A. m. mellifera*, объединяющихся в одну группу эволюционной ветви М. На территории Урала и Поволжья обнаружено пять сохранившихся популяций темной лесной пчелы *A. m. mellifera*: бурзянская, татышлинская, южно-прикамская, вишерская и камбарская. Определен ареал популяции темной лесной пчелы Урала и Поволжья, куда входят север Республики Башкортостан, юг Республики Удмуртия и вся территория Пермского края. Для семьи и популяции темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья впервые были получены генетические стандарты. В популяции темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья определен уровень интрогрессии “южных” генов по ядерному и митохондриальному геномам, а также предложена методика селекции семей темной лесной пчелы путем анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов яДНК.

Научно-практическая значимость. Результаты сравнительного анализа нуклеотидной последовательности локуса *COI-COII* мтДНК способствуют упрощению и исправлению существующей классификации митотипов темной лесной пчелы *A. m. mellifera* эволюционной ветви М. Выявленная высокая

информативность семи генов (*ND2*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*, *COI*, *COIII*) мтДНК и гена *VG* яДНК позволит быстро и достоверно дифференцировать подвиды пчел *Apis mellifera* и провести филогенетический анализ. На основе обнаруженных информативных SNPs в гене *ND2* мтДНК и *VG* яДНК появляется возможность разработать мультиплексную тест-систему для дифференциации темной лесной пчелы *A. m. mellifera* от пчел “южных” подвидов *A. m. carpatica* и *A. m. caucasica*.

Данные о тесном генетическом родстве уральской и европейской популяций темной лесной пчелы *A. m. mellifera* позволят целенаправленно подойти к решению проблемы сохранения генетического разнообразия местных пчел за счет обогащения генофонда генетическим материалом из других популяций. Выявление сохранившихся популяций темной лесной пчелы *A. m. mellifera* и определение их ареала дают возможность разработать мероприятия по сохранению их генофонда в пределах аборигенного распространения.

На уровне семьи и популяции генетические стандарты темной лесной пчелы Урала помогут селектировать семьи пчел в пределах данных генетических показателей и будут способствовать стабилизации генетической структуры популяции. Методика выявления интрогрессии “южных” генов по ядерному и митохондриальному геномам в семье и популяции темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья позволит провести мониторинг состояния генофонда и селекцию по разработанной методике, направленную на сохранение аборигенного генофонда.

Результаты исследования могут быть использованы в популяционно-генетических, геногеографических, филогенетических, филогеографических исследованиях, а также в селекции семей пчел и разработке рекомендаций для пчеловодства, направленных на повышение их продуктивности и адаптированности.

Методы и разработки данных исследований успешно применены в природоохранной деятельности для поддержания биологического разнообразия экосистем. Разработанный метод анализа уровня интрогрессии “южных” генов в популяции темной лесной пчелы *A. m. mellifera* был успешно применен в заповеднике “Шульган-Таш” при мониторинге семей пчел на чистопородность местного генофонда. Данная работа может служить началом проекта по сохранению генетического разнообразия генофонда подвида *A. m. mellifera* в масштабе всей Евразии (Ильясов и др., 2016в).

На базе генетических исследований с использованием микросателлитных локусов яДНК и локуса *COI-COII* мтДНК проведен мониторинг популяций темной лесной пчелы Пермского края и основана племенная пасека “Парасоль” (Симанков и др., 2012), Республики Удмуртия - основана племенная пасека “Камбарская” (Ильясов и др., 2007в), Кировской области - племенная пасека “РАСАМ” (Брандорф и др., 2012), Республики Башкортостан - племенная пасека “Куликовская дача” (Николенко и др., 2013). Была определена таксономическая принадлежность и уровень интрогрессии “южных” генов семей пчел *A. m. mellifera* на племенной пасеке “Azmoos” в Швейцарии

(Ильясов и др., 2015б; 2016а).

Методология и методы исследования. Экстракцию ДНК из мышц торакса рабочих особей пчел, фиксированных в 96% этаноле, проводили набором ДНК-ЭКСТРАН-2 по протоколу СИНТОЛ (Москва) (www.syntol.ru). Качество и количество выделенной тотальной ДНК (около 500 нг) анализировали на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo, США).

Полимеразная цепная реакция выполнялась в термоциклере BIO-RAD T100 (США) в 15 мкл общего объема смеси по протоколу СИЛЕКС (Москва) (www.sileks.com/ru) с 10 нг тотальной ДНК при оптимальной температуре отжига для каждого набора праймеров. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени ПЦР-РВ проводилась с красителем SYBR Green в термоциклере Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) с набором по протоколу СИНТОЛ (Москва) (www.syntol.ru).

В исследованиях проводился анализ полиморфизма локуса *COI-COII* мтДНК, гена *ND2* мтДНК, гена вителлогенина *VG* яДНК, гена дефенсина 1 *DEF1* яДНК, гена абецина *ABAE* яДНК, гена *MGST1* яДНК, микросателлитных локусов *AP243*, *4A110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *AP049*, *A28* яДНК.

Продукты амплификации при силе тока 40мА разделяли по размерам в 8% ПААГ, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в геле-документирующей системе DocPrint Vilber Lourmat (Франция).

Фрагментарный анализ и определение нуклеотидной последовательности продуктов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе Applied Biosystem sequencer (США) по протоколу СИНТОЛ (Москва).

Анализ нуклеотидных последовательностей и их выравнивание проводилось в программе MEGA 6.0 (Kumar et al., 2004) и DNASTAR 5.05 с использованием метода Clustal W 1.6 при пороге открытия разрывов 15, пороге размера разрывов 5, значимости транзиций 0.5 и задержке разрывов расхождения 30.

Дендрограммы на основе транзиций и трансверсий выровненных нуклеотидных последовательностей строились в программах MEGA 6.0 и DNASTAR 5.05 методом ближайшего соседа с применением бутстреп анализа.

Дендрограммы на основе частот аллелей микросателлитных локусов строились с применением кластерного анализа в компьютерных программах STATISTICA 8.0 и STATGRAFICS Plus 3.0 по полученным генетическим дистанциям М. Nei (1978) и попарным значениям F_{st} , которые рассчитывались в программах FSTAT 2.9.3.2 (JBrYme Goudet) и POPULATIONS 1.2.28 (CNRS UPR9034).

Значения уровня интрогрессии “южных” генов эволюционной ветви С (*A. m. caucasica*) в семьях пчел эволюционной ветви М (*A. m. mellifera*) по ядерному геному, необходимые для построения гистограммы (plot), были рассчитаны на основе полиморфизма микросателлитных локусов с использованием программы STRUCTURE 2.3.4 с применением Байесовского анализа (Bayesian analysis) и метода кластеризации Монте-Карло с цепями Маркова (Monte Carlo Markov Chain) (MCMC) при заданном числе кластеров $K=2$ с использованием модели смешивания (Admixture model) и параметров

MCMC (iteration) 5000 (Pritchard, 2000).

Уровень интрогрессии “южных” генов по митохондриальному геному рассчитывался на основе наблюдаемых частот фрагментов межгенного локуса *COI-COII* мтДНК PQQQ, PQQ (*A. m. mellifera*, эволюционная ветвь М) и Q (*A. m. carpatica* и *A. m. caucasica*, эволюционная ветвь С) (Garnery et al., 1993).

Статистический анализ полученных результатов полиморфизма ДНК проводился с использованием программ CHROMAS 1.45, MEGA 6.0, DNASTAR 5.05, FSTAT 2.9.3.2, GENEPOP 4.2.2, POPULATIONS 1.2.28, STRUCTURE 2.3.4, STATISTICA 8.0, STATGRAFICS Plus 3.0, MICROSOFT EXCEL 2010.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Анализ локусов ядерной и митохондриальной ДНК (9 микросателлитных локусов яДНК, локус *COI-COII* мтДНК) показал, что на Урале и в Поволжье сохранился крупнейший в мире резерват темной лесной пчелы *A. m. mellifera*, подразделенный на 5 популяций – бурзянскую, татышлинскую, южно-прикамскую, вишерскую и камбарскую.

2. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности локусов ядерной и митохондриальной ДНК (*VG* яДНК, *ND2* мтДНК, *COI-COII* мтДНК) подтвердил тесное генетическое родство европейских и российских популяций темной лесной пчелы.

3. На основе анализа полиморфизма локусов ядерной и митохондриальной ДНК (9 микросателлитных локусов яДНК, локус *COI-COII* мтДНК) определен уровень интрогрессии “южных” генов в популяциях темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья.

4. Анализ полиморфизма 9 микросателлитных локусов ядерной ДНК позволил получить генетические стандарты для популяций и семей темной лесной пчелы Урала и Поволжья и разработать стратегию их селекции.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 71 научной конференции, из которых 13 за последние 5 лет: Международная научная конференция по пчеловодству “XLVIII Naukowa konferencja pszczelarska” (Pszczyna, Poland, 2011); Международная научно-практическая конференция “Современные проблемы биологии и экологии” (Махачкала, Дагестан, 2011); Всероссийская научно-практическая конференция “Мир пчел” (Ижевск, 2011); Международная научно-практическая конференция SICAMM (Landquart, Switzerland, 2012); III Международный форум пчеловодов “Медовый мир” (Ярославль, 2012); Всероссийская научная конференция “Актуальные проблемы генетики и молекулярной биологии” (Уфа, 2012); Всероссийская научная конференция “Современные проблемы биохимии и биотехнологии” (Уфа, 2013); Международная научно-практическая конференция “SICAMM 13th biennial and BIBBA 50th anniversary” (Llangollen, North Wales, United Kingdom, 2014); Международная 6 европейская конференция по пчеловодству “EURBEE 6” (Murcia, Spain, 2014); I Международная научно-практическая конференция, посвященная 145-летию М.А.Дернова “Проблемы и перспективы сохранения генофонда медоносных пчел в современных условиях” (Киров, 2014);

Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием “Актуальные направления инновационного развития животноводства и ветеринарной медицины” (Уфа, 2014); II Международная научно-практическая конференция “Биотехнологические аспекты развития современного пчеловодства” (Киров, 2015); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием “Инновационные технологии в пчеловодстве и проблемы сохранения генофонда медоносных пчел” (Уфа, 2015); Международная научно-практическая конференция “Современные проблемы пчеловодства и пути их решения” (Москва, 2016).

Конкурсная поддержка работы. Исследования были поддержаны грантом РФФИ 07-04-08274-з 2007 года “Участие в международном конгрессе International Congress of Insect Biotechnology, Industry (ICIBI)” (руководитель), грантами правительства Республики Башкортостан молодым ученым и молодежным коллективам 2008 года “Популяции медоносных пчел на Урале” (руководитель) и 2011 года “Молекулярно-генетическая структура северной популяции башкирской медоносной пчелы *A. m. mellifera*” (руководитель), грантом РФФИ 16-14-00001 Д. 2016 года “Издание научного труда “Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. Республики Башкортостан” ” (руководитель).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 137 работ. Основные научные результаты диссертации отражены в 76 статьях рецензируемых научных журналов, в том числе 44 из списка ВАК РФ. В международную базу данных Генбанка депонировано 179 нуклеотидных последовательностей:

43 последовательности гена *ND2* мтДНК *Apis mellifera*: DQ181611-DQ181622 (2005), DQ361088-DQ361090 (2006), HQ318729-HQ318730 (2010), KM242606-KM242631 (2014).

92 последовательности гена *VG* яДНК *Apis mellifera*: KJ532124-KJ532147, KJ572285-KJ572320, KJ645883-KJ645894 (2014), KU146538-KU146557 (2016).

23 последовательности локуса *COI-COI* мтДНК *Apis mellifera*: EF676102-EF676104 (2007), KF970918-KF970925, KM242632-KM242643 (2014).

3 последовательности интрона гена *EF1-alpha* яДНК *Apis mellifera*: KM242603-KM242605 (2014).

4 последовательности гена *5.8S pPHK* яДНК *Ascosphaera apis*: KM242589-KM242592 (2014).

10 последовательностей гена *COI* мтДНК *Apis cerana*: KM242593-KM242602 (2014).

4 последовательности гена *16S pPHK* яДНК *Nosema apis*: KM242585-KM242588 (2014).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов и обсуждений, заключения и выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 326 страницах с 28 таблицами и 37 рисунками. Список литературы содержит 415 источников, в том числе 295 зарубежных.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному консультанту д.б.н. проф. Николенко А. Г., всем сотрудникам института и лаборатории биохимии адаптивности насекомых ИБГ УНЦ РАН.

Материалы и методы

В популяционно-генетическом исследовании была использована выборка рабочих особей пчел из 3123 семей с 493 пасек 49 районов Урала и Поволжья, и 3 районов Северного Кавказа и Восточных Карпат, взятых в качестве внешней группы популяций “южных” пчел (*A. m. caucasica* и *A. m. carpatica*) (табл. 1).

Отобранных рабочих особей пчел фиксировали в 96% этаноле и до выделения ДНК хранили при температуре -20°C. Выделение ДНК из мышц торакса рабочих особей пчел проводили набором ДНК-ЭКСТРАН-2 по протоколу СИНТОЛ (Москва) (www.syntol.ru).

Таблица 1 - Выборка семей пчел, использованная в популяционно-генетических исследованиях на основе полиморфизма 9 микросателлитных локусов яДНК и локуса *COI-COI* мтДНК

№	Регион		Район	Семей	Пасек		
1	Урал	Республика Башкортостан (РБ)	Абзелиловский	90	2309	11	398
2			Альшеевский	35		6	
3			Баймакский	70		13	
4			Балтачевский	36		7	
5			Белебеевский	16		2	
6			Белорецкий	114		29	
7			Бирский	91		18	
8			Бурзянский	326		90	
9			Гафурийский	62		9	
10			Зилаирский	141		33	
11			Иглинский	197		12	
12			Ишимбайский	226		42	
13			Караидельский	132		19	
14			Кушнаренковский	37		8	
15			Куюргазинский	61		7	
16			Мелеузовский	73		14	
17			Мишкинский	55		12	
18			Татышлинский	200		17	
19			Уфимский	30		4	
20			Учалинский	10		2	
21			Хайбуллинский	130		19	
22			Чекмагушевский	62		12	
23			Чишминский	15		2	
24			Янаульский	100		10	
25		Пермский край (ПК)	Добрянский	20	362	2	41
26			Красновишерский	41		9	
27			Нытвенский	18		2	
28			Ординский	25		3	
29			Осинский	38		2	
30			Пермский	76		4	
31			Уинский	59		7	
32			Усольский	20		2	
33			Частинский	28		2	
34			Юсьвенский	37		8	
35		Свердловская область (СО)		Красноуфимский	58	58	8
36	Поволжье	Республика Удмуртия (РУ)	Завьяловский	39	200	3	17
37			Камбарский	46		2	
38			Мало-Пургинский	26		5	
39			Можгинский	22		2	

40		Республика Татарстан (РТ)	Шарканский	34	52	2	8
41			Якшур-Бодьинский	33		3	
42			Кукморский	24		4	
43			Мамадышский	16		2	
44			Нижнекамский	12		2	
45		Кировская область (КО)	Кирово-Чепецкий	20	64	2	8
46			Даровской	20		2	
47			Орловский	14		2	
48			Кильмезский	10		2	
49		Республика Чувашия (РЧ)	Чебоксарский	14	14	2	2
50	Кавказ и Карпаты	Краснодарский край (КК)	Сочинский	32	64	3	11
51		Республика Адыгея (РА)	Майкопский	15		2	
52		Закарпатская область (ЗО)	Мукачевский	17		6	
		Всего			3123		493

Оценку генетического потенциала семей темной лесной пчелы выполнили на выборке из 25 семей с 10 пасек в Бурзянском районе, где из каждой семьи анализировались по 4 рабочие особи. В анализе генетического потенциала семей пчел изучили 100 рабочих особей (рис. 1).

Нуклеотидную последовательность межгенного локуса *COI-COII* мтДНК определяли у пчел подвида *A. m. mellifera* из 20 семей с 18 пасек, расположенных в 6 районах Республики Башкортостан и Пермского края (Южный и Средний Урал).

Сравнительный анализ полученных нами нуклеотидных последовательностей межгенного локуса *COI-COII* мтДНК выполнили с выборкой из 88 образцов *A. m. mellifera* и 2 образцов *A. m. iberiensis* из Генбанка, где в качестве референсной использовали последовательность *A. m. mellifera* митотипа М4а' (KF274638).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей 12 генов мтДНК (*ND2*, *COII*, *COI*, *ATP8*, *ATP6*, *COIII*, *ND3*, *ND5*, *ND4*, *ND4L*, *ND6*, *ND1*) выполнили на выборке пчел эволюционных ветвей А, М, С, О из Генбанка с известной нуклеотидной последовательностью митохондриального генома.

Нуклеотидную последовательность гена *ND2* мтДНК определили у 18 пчел подвида *A. m. mellifera* Республики Башкортостан, Пермского края, Швейцарии, у 3 пчел подвида *A. m. macedonica* из Украины, у 9 пчел подвида *A. m. caucasica* из Краснодарского края, у 7 пчел подвида *A. m. carpatica* из Республики Адыгея, у 2 пчел подвида *A. m. carnica* из Литвы.



Рисунок 1. Географическая локализация выборки пчел на территории Бурзянского района РБ, использованной для изучения генетического потенциала семей темной лесной пчелы.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *ND2* мтДНК выполнили с выборкой из 78 образцов пчел 17 подвидов из Генбанка, где в качестве референсной использовали последовательность *A. m. ligustica* (Nc001566).

Для анализа полиморфизма 6 экзонов нуклеотидной последовательности гена вителлогенина отобрали 12 образцов пчел подвида *A. m. mellifera* уральской популяции с вариантами PQQ и PQQQ межгенного локуса *COI-COII* мтДНК, относящиеся к эволюционной ветви М.

Нуклеотидные последовательности 6 экзонов *VG* пчел 12 образцов *A. m. mellifera* уральской популяции депонировали в базу данных Генбанка. Всего в Генбанк депонировали 72 нуклеотидные последовательности всех экзонов *VG* медоносной пчелы подвида *A. m. mellifera*.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена вителлогенина *VG* выполнили с выборкой из 28 образцов пчел 4 подвидов из Генбанка, где в качестве референсной использовали последовательность *A. mellifera*, опубликованную в Генбанке (LG4; NC_007073.3 (4020743-4026919); AADG06005159.1 (56573-62749), первый нуклеотид стартового кодона которой соответствовал положению 4020743 четвертой хромосомы LG4 медоносной пчелы (<http://hymenopteragenome.org/beebase>).

Экстракцию ДНК из мышц торакса рабочих особей пчел, фиксированных в 96% этаноле, проводили набором ДНК-ЭКСТРАН-2 по протоколу СИНТОЛ (Москва) (www.syntol.ru). Качество и количество выделенной тотальной ДНК (около 500 нг) анализировали на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo,

США).

Амплификация выполнялась в термоциклере BIO-RAD T100 (США) в 15 мкл общего объема смеси по протоколу СИЛЕКС (Москва) (www.sileks.com/ru) с 10 нг тотальной ДНК при оптимальной температуре отжига для каждого набора праймеров. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени ПЦР-РВ проводилась с красителем SYBR Green в термоциклере Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) с набором по протоколу СИНТОЛ (Москва) (www.syntol.ru).

В исследованиях проводился анализ полиморфизма локуса *COI-COII* мтДНК, гена *ND2* мтДНК, гена вителлогенина *VG* яДНК, гена дефенсина 1 *DEF1* яДНК, гена абецина *ABAE* яДНК, гена *MGST1* яДНК, микросателлитных локусов *AP243*, *4A110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *AP049*, *A28* яДНК.

Продукты амплификации при силе тока 40мА разделяли по размерам в 8% ПААГ, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в геле-документирующей системе DocPrint Vilber Lourmat (Франция).

Фрагментарный и секвенционный анализ продуктов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе Applied Biosystem sequencer (США) по протоколу СИНТОЛ (Москва).

Анализ полученных результатов полиморфизма ДНК проводился с использованием программ CHROMAS 1.45, MEGA 6.0, DNASTAR 5.05, FSTAT 2.9.3.2, GENEPOP 4.2.2, POPULATIONS 1.2.28, STRUCTURE 2.3.4, STATISTICA 8.0, STATGRAFICS Plus 3.0, MICROSOFT EXCEL 2010.

Анализ нуклеотидных последовательностей и их выравнивание проводилось в программе MEGA 6.0 (Kumar et al., 2004) и DNASTAR 5.05 с использованием метода Clustal W 1.6 при пороге открытия разрывов 15, пороге размера разрывов 5, значимости транзиций 0.5 и задержке разрывов расхождения 30.

Дендрограммы на основе транзиций и трансверсий выровненных нуклеотидных последовательностей строились в программах MEGA 6.0 и DNASTAR 5.05 методом ближайшего соседа со 100 репликациями бутстреп.

Дендрограммы на основе частот аллелей микросателлитных локусов строились с применением кластерного анализа методом ближайшего соседа в программах STATISTICA 8.0 и STATGRAFICS Plus 3.0 по генетическим расстояниям М. Nei (1978) и попарным значениям *F_{st}*, которые рассчитывались в программах FSTAT 2.9.3.2 (JBrYme Goudet) и POPULATIONS 1.2.28 (CNRS UPR9034).

Значения уровня интрогрессии “южных” генов эволюционной ветви С (*A. m. caucasica*) в семьях пчел эволюционной ветви М (*A. m. mellifera*) по ядерному геному, необходимые для построения гистограммы (plot), были рассчитаны на основе полиморфизма микросателлитных локусов с использованием программы STRUCTURE 2.3.4 с применением Байесовского анализа (Bayesian analysis) и метода кластеризации Монте-Карло с цепями Маркова (Monte Carlo Markov Chain) (MCMC) при заданном числе кластеров *K*=2 с использованием модели смешивания (Admixture model) и повторности MCMC (iteration) 5000 (Pritchard, 2000).

Уровень интрогрессии “южных” генов по митохондриальному геному рассчитывался на основе наблюдаемых частот фрагментов межгенного локуса *COI-COII* мтДНК PQQQ, PQQ (*A. m. mellifera*, эволюционная ветвь М) и Q (*A. m. carpatica* и *A. m. caucasica*, эволюционная ветвь С) (Garnery et al., 1993).

ПЦР-РВ для анализа изменений экспрессии генов АМП *ABAE* и *DEF1* в организме пчел в результате подкормки 0.001% раствором хитозана при сравнении с контролем по гену *MGST1* проводился на двух семьях темной лесной пчелы *A. m. mellifera* из Бурзянского района д. Акбулатово, где из каждой семьи анализировалось по 25 рабочих особей. Всего в исследовании двух семей было использовано 50 рабочих пчел.

Работа частично выполнена на оборудовании ЦКП «Биомика» (Отделение биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель») и УНУ «КОДИНК».

Результаты и обсуждение

Дифференциация представителей пчел эволюционной ветви М на основе анализа полиморфизма нуклеотидной последовательности локуса *COI-COII* мтДНК

На основе анализа 7 информативных SNPs локуса *COI-COII* мтДНК пчелы эволюционной ветви М были дифференцированы на 8 групп (рис. 2). Первые пять групп расположены в порядке уменьшения количества представителей, а последние три - увеличения порядкового номера расположения SNPs в нуклеотидной последовательности.

Самая крупная основная группа I объединила 67 представителей пчел эволюционной ветви М, не имеющих информативных замен относительно референсной последовательности митотипа М4а' (KF274638). Она составляет ядро эволюционной ветви М медоносной пчелы (рис. 2).

В группу II вошли 22 представителя пчел с информативной транзицией G>A в позиции 912 относительно референсной последовательности митотипа М4а' (KF274638). Это, в основном, представители темной лесной пчелы уральской популяции, а также несколько представителей европейских популяций митотипов М10 (HQ337443), М12 (HQ337445) и М18 (HQ260345). В наиболее тесном родстве с пчелами уральской популяции находился митотип М10 (HQ337443), а митотипы М12 (HQ337445) и М18 (HQ260345) более отдалены (рис. 2). Один представитель пчелы уральской популяции из Белорецкого района Республики Башкортостан (KM242632) оказался в составе группы I, что предполагает тесное родство и единство происхождения с представителями зарубежных европейских популяций темной лесной пчелы (рис. 2).

Группа III объединила 7 представителей пчел разных митотипов М с информативной транзицией С>Т в позиции 817 относительно референсной последовательности митотипа М4а' (KF274638).

Группу IV составили 5 представителей пчел разных митотипов М с информативной трансверсией Т>А в позиции 938 относительно референсной

последовательности митотипа M4a' (KF274638).

Группа V включила трех представителей пчел эволюционной ветви M с транзицией C>T в позиции 857 относительно референсной последовательности митотипа M4a' (KF274638).

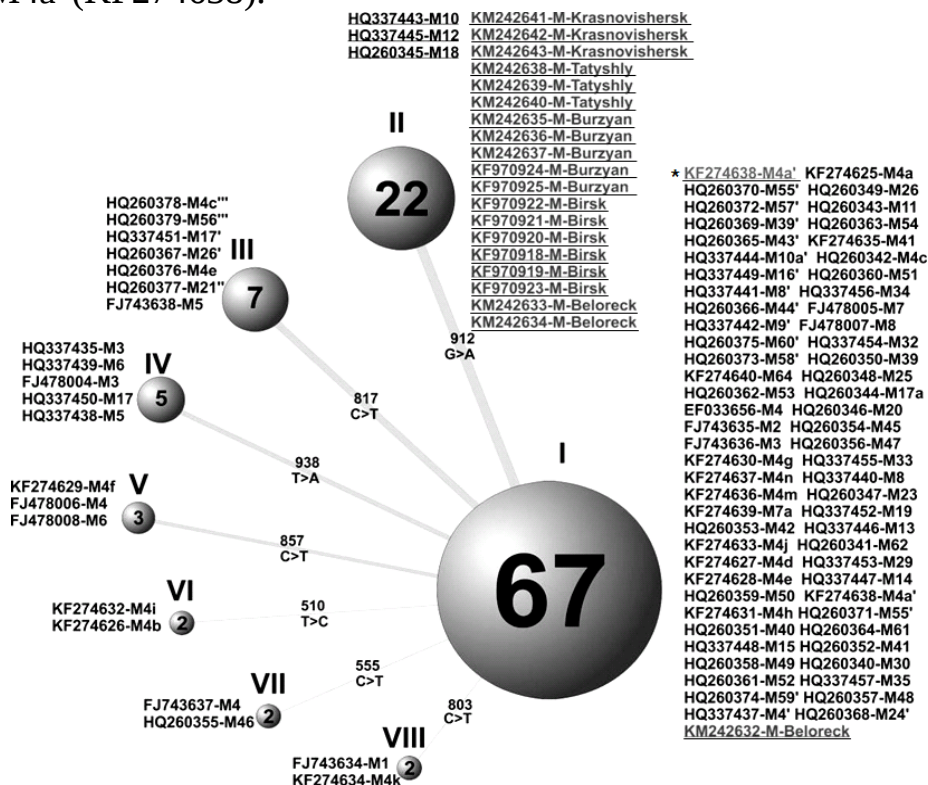


Рисунок 2. Классификация митотипов пчел эволюционной ветви M на основе 7 информативных SNPs локуса *COI-COII* мтДНК относительно референсной последовательности KF274638 (M4a'). Серым шрифтом с подчеркиванием обозначены образцы пчел уральской популяции, а звездочкой - референсная последовательность KF274638.

Последние три группы VI, VII, VIII объединили по два представителя пчел эволюционной ветви M с транзициями T>C в позиции 510, C>T в позициях 555 и 803 относительно референсной последовательности митотипа M4a' (KF274638).

Эти 8 групп митотипов (I-VIII) эволюционной ветви M можно назвать SNP-митотипами межгенного локуса *COI-COII* мтДНК и обозначить их следующим образом: M-I, M-II, M-III, M-IV, M-V, M-VI, M-VII, M-VIII. Саму классификацию подобно термину генотипирование можно назвать SNP-митотипированием. Переход от старого подхода к классификации митотипов на основе совместного использования полиморфизма сайтов рестрикции эндонуклеазы *DraI* и полиморфизма нуклеотидной последовательности локуса *COI-COII* мтДНК к новой SNP-митотипической классификации с применением анализа 7 информативных SNPs позволит сократить число с существующего 91 митотипа до 8 и решить проблему неконтролируемого роста числа митотипов.

Таким образом, мы представили генетическую структуру пчел эволюционной ветви M, подразделяющейся на 8 групп на основе 7 наиболее информативных SNPs локуса *COI-COII* мтДНК. В дальнейшем знания о

генетической структуре пчел эволюционной ветви М позволят оценить уровень митотипического разнообразия и отобрать редко встречающиеся и наиболее ценные для сохранения генетического разнообразия и селекции митотипы. Развитие методов молекулярной классификации темной лесной пчелы эволюционной ветви М позволит разработать методы генетической селекции в пчеловодстве. Это ключ к рациональному использованию генетического потенциала подвидов пчел, оптимизации генетических ресурсов аборигенного генофонда и сохранения их чистоты.

Филогенетический анализ подвигов *A. mellifera* на основе полиморфизма нуклеотидной последовательности гена *ND2* мтДНК

В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального генома пчел, являющихся представителями четырех эволюционных ветвей А, М, С, О была составлена дендрограмма (рис. 3).

Рисунок 3. Дендрограмма генетических взаимоотношений представителей пчел четырех эволюционных ветвей, составленная на основе сравнительного анализа полного митохондриального генома.

Для оценки информативности митохондриальных генов взята за основу топология дендрограммы с уникальной кластеризацией на четыре эволюционные ветви. Для анализа информативности отдельно взятых

митохондриальных генов проведено сравнение нуклеотидной последовательности каждого гена с референсной. Для каждого гена получены SNPs (табл. 2).

Суммарное число замен относительно референсной последовательности NC001566 *A. m. ligustica* (C) выглядит следующим образом: у KJ396189 *A. m. mellifera* (M) - 121 SNPs; KJ396188 *A. m. mellifera* (M) - 120 SNPs; KP163643 *A. m. syriaca* (O) - 141 SNPs; KJ601784 *A. m. scutellata* (A) - 188 SNPs; KM458618 *A. m. intermissa* (A) - 132 SNPs (табл. 2).

Сравнительный анализ полученных дендрограмм по каждому из 12 митохондриальных генов для представителей пчел эволюционных ветвей А, М, С, О с совокупной для всех 12 генов дендрограммой позволяет заключить, что 7 генов митохондриального генома - *ND2*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*, *COI*, *COIII* корректно отражают филогению и могут быть использованы для дифференциации подвидов. У остальных 5 генов митохондриального генома - *COII*, *ATP6*, *ATP8*, *ND1*, *ND3* филогения искажена и не позволяет дифференцировать подвиды пчел эволюционных ветвей А, М, С, О.

Таблица 2 - Однонуклеотидные замены 12 генов мтДНК медоносной пчелы

	Гены мтДНК	Размер, п. н.	NC001566 <i>A. m. ligustica</i> (референсная)	KJ396189 <i>A. m. mellifera</i>	KJ396188 <i>A. m. mellifera</i>	KP163643 <i>A. m. syriaca</i>	KJ601784 <i>A. m. scutellata</i>	KM458618 <i>A. m. intermissa</i>
Эволюционная ветвь			С	М		О	А	
Число SNPs	<i>ND1</i>	916	-	13	12	18	14	15
	<i>ND6</i>	502	-	8	9	7	8	9
	<i>ND4L</i>	262	-	3	3	6	3	4
	<i>ND4</i>	1342	-	20	18	17	22	20
	<i>ND5</i>	1663	-	18	20	21	20	21
	<i>ND3</i>	352	-	4	5	9	68	6
	<i>COIII</i>	778	-	8	7	8	7	6
	<i>ATP6</i>	679	-	1	1	2	1	3
	<i>ATP8</i>	157	-	2	2	5	2	2
	<i>COI</i>	1564	-	19	19	27	18	18
	<i>COII</i>	676	-	12	11	8	12	14
	<i>ND2</i>	1000	-	13	13	13	13	14

Примечание: - обозначено отсутствие SNP.

Таким образом, в результате проведенного сравнительного анализа нами обнаружено, что филогенетические исследования на основе перечисленных 7 генов, взятых как в отдельности, так и вместе, позволяют четко дифференцировать подвиды медоносной пчелы эволюционных ветвей А, М, С, О.

Анализ информативности гена *ND2* мтДНК был выполнен на выборке из

117 представителей пчел 20 подвидов 4 эволюционных ветвей. Нуклеотидные последовательности 39 образцов были определены нами, а 78 образцов - взяты из Генбанка. Сравнение выровненных нуклеотидных последовательностей гена *ND2* мтДНК относительно референсной последовательности позволило выявить однонуклеотидные замены SNPs для каждого образца пчел.

Для наглядного отображения филогенетических связей и процесса возникновения нуклеотидных замен у 117 представителей пчел 20 подвидов четырех эволюционных ветвей А, М, С, О путем анализа информативных однонуклеотидных замен гена *ND2* мтДНК нами построена медианная сеть (рис. 4).

На медианной сети прослеживается картина четкой дифференциации представителей пчел на 4 группы, соответствующие эволюционным ветвям А, М, С, О. Вызывает интерес представитель эволюционной ветви М подвида *A. m. iberiensis*, а также представители эволюционной ветви С подвида *A. m. sicula*, которые вошли в группу с пчелами эволюционной ветви А африканского происхождения. Такая группировка имеет следующее объяснение. Возможно, что подвиды *A. m. iberiensis* и *A. m. sicula*, согласно гипотезе африканской экспансии на север являются переходными формами, от пчел эволюционной ветви А к М и С, соответственно.

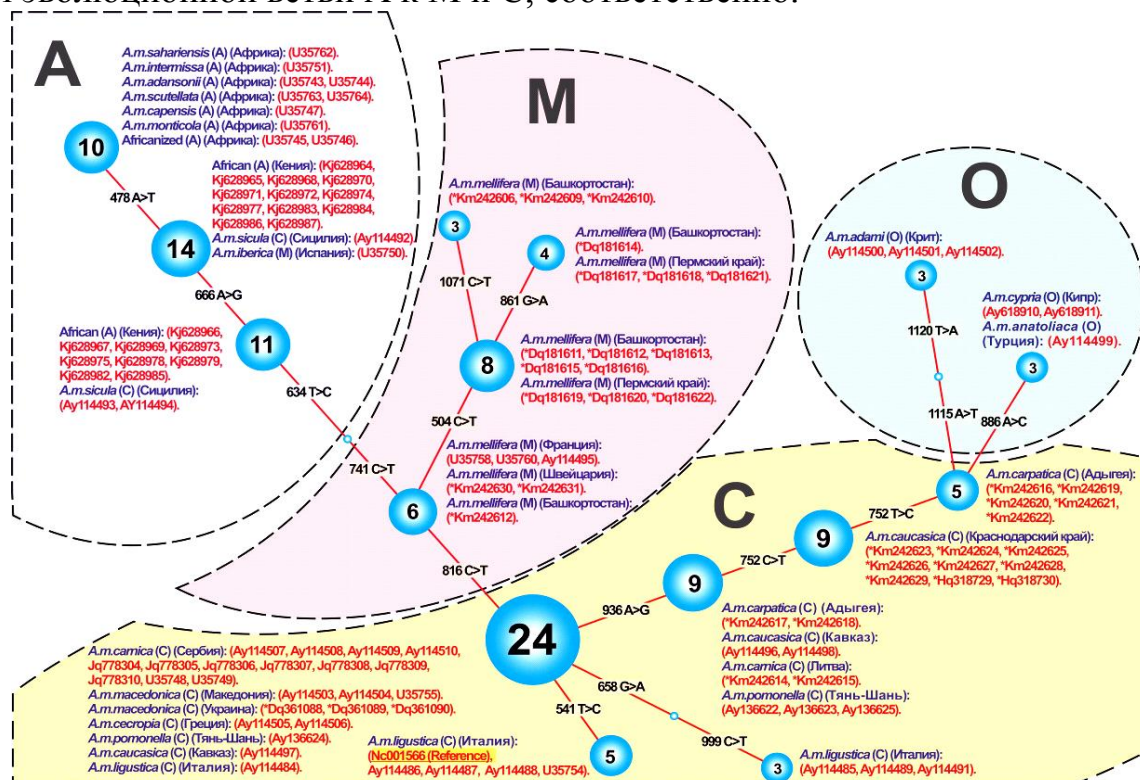


Рисунок 4. Медианная сеть генетических взаимосвязей подвидов пчел, построенная на основе SNPs гена *ND2* мтДНК.

Также наблюдается группировка представителя эволюционной ветви О подвида *A. m. anatoliaca*, которая включена в группу с средиземноморскими пчелами эволюционной ветви С. Согласно той же гипотезе экспансии, это может быть объяснено переходной формой от пчел эволюционной ветви О к С.

Пользуясь анализом медианных сетей и основываясь на сравнительном

анализе нуклеотидной последовательности гена *ND2* мтДНК открывается возможность дифференциации подвидов эволюционной ветви М от подвидов пчел эволюционной ветви С на основе SNPs 816 C>T.

Таким образом, в результате исследования обнаружены 7 информативных генов (*ND2*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*, *COI*, *COIII*), позволяющие четко дифференцировать подвиды медоносной пчелы четырех эволюционных ветвей А, М, С, О.

Анализом нуклеотидной последовательности гена *ND2* мтДНК 117 образцов пчел 20 подвидов подтверждается его высокая информативность при дифференциации подвидов пчел четырех эволюционных ветвей. На примере сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *ND2* мтДНК мы показали высокий уровень дифференцирующей способности этого гена и высказываем предположение о возможности отдельного использования каждого из 7 генов для дифференциации подвидов пчел 4 эволюционных ветвей.

Филогенетический анализ подвидов *A. mellifera* на основе полиморфизма нуклеотидной последовательности гена вителлогенина *VG* яДНК

В исследовании были отобраны 12 образцов пчел подвида *A. m. mellifera* уральской популяции, относящиеся к эволюционной ветви М и полученные нуклеотидные последовательности 6 экзонов гена вителлогенина были загружены в базу данных Генбанка.

На основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *VG* уральской популяции с референсной последовательностью *A. mellifera* (NC_007073.3) (4020743-4026919); AADG06005159.1 (56573-62749) обнаружены SNPs в виде транзиций (замена пуринового нуклеотида на пуриновый или пиримидинового - на пиримидиновый) и трансверсий (замена пуринового нуклеотида на пиримидиновый и наоборот). Транзиции и трансверсии в экзонах *VG* встречались следующим образом: во 2-м экзоне - 2 транзиции, в 3-м экзоне - 3 транзиции, в 4-м экзоне - 2 транзиции, в 5-м экзоне - 4 транзиции и 2 трансверсии, в 6-м экзоне - 1 транзигия (единственная несинонимичная), в 7-м экзоне - 6 транзиций.

В сравниваемых последовательностях наблюдалось всего 20 SNPs, из которых 18 замен - транзиции (90%), а 2 - трансверсии (10%). Обе трансверсии являлись несинонимичными и приводили к заменам в позициях 4528 (Ley/Ile) и 4533 (Arg/Ser) аминокислотной последовательности 5 экзона *VG*. Из 18 транзиций только 1 являлась несинонимичной (6%) и приводила к замене в позиции 5229 (Ala/Thr) аминокислотной последовательности 6 экзона *VG*.

В образце пчелы из д. Уядыбаш Татышлинского района Республики Башкортостан была обнаружена делеция в 9 нуклеотидов в позиции 794-802 в экзоне 2 *VG*, не приводящая к сдвигу рамки считывания и замене аминокислот. Сходная делеция встречалась в нуклеотидной последовательности экзона 2 *VG* медоносной пчелы в образцах из Генбанка под номерами: JN557265 (изолят L2371 из Египта), JN557266 (изолят L2372 из Египта), JN557273 (изолят L2411 из Египта), JN557274 (изолят L2412 из Египта), JN557275 (изолят L2421 из

Египта), JN557276 (изолят L2422 из Египта).

При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей VG пчел из уральской популяции с пчелами эволюционных ветвей М и С из Генбанка обнаружены 24 уникальных SNPs, которые четко дифференцировали представителей этих двух эволюционных ветвей (табл. 3). Эти SNPs могут быть использованы в качестве генетических ядерных маркеров для поиска сохранившихся изолятов *A. m. mellifera* в России в условиях гибридизации с пчелами с Ближнего Востока, Средней Азии и Восточной Европы.

Уникальные SNPs в экзонах VG, дифференцирующие пчел эволюционных ветвей М и С, встречались следующим образом: во 2-м экзоне - 3 замены, в 3-м экзоне - 5, в 4-м экзоне - 4, в 5-м экзоне - 6, в 6-м экзоне - 6, в 7-м экзоне - нет. Таким образом, 5-й и 6-й экзоны VG максимально информативны, 2-й, 3-й и 4-й экзоны средне информативны, а 7-й экзон при дифференциации пчел эволюционных ветвей М и С не информативен.

Таблица 3 - Нуклеотидные замены в экзонах VG, дифференцирующие пчел эволюционных ветвей М и С

Экзон		Позиции	Ветвь М	Ветвь С
Экзон 2	1	964	Т	С
	2	997	С	Т
	3	1039	С	Т
Экзон 3	4	1415	Т	С
	5	1460	С	Т
	6	1901	С	Т
	7	1970	G	A
	8	1976	С	Т
Экзон 4	9	2788	Т	С
	10	2887-2888	AA	TC
	11	2920	С	Т
	12	2938	Т	С
Экзон 5	13	3981	Т	С
	14	4242	Т	A
	15	4288	С	Т
	16	4316	A	G
	17	4500	G	A
	18	4508-4509	GG	AA
Экзон 6	19	5114	С	Т
	20	5210	С	Т
	21	5225	С	Т
	22	5306	G	A
	23	5321	Т	A
	24	5328	A	G

Высокой дифференцирующей способностью и информативностью обладают двойные SNPs. Обнаруженные нами двойные SNPs в экзоне 4 VG 287 AA>TC и в экзоне 5 VG 4508 GG>AA являются основными ядерными SNPs маркерами для дифференциации подвидов эволюционной ветви М и С.

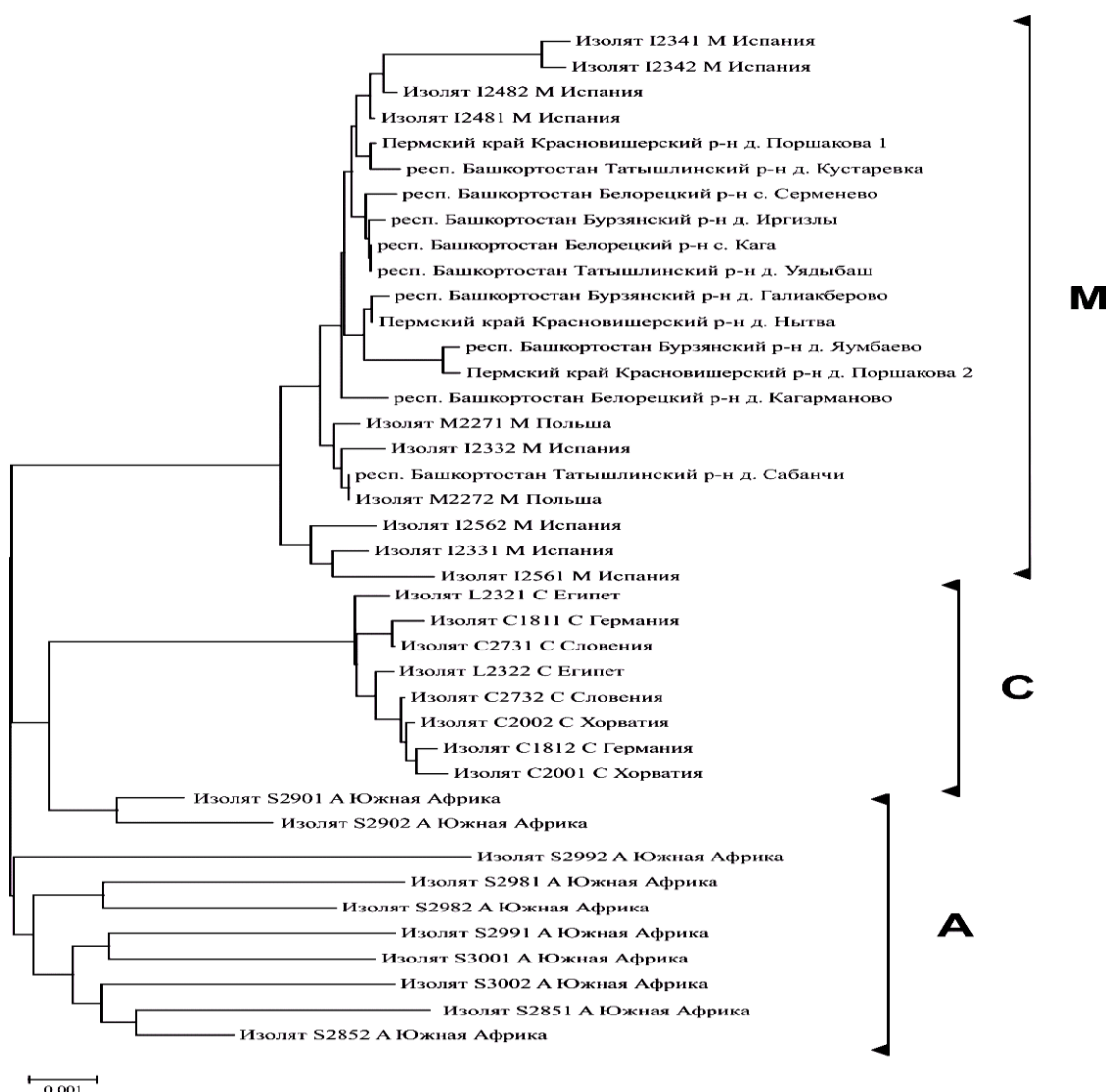


Рисунок 5. Дендрограмма генетических взаимоотношений пчел эволюционных ветвей А, М и С на основе сравнительного кластерного анализа нуклеотидных последовательностей VG методом ближайшего соседа.

На основе сравнительного кластерного анализа методом ближайшего соседа просеквенированных нуклеотидных последовательностей VG пчел 12 образцов уральской популяции, а также 10 семей пчел эволюционной ветви М (изоляты I2331, I2332, I2341, I2342, I2481, I2482, I2561, I2562 из Испании и M2271 M2272 из Польши), 10 семей пчел эволюционной ветви А (изоляты S2851, S2852, S2901, S2902, S2981, S2982, S2991, S2992, S3001, S3002 из Южной Африки) и 8 семей пчел эволюционной ветви С (изоляты C1811, C1812 из Германии, C2001, C2002 из Хорватии, C2731, C2732 из Словении, L2321, L2322 из Египта), просеквенированных С. Kent et al. (2011) составлена дендрограмма, отображающая генетические взаимоотношения пчел разных эволюционных ветвей (рис. 5).

Образцы семей пчел для анализа отбирались на основе максимальной доли принадлежности к какой-либо эволюционной ветви (более 0.9), рассчитанных С. Kent et al. (2011) для нуклеотидных последовательностей VG

депонированных в Генбанк (Kent et al., 2011).

Дендрограмма демонстрирует кластеризацию на три большие филогенетические группы, очень четко дифференцирующие пчел трех эволюционных ветвей А (Африка), М (Урал и Западная Европа) и С (Ближний Восток и Восточная Европа). Образцы пчел из уральской популяции с представителями западноевропейских популяций эволюционной ветви М кластеризовались в одну группу, что указывает на их генетическую близость и единство происхождения.

Таким образом, сравнительный кластерный анализ нуклеотидной последовательности *VG* может быть использован в филогенетических реконструкциях представителей *A. mellifera*, а обнаруженные 24 SNPs - в качестве ядерных маркеров для генетической дифференциации *A. m. mellifera* от других подвидов пчел в России.

Анализ интрогрессии “южных” генов в популяции темной лесной пчелы Урала и Поволжья

Оценку уровня интрогрессии “южных” генов в семьях пчел темной лесной пчелы популяций Урала и Поволжья, а также в семьях карпатской и серой горной кавказской пчел популяций Северного Кавказа и Восточных Карпат (табл. 1) мы выполнили на основе данных по полиморфизму 9 микросателлитных локусов.

Доли генов “южных” подвидов по ядерному и митохондриальному геномам для локальных популяций пчел Урала, Поволжья были рассчитаны на основе частот ядерных и митохондриальных маркеров.

На основе полученных долей генов эволюционных ветвей М и С в ядерном и митохондриальном геномах были построены гистограммы, отражающие уровень интрогрессии “южных” генов в популяциях темной лесной пчелы (рис. 6).

Гистограмма (plot), построенная по данным полиморфизма микросателлитных локусов, демонстрирует сохранение ядерного генома темной лесной пчелы *A. m. mellifera* в локальных популяциях Урала и Поволжья (рис. 6).

Минимальным уровнем интрогрессии “южных” генов по ядерному геному характеризовались локальные популяции темной лесной пчелы Республики Башкортостан (бурзянская, татышлинская, янаульская, балтачевская, караидельская, мишкинская, кушнаренковская), Пермского края (ординская, осинская, частинская, добрянская, красновишерская, юсьвенская, нытвенская, усольская, уинская, пермская), Республики Удмуртия (камбарская, можгинская, якшур-бодьинская, малопургинская), Республики Татарстан (мамадышская), Республики Чувашия (чебоксарская), Кировской области (кильмезская).

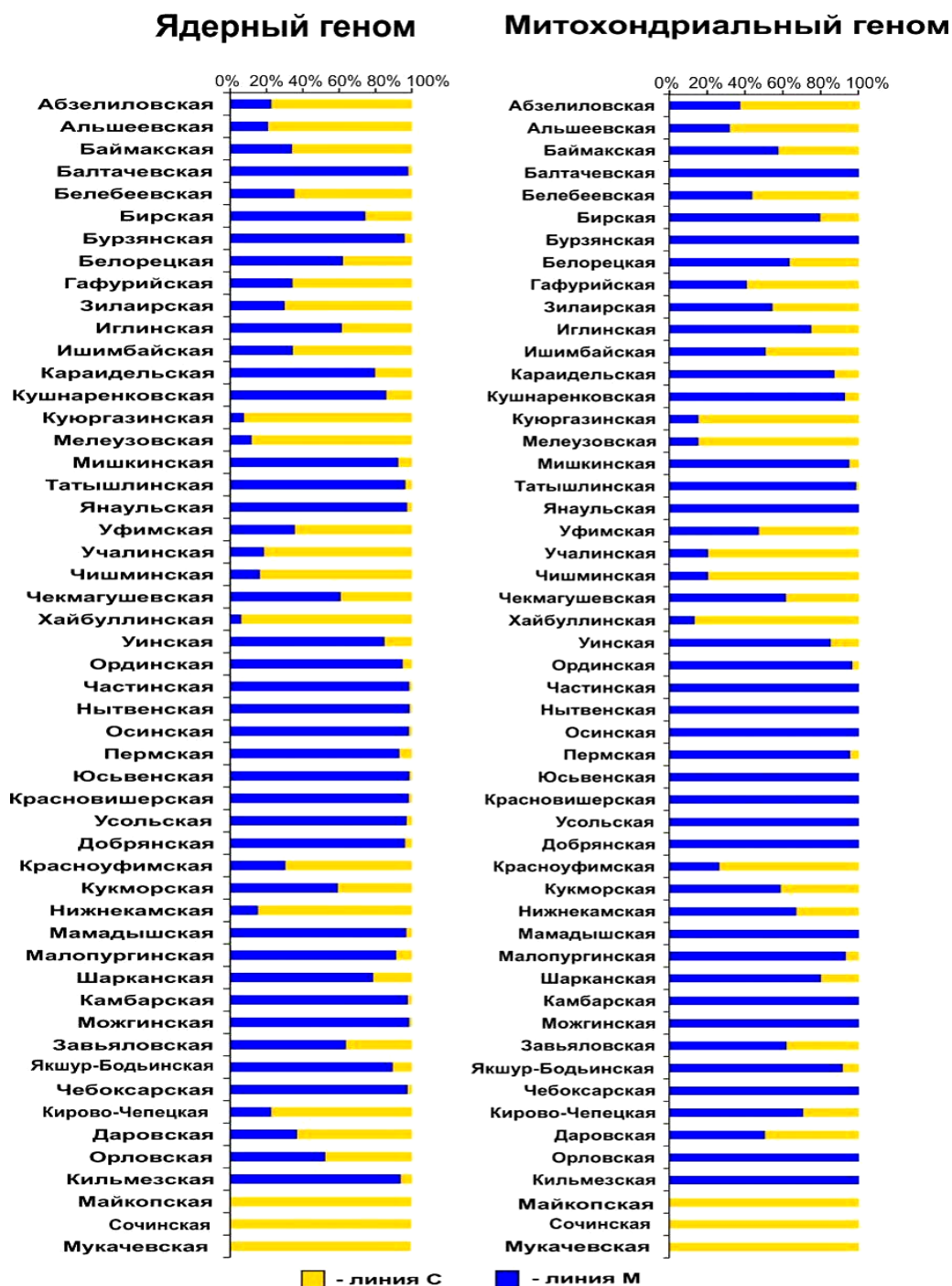


Рисунок 6. Гистограммы, отражающие уровень интрогрессии в локальных популяциях пчел по ядерному и митохондриальному геномам, построенные на основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов яДНК и локуса *COI-COII* мтДНК.

Для проведения геногеографического анализа секторные диаграммы, отражающие доли интрогрессии генов “южных” подвигов пчел эволюционной ветви С в локальных популяциях темной лесной пчелы Урала и Поволжья эволюционной ветви М, были расположены по местам их локализации на географической карте (рис. 7).

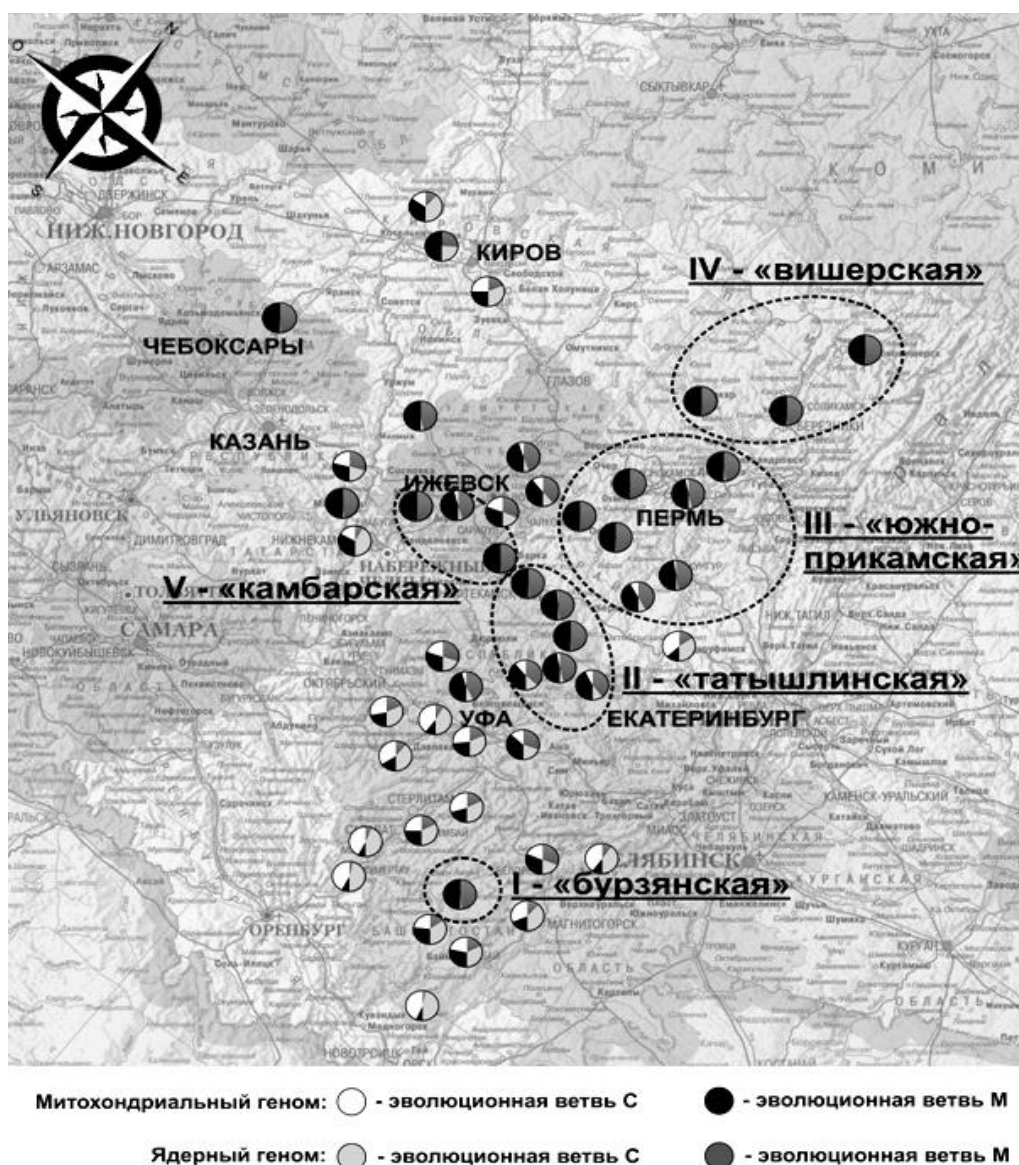


Рисунок 7. Географическое распространение генов “южных” подвидов пчел эволюционной ветви С в локальных популяциях местной темной лесной пчелы эволюционной ветви М на территории Урала и Поволжья, полученное на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов и локуса *COI-COII* мтДНК.

Гены темной лесной пчелы *A. m. mellifera* на Урале и в Поволжье сохранились не равномерно - наблюдается тенденция возрастания доли генов эволюционной ветви М по ядерному и митохондриальному геномам с юга на север. В южной части Урала и Поволжья отмечается единственная сохранившаяся в чистом виде локальная популяция темной лесной пчелы - бурзянская, которая находится под охраной Заказника “Алтын Солок”, Заповедника “Шульган-Таш” и Национального парка “Башкирия”.

Исходя из пространственного распределения локальных популяций, характеризующихся минимальной интрогрессией генов “южных” подвидов по ядерному и митохондриальному геномам, нам удалось выделить на территории Урала и Поволжья пять сохранившихся популяций (резерватов) темной лесной пчелы *A. m. mellifera*: бурзянская, татышлинская, южно-прикамская, вишерская

и камбарская. Эти популяции характеризуются достаточной численностью, стабильной и сбалансированной генетической и генотипической структурой и небольшим отклонением в распределении частот генотипов от равновесного распределения по Харди-Вайнбергу. Они составляют основу современного генофонда темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья. Для успешного сохранения выделенных нами пяти популяций темной лесной пчелы на территории Урала и Поволжья необходимо проводить постоянный мониторинг и управлять их генофондом в соответствии с принципами популяционной генетики.

Генетические характеристики популяции темной лесной пчелы Урала и Поволжья

Оценка генетических характеристик локальных популяций темной лесной пчелы Урала и Поволжья была проведена на основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов ядерной ДНК и локуса *COI-COI* мтДНК (Приложения А-К).

В популяционном генетическом исследовании была использована выборка рабочих особей пчел 49 районов Урала и Поволжья, и 3 районов Северного Кавказа и Восточных Карпат (табл. 1).

Для локальных популяций пчел Урала и Поволжья в результате анализа полиморфизма микросателлитных локусов были рассчитаны значения гетерозиготности, коэффициентов инбридинга и родства (Приложения А-К) и (табл. 4).

Таблица 4 - Значения гетерозиготности и коэффициентов инбридинга в локальных популяциях пчел Урала и Поволжья рассчитанные на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов

Локальная популяция	Fis $\pm \sigma$	Fit $\pm \sigma$	Fst $\pm \sigma$	R $\pm \sigma$	Ho $\pm \sigma$	Hs $\pm \sigma$	Ht $\pm \sigma$
Абзелиловская (РБ)	0.07 ± 0.07	0.21 ± 0.08	0.15 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.32 ± 0.08	0.35 ± 0.06	0.41 ± 0.07
Альшеевская (РБ)	0.09 ± 0.08	0.16 ± 0.10	0.08 ± 0.03	0.14 ± 0.04	0.42 ± 0.08	0.45 ± 0.06	0.48 ± 0.06
Баймакская (РБ)	0.03 ± 0.03	0.12 ± 0.08	0.09 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.33 ± 0.11	0.32 ± 0.11	0.35 ± 0.12
Балтачевская (РБ)	0.10 ± 0.09	0.12 ± 0.11	0.02 ± 0.02	0.03 ± 0.03	0.29 ± 0.10	0.33 ± 0.09	0.33 ± 0.08
Белебеевская (РБ)	0.15 ± 0.08	0.31 ± 0.10	0.19 ± 0.07	0.29 ± 0.10	0.37 ± 0.07	0.43 ± 0.06	0.48 ± 0.05
Бирская (РБ)	0.04 ± 0.03	0.11 ± 0.10	0.07 ± 0.02	0.12 ± 0.03	0.37 ± 0.10	0.38 ± 0.07	0.41 ± 0.07
Бурзянская (РБ)	0.01 ± 0.01	0.179 ± 0.06	0.18 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.34 ± 0.06
Белорецкая (РБ)	0.08 ± 0.06	0.14 ± 0.05	0.06 ± 0.02	0.11 ± 0.04	0.30 ± 0.06	0.32 ± 0.04	0.34 ± 0.05
Гафурийская (РБ)	0.09 ± 0.08	0.16 ± 0.08	0.07 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.37 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.45 ± 0.05
Зилаирская (РБ)	-0.09 ± 0.08	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.10 ± 0.08	0.37 ± 0.09	0.33 ± 0.07	0.39 ± 0.09
Иглинская (РБ)	-0.05 ± 0.04	-0.01 ± 0.07	0.04 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.43 ± 0.09	0.40 ± 0.05	0.42 ± 0.05

Ишимбайская (РБ)	0.03 ± 0.02	0.12 ± 0.04	0.10 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.48 ± 0.04
Караидельская (РБ)	0.08 ± 0.06	0.11 ± 0.05	0.03 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.35 ± 0.08	0.37 ± 0.07	0.38 ± 0.08
Кушнаренковская (РБ)	-0.17 ± 0.12	-0.11 ± 0.10	0.06 ± 0.04	0.13 ± 0.08	0.50 ± 0.12	0.41 ± 0.06	0.43 ± 0.06
Куюргазинская (РБ)	0.09 ± 0.16	0.11 ± 0.10	0.03 ± 0.06	0.05 ± 0.10	0.29 ± 0.10	0.32 ± 0.09	0.32 ± 0.09
Мелеузовская (РБ)	0.06 ± 0.05	0.14 ± 0.09	0.09 ± 0.04	0.15 ± 0.06	0.34 ± 0.07	0.35 ± 0.06	0.39 ± 0.05
Мишкинская (РБ)	0.09 ± 0.07	0.13 ± 0.06	0.05 ± 0.04	0.08 ± 0.07	0.28 ± 0.10	0.31 ± 0.10	0.32 ± 0.10
Татышлинская (РБ)	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.31 ± 0.10	0.30 ± 0.10	0.32 ± 0.10
Янаульская (РБ)	0.16 ± 0.04	0.21 ± 0.05	0.18 ± 0.03	0.27 ± 0.05	0.21 ± 0.08	0.25 ± 0.10	0.26 ± 0.11
Уфимская (РБ)	0.15 ± 0.07	0.30 ± 0.09	0.06 ± 0.05	0.10 ± 0.06	0.30 ± 0.07	0.38 ± 0.06	0.43 ± 0.06
Учалинская (РБ)	-0.32 ± 0.18	-0.28 ± 0.20	0.03 ± 0.02	0.08 ± 0.06	0.53 ± 0.17	0.41 ± 0.09	0.41 ± 0.09
Чишминская (РБ)	0.20 ± 0.13	0.17 ± 0.12	-0.04 ± 0.02	-0.07 ± 0.03	0.31 ± 0.09	0.41 ± 0.07	0.40 ± 0.07
Чекмагушевская (РБ)	-0.56 ± 0.14	-0.55 ± 0.01	0.01 ± 0.14	0.03 ± 0.05	0.58 ± 0.18	0.38 ± 0.10	0.38 ± 0.10
Хайбуллинская (РБ)	0.09 ± 0.06	0.21 ± 0.08	0.13 ± 0.04	0.22 ± 0.05	0.27 ± 0.09	0.29 ± 0.10	0.33 ± 0.13
Уинская (ПК)	-0.01 ± 0.01	-0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.32 ± 0.12	0.32 ± 0.11	0.32 ± 0.11
Ординская (ПК)	-0.01 ± 0.01	-0.01 ± 0.01	-0.01 ± 0.01	-0.01 ± 0.01	0.34 ± 0.13	0.33 ± 0.13	0.33 ± 0.13
Частинская (ПК)	-0.06 ± 0.06	-0.10 ± 0.06	-0.04 ± 0.01	-0.08 ± 0.01	0.26 ± 0.14	0.25 ± 0.13	0.24 ± 0.13
Нытвенская (ПК)	-0.07 ± 0.05	-0.13 ± 0.05	-0.05 ± 0.01	-0.13 ± 0.01	0.27 ± 0.13	0.25 ± 0.11	0.25 ± 0.11
Осинская (ПК)	-0.33 ± 0.13	-0.35 ± 0.13	-0.02 ± 0.01	-0.06 ± 0.01	0.33 ± 0.17	0.25 ± 0.11	0.24 ± 0.11
Пермская (ПК)	0.04 ± 0.10	0.15 ± 0.12	0.11 ± 0.04	0.19 ± 0.05	0.29 ± 0.11	0.31 ± 0.09	0.33 ± 0.11
Юсьвенская (ПК)	0.07 ± 0.05	0.09 ± 0.05	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.05	0.24 ± 0.11	0.26 ± 0.11	0.27 ± 0.11
Красновишерская (ПК)	-0.04 ± 0.03	0.12 ± 0.08	0.16 ± 0.07	0.28 ± 0.04	0.18 ± 0.10	0.15 ± 0.08	0.24 ± 0.12
Усольская (ПК)	0.13 ± 0.13	0.08 ± 0.06	-0.06 ± 0.01	-0.11 ± 0.01	0.26 ± 0.14	0.29 ± 0.09	0.29 ± 0.09
Добрянская (ПК)	-0.10 ± 0.07	-0.15 ± 0.07	-0.05 ± 0.01	-0.11 ± 0.01	0.30 ± 0.12	0.27 ± 0.10	0.27 ± 0.10
Красноуфимская (СО)	-0.09 ± 0.09	0.05 ± 0.05	0.12 ± 0.11	0.24 ± 0.09	0.38 ± 0.12	0.34 ± 0.08	0.39 ± 0.08
Кукморская (РТ)	-0.12 ± 0.10	0.13 ± 0.08	0.22 ± 0.15	0.39 ± 0.10	0.33 ± 0.14	0.28 ± 0.09	0.33 ± 0.11
Нижнекамская (РТ)	0.35 ± 0.18	0.65 ± 0.10	0.46 ± 0.05	0.55 ± 0.06	0.19 ± 0.13	0.29 ± 0.05	0.41 ± 0.07
Мамадышская (РТ)	-0.04 ± 0.04	-0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.39 ± 0.11	0.37 ± 0.11	0.38 ± 0.11
Малопургинская (РУ)	0.13 ± 0.10	0.23 ± 0.08	0.11 ± 0.04	0.18 ± 0.06	0.23 ± 0.09	0.27 ± 0.08	0.29 ± 0.10
Шарканская (РУ)	0.08	0.10	0.02	0.04	0.34	0.38	0.38

	± 0.06	± 0.05	± 0.01	± 0.03	± 0.09	± 0.08	± 0.07
Камбарская (РУ)	0.17 ± 0.05	0.17 ± 0.05	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.24 ± 0.12	0.29 ± 0.12	0.29 ± 0.12
Можгинская (РУ)	0.03 ± 0.02	-0.01 ± 0.01	-0.03 ± 0.02	-0.06 ± 0.01	0.26 ± 0.11	0.27 ± 0.11	0.27 ± 0.11
Завьяловская (РУ)	0.01 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.33 ± 0.10	0.32 ± 0.08	0.34 ± 0.09
Якшур-Бодьинская (РУ)	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.27 ± 0.10	0.31 ± 0.12	0.31 ± 0.12
Чебоксарская (РЧ)	-0.17 ± 0.03	-0.25 ± 0.02	-0.06 ± 0.01	-0.16 ± 0.01	0.36 ± 0.14	0.30 ± 0.11	0.30 ± 0.10
Кирово-Чепецкая (КО)	0.12 ± 0.10	0.07 ± 0.07	-0.05 ± 0.01	-0.10 ± 0.01	0.39 ± 0.12	0.44 ± 0.04	0.43 ± 0.04
Даровская (КО)	-0.19 ± 0.07	-0.23 ± 0.07	-0.04 ± 0.01	-0.10 ± 0.01	0.63 ± 0.07	0.53 ± 0.05	0.52 ± 0.05
Орловская (КО)	-0.27 ± 0.09	-0.33 ± 0.08	-0.05 ± 0.01	-0.14 ± 0.01	0.50 ± 0.17	0.39 ± 0.11	0.38 ± 0.11
Кильмезская (КО)	-0.34 ± 0.10	-0.40 ± 0.09	-0.04 ± 0.01	-0.13 ± 0.02	0.48 ± 0.18	0.36 ± 0.11	0.35 ± 0.10
Майкопская (РА)	0.25 ± 0.04	0.24 ± 0.04	-0.02 ± 0.02	-0.03 ± 0.02	0.19 ± 0.10	0.24 ± 0.12	0.24 ± 0.12
Сочинская (КК)	0.05 ± 0.04	0.48 ± 0.15	0.46 ± 0.15	0.61 ± 0.17	0.18 ± 0.10	0.17 ± 0.08	0.24 ± 0.10
Мукачевская (ЗО)	-0.09 ± 0.07	0.16 ± 0.07	0.22 ± 0.03	0.39 ± 0.05	0.26 ± 0.07	0.24 ± 0.08	0.30 ± 0.10

Примечание: Но - усредненная наблюдаемая гетерозиготность субпопуляций; Нs - усредненная ожидаемая гетерозиготность субпопуляций; Нt - общее генное разнообразие всей популяции в целом; σ - стандартная ошибка среднего.

Средние значения коэффициентов инбридинга в популяциях чистопородной темной лесной пчелы были ниже ($F_{is} = 0.06$, $F_{it} = 0.14$), чем в популяциях гибридного происхождения ($F_{is} = 0.08$, $F_{it} = 0.15$). Средние значения коэффициентов подразделенности и родства в популяциях темной лесной пчелы ($F_{st} = 0.17$, $R = 0.28$) были выше, чем в популяциях гибридного происхождения ($F_{st} = 0.11$, $R = 0.19$). Более высокие значения коэффициентов инбридинга ($F_{is} = 0.13$, $F_{it} = 0.29$), а также коэффициентов подразделенности и родства ($F_{st} = 0.23$, $R = 0.34$) характерны для чистопородных популяций “южных” пчел. Высокие значения коэффициентов родства в популяции темной лесной пчелы свидетельствует о чистопородности и преобладании генетической близости между семьями пчел одного подвида *A. m. mellifera* из разных популяций над генетическим родством между семьями пчел разных подвидов.

Таким образом, чистопородные популяции темной лесной пчелы характеризуются незначительным отклонением распределения генотипов от равновесного распределения по Харди-Вайнбергу, высокими уровнями генетического родства и подразделенности.

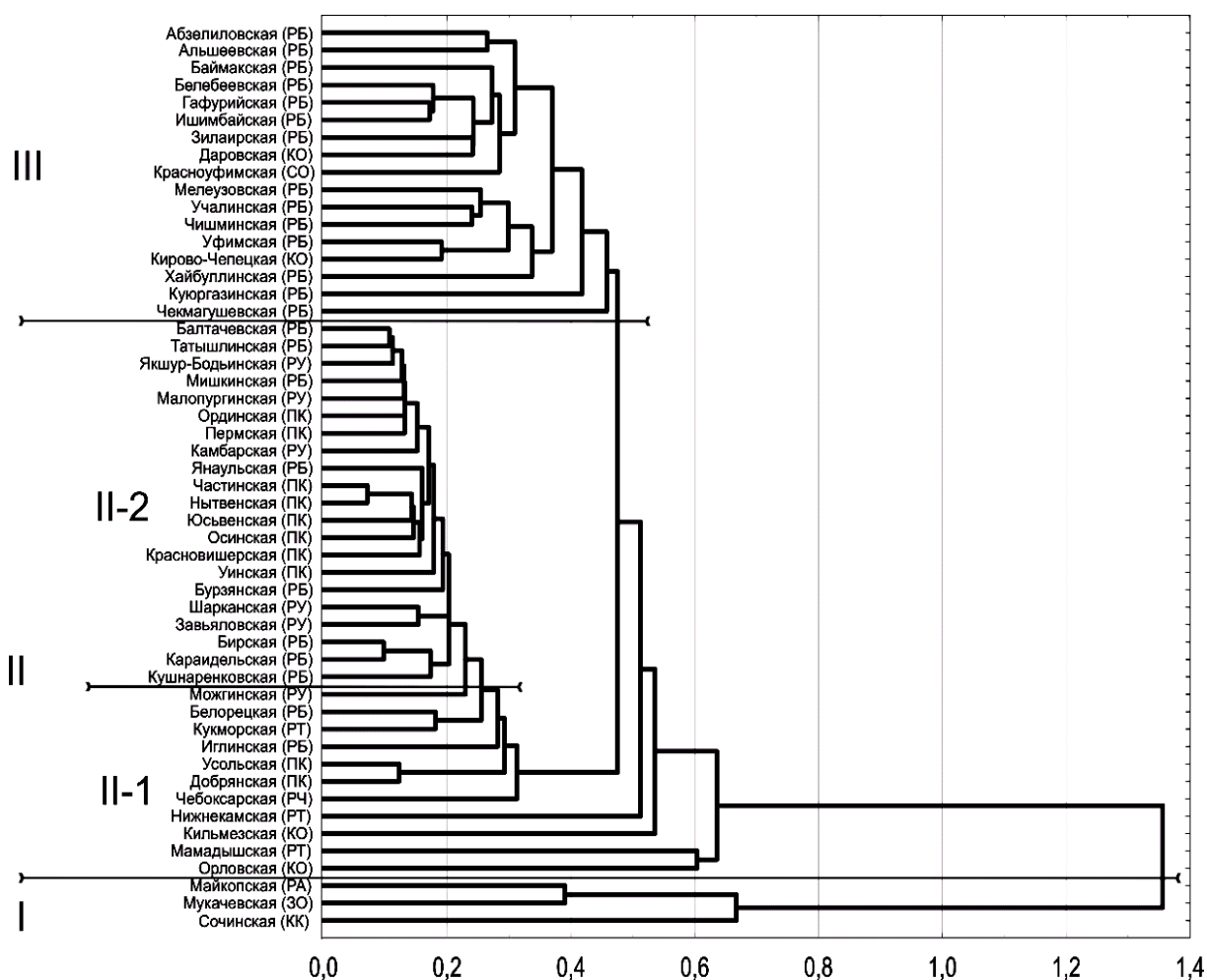


Рисунок 8. Дендрограмма генетических отношений локальных популяций пчел Урала и Поволжья, построенная на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов.

Сходство генетических показателей локальных популяций местных пчел Урала и Поволжья с европейскими популяциями *A. m. mellifera* эволюционной ветви М подтверждает гипотезу о едином происхождении разрозненных популяций темной лесной пчелы в Европе. Небольшие различия генетических показателей между разными локальными популяциями связаны с климатическими факторами и особенностями разведения пчел. Сильные отклонения генетических показателей от оптимальных значений, несомненно, вызваны процессами гибридизации с “южными” подвидами пчел эволюционной ветви С.

На основе попарных значений F_{st} между локальными популяциями темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья, полученных в результате анализа полиморфизма микросателлитных локусов, методом кластеризации ближайшего соседа была построена дендрограмма, которая подтверждает данные уровня интрогрессии по ядерному геному. Локальные популяции пчел “южных” подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carpatica* Кавказа и Карпат были использованы для сравнения в качестве внешней группы (рис. 8).

На дендрограмме локальные популяции “южных” пчел Кавказа и Карпат четко дифференцированы и расположены отдельно (группа I). Локальные

популяции местных пчел Урала и Поволжья подразделяются на две группы II и III.

Генетические характеристики и адаптированность семей темной лесной пчелы бурзянской популяции

В 25 семьях пчел темной лесной пчелы подвида *A. m. mellifera* из Бурзянского района Республики Башкортостан (рис. 1) был исследован полиморфизм 9 микросателлитных локусов ядерной ДНК и локуса *COI-COII* мтДНК.

Таблица 5 - Значения гетерозиготности и коэффициентов инбридинга в семьях пчел бурзянской популяции, рассчитанные на основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов

Семья	Ho	Hs	Ht	Fis	Fit	Fst
Стар. Акбулатово-1	0.22	0.22	0.21	0.04	-0.11	-0.15
Стар. Акбулатово-2	0.16	0.14	0.13	-0.20	-0.33	-0.11
Стар. Акбулатово-3	0.16	0.21	0.19	0.28	0.11	-0.18
Гадельгареево-4	0.28	0.30	0.28	0.12	-0.04	-0.16
Гадельгареево-5	0.22	0.26	0.24	0.18	0.02	-0.17
Старосубхангулово-6	0.33	0.20	0.19	-0.65	-0.73	-0.04
Старосубхангулово-7	0.39	0.25	0.24	-0.56	-0.66	-0.06
Акбулатово-8	0.22	0.15	0.14	-0.52	-0.63	-0.06
Акбулатово-9	0.17	0.21	0.19	0.28	0.11	-0.18
Акбулатово-10	0.22	0.22	0.21	0.04	-0.11	-0.15
Киекбаево-11	0.28	0.16	0.15	-0.76	-0.82	-0.03
Иргизлы-12	0.11	0.09	0.08	-0.20	-0.33	-0.11
Иргизлы-13	0.11	0.09	0.08	-0.20	-0.33	-0.11
“Байсалян”-14	0.20	0.13	0.13	-0.50	-0.60	-0.07
“Байсалян”-15	0.10	0.11	0.10	0.08	-0.07	-0.16
“Байсалян”-16*	0.30	0.22	0.21	-0.39	-0.50	-0.08
“Капова пещера”-17*	0.25	0.21	0.20	-0.20	-0.33	-0.11
“Капова пещера”-18	0.20	0.20	0.19	0.00	-0.14	-0.14
“Капова пещера”-19*	0.35	0.26	0.25	-0.36	-0.47	-0.09
“Куш Елга Баш”-20	0.20	0.23	0.21	0.11	-0.03	-0.16
“Куш Елга Баш”-21*	0.25	0.14	0.14	-0.77	-0.82	-0.03
“Куш Елга Баш”-22*	0.20	0.13	0.13	-0.50	-0.60	-0.07
Борти-23	0.23	0.19	0.18	-0.17	-0.31	-0.12
Борти-24	0.25	0.16	0.15	-0.58	-0.67	-0.06
Борти-25	0.20	0.17	0.16	-0.20	-0.33	-0.11

Примечание: * - отмечены семьи пчел, содержащие незначительный уровень интрогрессии “южных” генов.

Доли митохондриальных генов *A. m. mellifera* и “южных” пчел были рассчитаны на основе частот встречаемости вариантов Q и RQQ локуса *COI-COII* мтДНК (табл. 5).

Большинство исследованных семей пчел оказались носителями варианта RQQ локуса *COI-COII* мтДНК, который характеризует их происхождение по материнской линии от семей темной лесной пчелы *A. m. mellifera*. Однако, две

семьи пчел №6 и №7 из с. Старосубхангулово содержали вариант Q локуса *COI-COII* мтДНК, характеризующий их происхождение по материнской линии от семей “южных” подвидов (Приложение М).

Доли геномов яДНК темных лесных пчел и пчел “южного” происхождения в семьях были рассчитаны на основе анализа частот аллелей 9 микросателлитных локусов программой STRUCTURE (табл. 6).

Таким образом, каждая семья пчел Бурзянского района была охарактеризована по ядерному и митохондриальному геномам на содержание генов темной лесной пчелы (эволюционной ветви М) и “южных” подвидов (эволюционной ветви С).

Две семьи пчел №6 и №7 из с. Старосубхангулово имеют почти 100% “южное” происхождение по ядерному и митохондриальному геномам. Эти семьи, несомненно, были интродуцированы из южных регионов в недавнем прошлом. Для сокращения негативного генетического эффекта данные семьи “южных” пчел должны быть незамедлительно удалены из этой местности.

На основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов были рассчитаны показатели гетерозиготности H_o , H_s , H_t , коэффициенты инбридинга F_{is} , F_{it} и генетической подразделенности F_{st} (табл. 6) для 25 семей пчел.

Уровень гетерозиготности семей темной лесной пчелы бурзянской популяции ($H_o=0.20$, $H_s=0.16$, $H_t=0.15$) оказался ниже, чем в популяциях пчел других регионов. При сравнении наблюдаемой гетерозиготности H_o со значениями ожидаемой гетерозиготности H_s в большинстве семей отмечается небольшой избыток гетерозигот. Избыток гетерозигот также находит отражение в отрицательных значениях коэффициентов инбридинга F_{is} и F_{it} (табл. 6).

Возможно, что в условиях длительной изолированности в горно-лесной зоне бурзянского района эволюция семей темной лесной пчелы бурзянской популяции привела к установлению оптимального уровня генетического разнообразия. Повышенный уровень гетерозиготности в семьях темной лесной пчелы, возможно, свидетельствует об интрогрессии “южных” генов. Так, более высокие средние значения гетерозиготности наблюдались в семьях, содержащих интрогрессию “южных” генов ($H_o=0.30$, $H_s=0.21$, $H_t=0.20$).

Таким образом, необходимо селектировать семьи темной лесной пчелы со значениями гетерозиготности $H_o \leq 0.30$, не превышающими значения для семей пчел с интрогрессией “южных” генов.

Средние значения коэффициентов инбридинга и подразделенности в семьях темной лесной пчелы бурзянской популяции ($F_{is}=-0.23$, $F_{it}=-0.35$, $F_{st}=-0.11$) оказались ниже, чем в семьях, содержащих интрогрессию “южных” генов ($F_{is}=-0.45$, $F_{it}=-0.56$, $F_{st}=-0.07$) (табл. 6). Отрицательный знак коэффициентов инбридинга указывает на избыток гетерозигот, тогда как само значение характеризует величину отклонения от равновесного распределения. Подобные значения коэффициентов инбридинга и подразделенности в семьях темной лесной пчелы бурзянской популяции, возможно, являются результатом адаптивной эволюции, которая привела к формированию оптимальных уровней генетических характеристик.

Таблица 6 - Доли генов подвидов эволюционных ветвей М и С в семьях пчел по ядерному и митохондриальному геномам

Семья пчел	Ядерный		Митохондриальный	
	М	С	М	С
Стар. Акбулатово-1	0.99	0.01	1.00	0.00
Стар. Акбулатово-2	0.99	0.01	1.00	0.00
Стар. Акбулатово-3	0.99	0.01	1.00	0.00
Гадельгареево-4	0.99	0.01	1.00	0.00
Гадельгареево-5	0.99	0.01	1.00	0.00
Старосубхангулово-6	0.03	0.97	0.00	1.00
Старосубхангулово-7	0.06	0.94	0.00	1.00
Акбулатово-8	0.99	0.01	1.00	0.00
Акбулатово-9	0.99	0.01	1.00	0.00
Акбулатово-10	0.99	0.01	1.00	0.00
Киекбаево-11	0.99	0.01	1.00	0.00
Иргизлы-12	0.99	0.01	1.00	0.00
Иргизлы-13	0.99	0.01	1.00	0.00
“Байсалян”-14	1.00	0.00	1.00	0.00
“Байсалян”-15	1.00	0.00	1.00	0.00
“Байсалян”-16	1.00	0.01	1.00	0.00
“Капова пещера”-17	0.98	0.02	1.00	0.00
“Капова пещера”-18	1.00	0.00	1.00	0.00
“Капова пещера”-19	0.97	0.03	1.00	0.00
“Куш Елга Баш”-20	1.00	0.00	1.00	0.00
“Куш Елга Баш”-21	1.00	0.00	1.00	0.00
“Куш Елга Баш”-22	0.98	0.02	1.00	0.00
Борти-23	1.00	0.00	1.00	0.00
Борти-24	1.00	0.00	1.00	0.00
Борти-25	1.00	0.00	1.00	0.00

Коэффициенты инбридинга и подразделенности, сходные со значениями для семей с интрогрессией, были получены для семей пчел подвида *A. m. macedonica* из Болгарии ($F_{is}=-0.44$, $F_{it}=-0.34$, $F_{st}=-0.07$) на основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов (Nikolova, 2011). Вероятно, что интрогрессия чужеродных генов приводит к значительному отклонению генотипов от равновесного распределения и снижает генетическую подразделенность генофонда.

Вероятно, что для селекции необходимо отбирать семьи темной лесной пчелы с интрогрессией “южных” генов не более 5%, гетерозиготностью и коэффициентами инбридинга меньшими, чем у семей пчел с интрогрессией $H_o \leq 0.30$, $H_s \leq 0.30$, $H_t \leq 0.30$, $F_{is} \leq |0.45|$, $F_{it} \leq |0.55|$, коэффициентом подразделенности большим, чем у семей пчел с интрогрессией $F_{st} \geq |0.11|$.

Данный подход селективного предпочтения заключается в отборе

максимально чистопородных темных лесных пчел с оптимальным уровнем гетерозиготности, минимальным уровнем отклонения распределения генотипов от равновесного значения по Харди-Вайнбергу и максимальным уровнем генетической подразделенности. Такие семьи пчел будут иметь адаптивное преимущество и стабильность генофонда.

Исходя из анализа генетических параметров, семьи пчел были подразделены на 3 группы: 1 - предпочтительные для селекции темные лесные пчелы; 2 - менее предпочтительные для селекции темные лесные пчелы; 3 - семьи пчел для выбраковки (табл. 7). Такой подход генетической селекции семей позволит быстро и качественно решить проблемы сохранения аборигенного генофонда темной лесной пчелы.

Таблица 7 - Семьи пчел Бурзянского района с разным уровнем селективного преимущества

Семьи для селекции	Семьи не для селекции	Семьи для выбраковки
1. "Байсаян"-15	1. "Байсаян"-14	1. Старосубхангулово-6
2. "Байсаян"-16*	2. "Капова пещера"-19*	2. Старосубхангулово-7
3. "Капова пещера"-17*	3. "Куш Елга Баш"-21*	
4. "Капова пещера"-18	4. "Куш Елга Баш"-22*	
5. "Куш Елга Баш"-20	5. Акбулатово-8	
6. Акбулатово-10	6. Борти-24	
7. Акбулатово-9	7. Киекбаево-11	
8. Борти-23		
9. Борти-25		
10. Гадельгареево-4		
11. Гадельгареево-5		
12. Иргизлы-12		
13. Иргизлы-13		
14. Стар. Акбулатово-1		
15. Стар. Акбулатово-2		
16. Стар. Акбулатово-3		

Примечание: * - отмечены семьи пчел, содержащие следы интрогрессии "южных" генов.

На основе рассчитанных генетических дистанций по М. Nei (1978) между семьями пчел (Приложение Н) была построена дендрограмма, на которой отражено разделение всех семей пчел на две крупные группы I и II.

Группа I включает семьи пчел "южного" происхождения, расположенные в д. Старосубхангулово (рис. 9). Группа II включает семьи темной лесной пчелы из других населенных пунктов Бурзянского района.

Группа II подразделяется на 4 подгруппы, которые, вероятно связаны с географическим расположением пасек. Наиболее близко размещенные пасеки в связи с объединением популяции трутней и особенностями соотношения генотипов имеют большее генетическое родство.

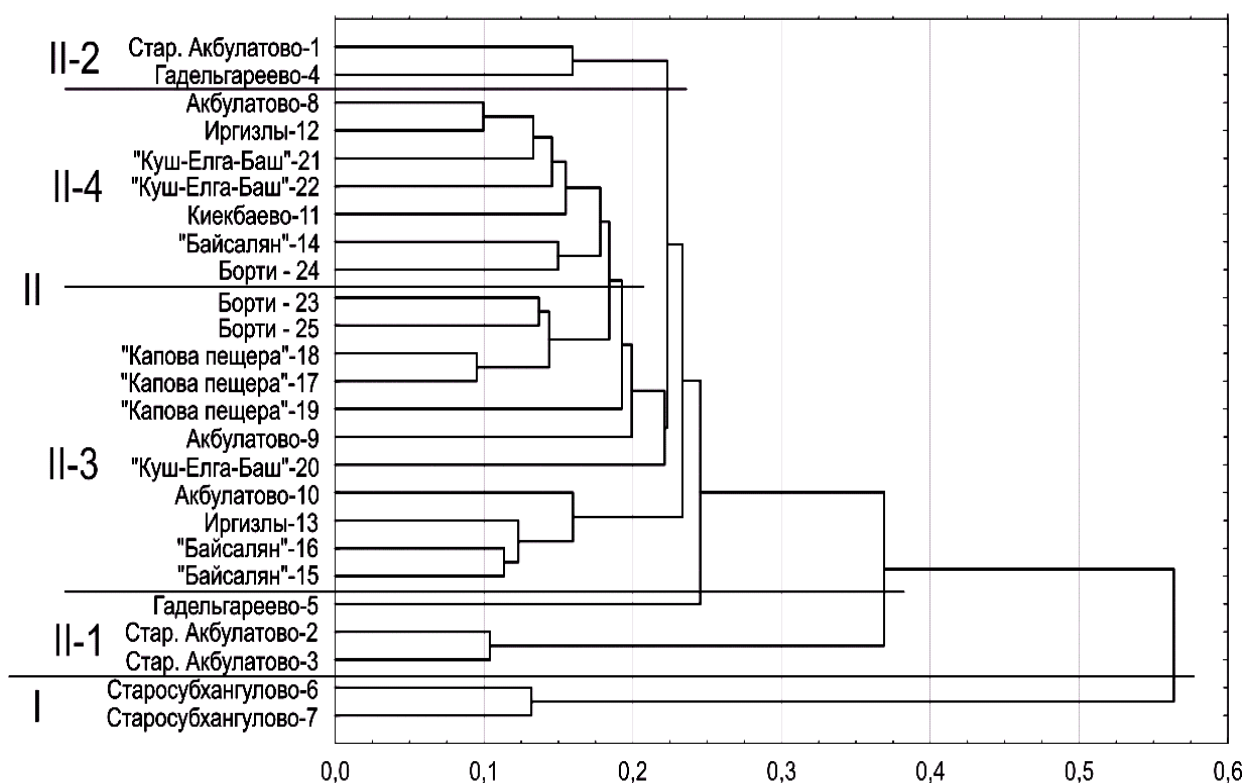


Рисунок 9. Дендрограмма генетических взаимоотношений семей пчел Бурзянского района, построенная по результатам анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов.

Подгруппы II-1 и II-4 объединяют семьи пчел из д. Стар. Акбулатово и Гадельгареево с интрогрессией “южных” генов ниже 2%, предпочтительные для селекции.

В подгруппу II-3 включены семьи темной лесной пчелы с интрогрессией “южных” генов менее 2%, большинство которых предпочтительны для селекции. Сюда же вошла семья пчел с пасеки “Капова пещера” № 19, которая характеризуется интрогрессией “южных” генов 3%.

В подгруппе II-4 объединяются все остальные семьи темной лесной пчелы с интрогрессией “южных” генов менее 2%, большинство которых менее предпочтительны для селекции.

Мы показали возможность отбора чистопородных семей темной лесной пчелы с генетическим потенциалом, соответствующим критериям генетической селекции. Генофонд бортевых пчел, обитающих в естественных условиях и подверженных прямому воздействию факторов окружающей среды, представляет наибольший интерес для понимания адаптивных особенностей генома пчелы.

Часть изученных семей пчел - бортевые, следовательно, подверженные естественному отбору, поскольку зимуют в дуплах деревьев в естественных условиях горных лесов Южного Урала. Отсюда, показатели гетерозиготности бортевых пчел сформированы естественными природными факторами и характеризуют оптимальное взаимоотношение организма и среды обитания.

Наличие следов интрогрессии в некоторых семьях указывает на то, что в бурзянской популяции темной лесной пчелы изоляция не абсолютная и может

происходить небольшой поток генов. Самым положительным моментом для бурзянской популяции можно отметить то, что подавляющее большинство проанализированных семей относится к темной лесной пчеле с интрогрессией “южных” генов менее 2%.

В популяции темной лесной пчелы из Восточной Польши с помощью 17 микросателлитных локусов было показано, что матки характеризуются ассортативностью скрещивания в пользу трутней своего подвида (Oleksa et al., 2013). Возможно, что ассортативность скрещивания характерна для всех популяций темной лесной пчелы, в частности бурзянской. Такой механизм репродуктивной изоляции дает дополнительные шансы для сохранения генофонда темной лесной пчелы на территории Бурзянского района.

Большинство свойств организма пчел реализуется из результата взаимодействия генома с факторами окружающей среды. Отбор по генетическим характеристикам не может гарантировать абсолютную выживаемость и высокую адаптированность семей пчел к любым условиям. Качество отобранных семей пчел будет сильно зависеть от условий ухода и состояния окружающей среды. Для получения желаемого эффекта пчеловод может активно воздействовать на факторы, влияющие на состояние пчелиной семьи: при борьбе с инфекционными и паразитарными заболеваниями пчел - обработка лечебными препаратами, например акарицидами, фунгицидами (флувалинат, амитраз, нистатин и др.), а с целью повышения продуктивности, улучшения качества зимовки и повышения иммунитета семей - подкормка биологически активными добавками (“Фитоаск”, “Хитомил” и др.).

Экспериментально нами было показано, что химические акарициды флувалинат и амитраз при обработке от варроатоза снижают иммунитет и продуктивность пчелиных семей (Ильясов, Шареева, 2014а; 2014б; Piyasov, Shareeva, 2014), тогда как подкормка пчел экстрактом лекарственных растений “Фитоаск” (Фархутдинов и др., 2015; 2016; Piyasov, Farkhutdinov, 2016), а также раствором природного хитозана “Хитомил” - не оказывает побочных действий, повышает иммунитет и, вследствие этого, пчелиная семья приобретает способность самостоятельно побеждать заболевания и излечиваться от аскосфероза и варроатоза (Салтыкова и др., 2010а; 2010б).

При селекции пчелиных семей важно знать особенности адаптации и иммунитета. Известно, что у пчел иммунитет является индуцибельным и складывается из клеточной и гуморальной составляющих. Основными составляющими гуморального иммунитета медоносной пчелы являются антимикробные пептиды АМП. Наиболее распространенный из них дефенсин, который существует в виде двух форм - дефенсин 1 и 2.

Для проверки индуцибельности и понятия особенностей механизма повышения иммунитета темной лесной пчелы нами было проведено исследование изменений уровня экспрессии АМП абецина и дефенсина под влиянием кормления 0.001% раствором хитозана на основе ПЦР-РВ. Эксперимент проводился на двух семьях темной лесной пчелы *A. m. mellifera* из Бурзянского района д. Акбулатово.

После подкормки раствором хитозана из каждой пчелиной семьи

отбирались по 25 рабочих особей, из которых в дальнейшем экстрагировалась тотальная РНК, на основе которой синтезировалась кДНК в результате реакции обратной транскрипции для последующей ПЦР-РВ. Всего в исследовании двух семей пчел было использовано 50 рабочих особей. Ген *MGST1* в эксперименте использовался в качестве контроля, как ген домашнего хозяйства, на экспрессию которого не влияет подкормка хитозана (табл. 12 и 13) (Салтыкова и др., 2010а; 2010б).

Нами были получены результаты об изменении уровней экспрессии генов дефенсина 1 *DEF1* и абецина *ABAE*. Уровень экспрессии дефенсина 1 под влиянием препарата хитозан имеет тенденцию к увеличению на 142% ($P=0.053$) в 1 эксперименте и на 96% ($P=0.033$) во 2 эксперименте. Уровень экспрессии абецина увеличился на 188% ($P<0.001$) в 1 эксперименте и на 100% ($P<0.001$) во 2 эксперименте (табл. 28) (рис. 37).

Нам удалось показать, что природные адаптогены, такие как препарат хитозана “Хитомил” и растительный препарат “Фитоаск” могут приводить к росту иммунитета за счет увеличения экспрессии генов антимикробных пептидов абецина *ABAE* (в 1.9 - 2.4 раза) и дефенсина 1 *DEF1* (в 2 - 2.8 раз) у темной лесной пчелы, а также к увеличению продуктивности семей (Салтыкова и др., 2010а; 2010б).

Таблица 8 - Изменение уровня экспрессии генов антимикробных пептидов абецина *ABAE* и дефенсина 1 *DEF1* в организме темной лесной пчелы

Ген	Эффект. реакции	Экспрессия	Станд. ошибка	Вероятность Р	Результат
Эксперимент 1					
<i>ABAE</i>	0.968	2.886	2.012 - 4.128	$P<0.001$	Повышается
<i>DEF1</i>	1.370	2.424	1.873 - 3.241	0.053	Повышается
<i>MGST</i>	1.297	1.000	0.000	$P<0.001$	Не меняется
Эксперимент 2					
<i>ABAE</i>	0.932	2.011	1.344 - 3.582	$P<0.001$	Повышается
<i>DEF1</i>	0.849	1.964	1.456 - 3.109	0.033	Повышается
<i>MGST</i>	1.277	1.000	0.000	$P<0.001$	Не меняется

Сходные результаты о положительном влиянии подкормки раствором хитозана на продуктивность и иммунитет пчелиных семей были представлены в работе А. Р. Хамадиевой с соавт (2012). Таким образом, иммунитет темной лесной пчелы индуцибелен и один из механизмов основан на увеличении уровня экспрессии антимикробных пептидов. Правильный уход и поддержание экологической безопасности среды обитания позволят селективированным семьям темной лесной пчелы максимально реализовать все заложенные в геноме хозяйственно-полезные признаки.

Из проанализированных молекулярно-генетическими методами семей темной лесной пчелы оптимальным генетическим потенциалом и селективным преимуществом обладают семьи с минимальной интрогрессией “южных” генов, оптимальным уровнем гетерозиготности, минимальным уровнем отклонения распределения генотипов от равновесного значения по Харди-Вайнбергу и максимальным уровнем генетической подразделенности.

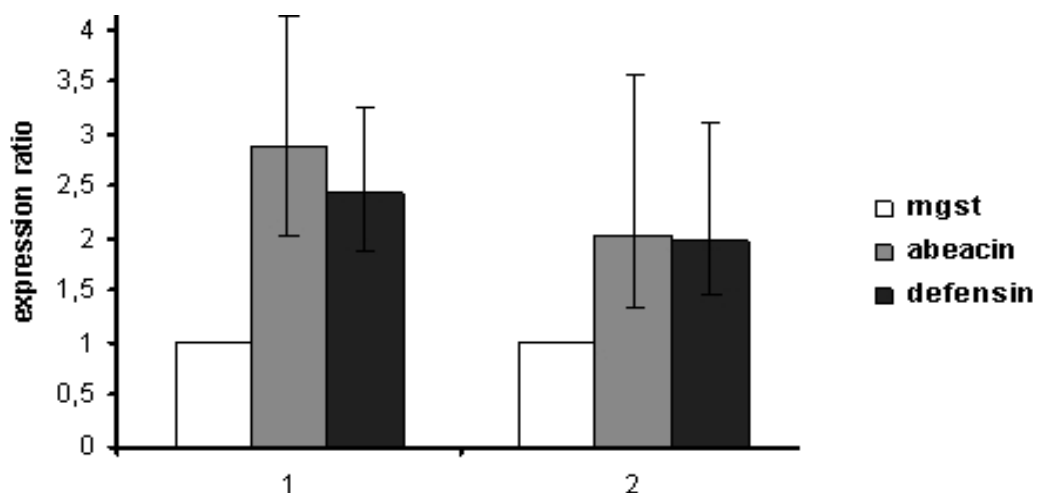


Рисунок 10. Гистограмма изменения уровня экспрессии генов антимикробных пептидов абецина *ABAE* и дефенсина 1 *DEF1* в организме темной лесной пчелы.

Возможно, что обитание пчел в условиях природы в бортиках при отсутствии загрязнения окружающей среды создает благоприятные условия для сохранения семей *A. m. mellifera* с оптимальным генетическим и адаптивным потенциалом. Поэтому чрезвычайно важно сохранение бурзянской популяции темной лесной пчелы, обитающей в условиях природы на территориях Государственного природного биосферного заповедника “Шульган-Таш”, Регионального природного заказника “Алтын Солок” и Национального парка “Башкирия”.

Таким образом, качество и адаптированность семей темной лесной пчелы складывается из генетических характеристик, корректности разведения и экологической безопасности окружающей среды.

Выводы

1. На основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генов ядерного и митохондриального геномов была выявлена высокая информативность для филогенетических реконструкций 7 генов мтДНК (*ND2*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*, *COI*, *COIII*) и гена вителлогенина *VG* яДНК медоносной пчелы.

2. В результате сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей локуса *COI-COII* мтДНК было показано, что уральская и поволжская популяции темной лесной пчелы отличаются от европейских популяций *A. m. mellifera* по SNP 912 G>A относительно референсной последовательности Nc001566 в Генбанке.

3. Обнаружены SNPs митохондриального (SNP 816 C>T в гене *ND2* мтДНК относительно референсной последовательности Nc001566) и ядерного (22 SNPs и 2 двойные SNPs 2887-2888 AA>TC и 4508-4509 GG>AA в гене *VG* яДНК относительно референсной последовательности Nc007073) геномов, позволяющие проводить селекцию темной лесной пчелы *A. m. mellifera*.

4. Подтверждено вхождение в эволюционную ветвь М и тесное генетическое родство темной лесной пчелы уральской популяции с

европейскими популяциями *A. m. mellifera* на основе сравнительного анализа нуклеотидной последовательности гена *VG* яДНК, гена *ND2* мтДНК и локуса *COI-COII* мтДНК.

5. На основе геногеографического анализа интрогрессии “южных” генов по ядерному (9 микросателлитных локусов) и митохондриальному (локус *COI-COII*) геномам на Урале и в Поволжье обнаружены и локализованы ареалы пяти сохранившихся популяций (резерватов) темной лесной пчелы *A. m. mellifera* (бурзянская, татышлинская, южно-прикамская, вишерская, камбарская).

6. На основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов яДНК были рассчитаны генетические стандарты для популяции ($H_o=0.24$, $H_s=0.23$, $H_t=0.28$, $F_{is}=0.06$, $F_{it}=0.14$, $F_{st}=0.17$) и семьи ($H_o=0.20$, $H_s=0.16$, $H_t=0.15$, $F_{is}=0.23$, $F_{it}=0.35$, $F_{st}=0.11$) темной лесной пчелы *A. m. mellifera*.

7. Анализ полиморфизма 9 микросателлитных локусов яДНК и локуса *COI-COII* мтДНК позволил определить уровень интрогрессии “южных” генов в популяции темной лесной пчелы Урала и Поволжья. Процесс гибридизации *A. m. mellifera* происходил в результате интродукции пчелиных семей других подвидов из южных регионов России.

8. На основе полиморфизма 9 микросателлитных локусов яДНК была предложена методика селекции семей темной лесной пчелы с интрогрессией “южных” генов не более 5%, и генетическими показателями, характерными для чистопородных семей *A. m. mellifera* ($H_o \leq 0.30$, $H_s \leq 0.30$, $H_t \leq 0.30$, $F_{is} \leq |0.45|$, $F_{it} \leq |0.55|$, $F_{st} \geq |0.11|$). Качество селектируемого материала будет определяться числом показателей, которым соответствует анализируемая семья пчел. Такая селекция позволит поддерживать генетическое и генотипическое разнообразие в рамках генетического стандарта подвида *A. m. mellifera*.

Практические рекомендации

Темная лесная пчела является оптимально приспособленной к жизни в условиях континентального климата Северной Европы и Урала. Эволюция этого подвида происходила совместно с эволюцией местных видов цветковых растений и привела к взаимозависимости между ними. Нарушение этой связи приведет к потере биологического и видового разнообразия биоценозов. Интродуцированные “южные” подвиды эволюционировали в других природно-климатических зонах и не могут опылять все растения, посещаемые темной лесной пчелой, в результате чего биоценозы будут постепенно обедняться. Исходя из высокой значимости темной лесной пчелы для сохранения экосистем и биоценозов Урала и Поволжья, рекомендации будут направлены на сохранение аборигенного генофонда темной лесной пчелы *A. m. mellifera*.

Для сохранения генофонда темной лесной пчелы *A. m. mellifera* на территории Урала и Поволжья необходимо проводить мероприятия, способствующие стабильности генетической структуры. Цель может обеспечиваться выполнением следующих мероприятий:

1. Для получения полной, без пробелов, картины структуры генофонда в регионе в течение ближайших нескольких лет необходимо провести геногеографический анализ локальных популяций пчел, не изученных на Урале

и в Поволжье.

2. Обозначить границы сохранившегося генофонда темной лесной пчелы *A. m. mellifera* и обеспечить создание зон усиленного мониторинга. Для выявления негативных процессов интрогрессии “южных” генов на начальной стадии мониторинг следует проводить ежегодно.

3. На основе пропаганды значимости темной лесной пчелы *A. m. mellifera*, а также экономической целесообразности ее разведения на Урале и в Поволжье необходимо добиться потери интереса к разведению и интродукции “южных” подвидов пчел среди пчеловодов и населения.

4. Организовать ассоциацию пчеловодов, заинтересованных в разведении и сохранении темной лесной пчелы *A. m. mellifera* на Урале и в Поволжье. Реализовать на базе ассоциации репродукторы чистопородного генофонда темной лесной пчелы *A. m. mellifera* в местах их преобладающего обитания.

5. Организовать сотрудничество с заповедником “Шульган-Таш” по проведению селекции бортовых пчел с использованием генетических характеристик. В дальнейшем селекцию семей пчел по генетическим параметрам необходимо проводить в репродукторах темной лесной пчелы.

6. На основе информативных SNPs ядерного и митохондриального геномов разработать тест-систему для идентификации семей темной лесной пчелы и определения уровня интрогрессии “южных” генов.

7. Выявить зоны интенсивной гибридизации темной лесной пчелы *A. m. mellifera* с “южными” подвидами и обеспечить их изоляцию путем объявления их зонами генетического загрязнения, опасными для обмена биологическим материалом с пчелами этих зон. Обозначить территории с сохранившимся генофондом темной лесной пчелы *A. m. mellifera* безопасными и желательными для скрещивания.

8. Принять Федеральный Закон о Пчеловодстве, который будет поддерживать пчеловодов, содержащих темных лесных пчел дотациями и льготными условиями мониторинга генофонда, а также признавать приоритетным разведение местных пчел в северных регионах страны.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Публикации в ведущих научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Ильясов, Р. А. На Урале сохранились четыре резервата пчелы среднерусской расы *Apis mellifera mellifera* L. / Р. А. Ильясов, А. В. Петухов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2006. - № 2. - С. 19-20.
2. Ильясов, Р. А. Филогенетика подвидов *Apis mellifera* / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков // Пчеловодство. - 2006. - № 7. - С. 18-19.
3. Ильясов, Р. А. Локальные популяции *Apis mellifera mellifera* L. на Урале / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. В. Петухов, А. Г. Николенко // Генетика. - 2007. - Т. 43. - № 6. - С. 855-858.
4. Ильясов, Р. А. Пчелы среднерусской расы *Apis mellifera mellifera* L. на Урале / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2007. - Т. 75. - № 4. - С. 146-148.
5. Ильясов, Р. А. Сохранение *Apis mellifera mellifera* L. в Удмуртской республике / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, Л. М. Колбина, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2007. - № 6. - С. 13-14.
6. Колбина, Л. М. Использование морфологических и молекулярно-генетических методов для исследования *Apis mellifera* / Л. М. Колбина, С. Н. Непейвода, Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. - 2007. - Т. 2. - № 10. - С. 57-58.
7. Ильясов, Р. А. Методы идентификации подвида *A. m. mellifera* пчелы медоносной / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2008. - № 8. - С. 8-9.
8. Ильясов, Р. А. Украинские пчелы - уникальный подвид или экотип македонских пчел? / Р. А. Ильясов, А. Д. Комиссар, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2008. - № 1. - С. 10-11.
9. Ильясов, Р. А. Характеристика популяции пчел юго-запада Свердловской области / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, В. С. Филатов, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2008. - № 5. - С. 18-19.
10. Фахретдинова, С. А. Состояние бурзянской популяции бортовых пчел *Apis mellifera mellifera* L. / С. А. Фахретдинова, Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2008. - № 10. - С. 6-7.
11. Шареева, З. В. Пчела подвида *Apis mellifera mellifera* L. на Севере Республики Башкортостан / З. В. Шареева, Р. А. Ильясов, Н. Г. Кутлин, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. Серия естественные науки. - 2008. - Т. 195. - С. 245-249.
12. Ильясов, Р. А. Изучение границ ареала медоносной пчелы *Apis mellifera mellifera* на Южном Урале / Р. А. Ильясов, З. В. Шареева, Н. Г. Кутлин, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Аграрная Россия. Специальный выпуск. - 2009. - С. 37-38.
13. Ильясов, Р. А. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *ND2* мтДНК в популяциях пчел

Республики Башкортостан / Р. А. Ильясов, З. В. Шареева, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2009. - Т. 100. - № 6. - С. 155-156.

14. Шареева, З. В. Изучение генетической структуры северной части ареала башкирской популяции *Apis mellifera mellifera* L. / З. В. Шареева, Р. А. Ильясов, Н. Г. Кутлин, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Вестник Оренбургского государственного университета. - 2009. - Т. 100. - № 6. - С. 427-428.

15. Шареева, З. В. Структура популяции северного ареала башкирской пчелы *Apis mellifera mellifera* L. на основе фенотипических и генотипических исследований / З. В. Шареева, Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, Н. Г. Кутлин, А. Г. Николенко // Естественные и технические науки. - 2009. - Т. 2. - № 40. - С. 111-116.

16. Ilyasov, R. A. Phylogenetics relationships of dark European honeybees *Apis mellifera mellifera* L. from the Russian Ural and West European populations / R. A. Ilyasov, I. A. Kutuev, A. V. Petukhov, A. V. Poskryakov, A. G. Nikolenko // Journal of Apicultural Science. - 2011. - V. 55. - No. 1. - P. 67-76.

17. Колбина, Л. М. Генетическая дифференциация популяций медоносных пчел *Apis mellifera* L. в Удмуртской Республике / Л. М. Колбина, С. Н. Непейвода, С. Л. Воробьева, Н. А. Санникова, И. В. Масленников, Р. А. Ильясов, А. Г. Николенко // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. - 2011. - Т. 6. - № 25. - С. 46-50.

18. Непейвода, С. Н. Анализ генетической дифференциации популяций *Apis mellifera* в Удмуртии / С. Н. Непейвода, Л. М. Колбина, С. Л. Воробьева, Н. А. Санникова, И. В. Масленников, Р. А. Ильясов, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2011. - № 10. - С. 12-13.

19. Ilyasov, R. A. Review of the expression of antimicrobial peptide defensin in honey bees *Apis mellifera* L. / R. A. Ilyasov, L. R. Gaifullina, E. S. Saltykova, A. V. Poskryakov, A. G. Nikolenko // Journal of Apicultural Science. - 2012. - V. 56. - No. 1. - P. 115-124.

20. Брандорф, А. З. Популяционно-генетическая дифференциация медоносных пчел Кировской области / А. З. Брандорф, М. М. Ивойлова, Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2012. - № 7. - С. 14-16.

21. Ильясов, Р. А. Дефенсины в противомикробной защите медоносной пчелы / Р. А. Ильясов, Л. Р. Гайфуллина, Е. С. Салтыкова, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. - 2012. - Т. 48. - № 5. - С. 425-432.

22. Ильясов, Р. А. Методы диагностики, профилактики и лечения нозематоза классического и типа С / Р. А. Ильясов, Л. Р. Гайфуллина, Е. С. Салтыкова, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2013. - № 10. - С. 30-32.

23. Ильясов, Р. А. Сохранение восковой пчелы *A. cerana* на Дальнем Востоке / Р. А. Ильясов, М. Ю. Прощалыкин, А. В. Поскряков, А. С. Лелей, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2013. - № 9. - С. 56-57.

24. Николенко, А. Г. Опыт молекулярно-генетической сертификации пасеки / А. Г. Николенко, Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, В. О. Кугейко // Пчеловодство. - 2013. - № 5. - С. 14-15.
25. Ильясов, Р. А. Роль антимикробного пептида дефенсина в иммунитете пчелиной семьи / Р. А. Ильясов, Л. Р. Гайфуллина, Е. С. Салтыкова, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2014. - № 1. - С. 26-28.
26. Ильясов, Р. А. Действие флувалината и амитраза на семью пчел / Р. А. Ильясов, З. В. Шареева // Пчеловодство. - 2014. - № 6. - С. 30-32.
27. Ильясов, Р. А. Влияние акарицидов на медоносную пчелу при лечении варроатоза / Р. А. Ильясов, З. В. Шареева // Аграрная Россия. - 2014. - Т. 10. - С. 21-22.
28. Фархутдинов, Р. Г. Фунгицид и стимулятор пчелиной семьи растительного происхождения / Р. Г. Фархутдинов, Р. А. Ильясов, Ф. Г. Юмагузин, Ю. В. Туктарова, В. М. Шафикова, М. Ф. Абдуллин // Пчеловодство. - 2014. - № 9. - С. 33-35.
29. Брандорф, А. З. Пчеловодство Великобритании / А. З. Брандорф, Р. А. Ильясов, А. Неал // Пчеловодство. - 2015. - № 1. - С. 64-66.
30. Ильясов, Р. А. Бурзянская бортевая пчела и бортное пчеловодство на Южном Урале / Р. А. Ильясов, М. Н. Косарев, Ф. Г. Юмагузин // Пчеловодство. - 2015. - № 7. - С. 12-15.
31. Ильясов, Р. А. Генетическая дифференциация локальных популяций темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. на Урале / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. В. Петухов, А. Г. Николенко // Генетика. - 2015. - Т. 51. - № 7. - С. 792-798.
32. Ильясов, Р. А. Генетические особенности островков популяции темной лесной пчелы на Урале / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. В. Петухов, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2015. - № 2. - С. 20-22.
33. Ильясов, Р. А. Новая классификация митотипов локуса *COI-COII* мтДНК пчел эволюционной ветви М (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera iberiensis*) / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. В. Петухов, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2015. - № 9. - С. 22-26.
34. Ильясов, Р. А. Новые SNP маркеры в гене вителлогенина VG медоносной пчелы для идентификации *Apis mellifera mellifera* L. / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Генетика. - 2015. - Т. 51. - № 2. - С. 194-199.
35. Ильясов, Р. А. Роль однонуклеотидных замен в гене вителлогенина при идентификации темной лесной пчелы / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2015. - № 3. - С. 22-24.
36. Каскинова, М. Д. Анализ генетической структуры популяций медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) / М. Д. Каскинова, Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Генетика. - 2015. - Т. 51. - № 10. - С. 1199-1202.
37. Ильясов, Р. А. Информативность митохондриальных генов медоносной пчелы / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2016. - № 4. - С. 20-23.

38. Ильясов, Р. А. Новый подход к классификации митотипов темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* и иберийской пчелы *Apis mellifera iberiensis* / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. В. Петухов, А. Г. Николенко // Генетика. - 2016. - Т. 52. - № 3. - С. 320-331.
39. Ильясов, Р. А. Оценка генетического потенциала темной лесной пчелы / Р. А. Ильясов, М. Н. Косарев, А. В. Поскряков, А. Я. Шарипов, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2016. - № 2. - С. 20-24.
40. Ильясов, Р. А. Современное состояние и сохранение *Apis mellifera mellifera* в России и странах Европы / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2016. - № 1. - С. 8-11.
41. Ильясов, Р. А. Современные резерваты темной лесной пчелы на Урале и в Поволжье / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. В. Петухов, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2016. - № 5. - С. 20-22.
42. Ильясов, Р. А. Молекулярно-генетический анализ пяти сохранившихся резерватов темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* Урала и Поволжья / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. В. Петухов, А. Г. Николенко // Генетика. - 2016. - Т. 52. - № 6. - С. 1-13.
43. Каскинова, М. Д. Оценка чистопородности семей темной лесной пчелы бурзянской популяции / М. Д. Каскинова, Р. А. Ильясов, М. Н. Косарев, А. В. Поскряков, А. Я. Шарипов, А. Г. Николенко // Пчеловодство. - 2016. - № 6. - С. 20-23.
44. Ильясов, Р. А. Семь генов митохондриального генома, позволяющие дифференцировать подвиды медоносной пчелы *Apis mellifera* / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Генетика. - 2016. - Т. 52. - № 9. - С. 1-9.

Статьи в других изданиях

1. Ilyasov, R. A. Four populations of *Apis mellifera mellifera* L. in Urals / R. A. Ilyasov // Apis-UK. - 2005. - No. 38. - P. 1-2.
2. Ильясов, Р. А. Экспериментальные исследования пчел Урала и Поволжья / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Экологический мониторинг и биоразнообразие. - 2009. - Т. 4. - № 1-2. - С. 61-62.
3. Ильясов, Р. А. Сравнительный секвенционный анализ варибельного интрона гена фактора элонгации 1 альфа ядерного генома пчел рода *Apis* / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // В мире научных открытий. - 2010. - Т. 3. - № 9. - С. 33-35.
4. Ильясов, Р. А. Молекулярная характеристика населения медоносной пчелы центральной части республики Башкортостан на основе анализа микросателлитных локусов / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Экологический мониторинг и биоразнообразие. - 2010. - Т. 5. - № 1. - С. 65-68.
5. Ильясов, Р. А. Генетический и фенотипический анализ генофонда популяции *Apis mellifera* L. в Кировской области / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко, А. З. Брандорф, М. М. Ивойлова // Биомика. - 2012. - Т. 1. - № 1. - С. 47-49.

6. Ilyasov, R. A. Influence of acaricides amitraz and fluvalinate on average daily egg and total honey productivity of honey bee colonies / R. A. Ilyasov, R. G. Farkhutdinov, Z. V. Shareeva // *Biomics*. - 2014. - V. 6. - No. 2. - P. 73-76.
7. Ilyasov, R. A. Burzyan wild-hive honeybee *A. m. mellifera* in South Ural / R. A. Ilyasov, M. N. Kosarev, A. Neal, F. G. Yumaguzhin // *Biomics*. - 2014. - V. 6. - No. 4. - P. 196-201.
8. Ильясов, Р. А. Биология, распространение и профилактика микроспоридий рода *Nosema*, паразитирующих на медоносной пчеле / Р. А. Ильясов, Л. Р. Гайфуллина, Е. С. Салтыкова, А. Г. Николенко // *Биомика*. - 2014. - Т. 6. - № 3. - С. 145-154.
9. Ильясов, Р. А. Бурзянская бортевая пчела *A. m. mellifera* на Южном Урале / Р. А. Ильясов, М. Н. Косарев, Ф. Г. Юмагузин // *Биомика*. - 2014. - Т. 6. - № 4. - С. 190-195.
10. Ильясов, Р. А. Популяция *Apis cerana* на Дальнем Востоке России / Р. А. Ильясов, М. Ю. Прощалыкин, А. В. Поскряков, А. С. Лелей, А. Г. Николенко // *Биомика*. - 2014. - Т. 6. - № 3. - С. 139-144.
11. Фархутдинов, Р. Г. Биологический стимулятор продуктивности пчелиной семьи с фунгицидной активностью / Р. Г. Фархутдинов, Р. А. Ильясов, Ф. Г. Юмагузин, Ю. В. Туктарова, В. М. Шафикова, М. Ф. Абдуллин // *Биомика*. - 2014. - Т. 6. - № 2. - С. 68-72.
12. Ilyasov, R. A. Burzyan wild-hive honeybee *A. m. mellifera* in South Ural / R. A. Ilyasov, M. N. Kosarev, A. Neal, F. G. Yumaguzhin // *The Beekeepers Quarterly*. - 2015. - V. 119. - P. 25-33.
13. Ilyasov, R. A. Burzyan bees in South Ural / R. A. Ilyasov, M. N. Kosarev, A. Neal, F. G. Yumaguzhin // *Bees for Development Journal*. - 2015. - V. 114. - P. 11-17.
14. Ilyasov, R. A. Dunkle bienen im sudlichen Ural / R. A. Ilyasov, M. N. Kosarev, A. Neal, F. G. Yumaguzhin // *Deutsches Bienen Journal*. - 2015. - V. 9. - P. 48-51.
15. Ilyasov, R. A. Burzyan wild-hive honeybee *A. m. mellifera* in South Ural / R. A. Ilyasov, M. N. Kosarev, A. Neal, F. G. Yumaguzhin // *Bee World*. - 2015. - V. 92. - No. 1. - P. 7-11.
16. Ilyasov, R. A. Nucleotide polymorphism of the gene *VG* of honey bees / R. A. Ilyasov, A. V. Poskryakov, A. G. Nikolenko // *Biomics*. - 2015. - V. 7. - No. 1. - P. 54-61.
17. Ilyasov, R. A. Wild dark honey bees of the Urals / R. A. Ilyasov, M. N. Kosarev, A. Neal, F. G. Yumaguzhin // *The Four Seasons*. - 2015. - V. 55. - P. 27-33.
18. Ильясов, Р. А. Анализ состояния генофонда современной популяции темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. В. Петухов, А. Г. Николенко // *Биомика*. - 2015. - Т. 7. - № 3. - С. 167-191.
19. Ильясов, Р. А. Анализ информативности митохондриальных генов в филогенетических исследованиях медоносной пчелы *Apis mellifera* / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // *Биомика*. - 2015. - Т. 7. - № 3. - С. 192-205.

20. Ильясов, Р. А. Новый подход к оценке генетического потенциала семей темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* на основе полиморфизма микросателлитных локусов / Р. А. Ильясов, М. Н. Косарев, А. В. Поскряков, А. Я. Шарипов, А. Г. Николенко // Биомика. - 2015. - Т. 7. - № 2. - С. 138-152.
21. Ильясов, Р. А. Состояние и сохранение темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* в России и странах Европы / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Биомика. - 2015. - Т. 7. - № 2. - С. 121-127.
22. Ильясов, Р. А. Современная популяция бурзянской бортовой темной лесной пчелы на Южном Урале / Р. А. Ильясов, М. Н. Косарев, Ф. Г. Юмагужин // Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. Республики Башкортостан. - Уфа: Гилем, Башкирская энциклопедия, 2015. - С. 27-33.
23. Ильясов, Р. А. Генетическая структура северной башкирской популяции темной лесной пчелы / Р. А. Ильясов, З. В. Шареева, А. Г. Николенко // Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. Республики Башкортостан. - Уфа: Гилем, Башкирская энциклопедия, 2015. - С. 243-255.
24. Ильясов, Р. А. Генетическая дифференциация уральской популяции темной лесной пчелы / Р. А. Ильясов, П. А. В. Поскряков А. В., А. Г. Николенко // Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. Республики Башкортостан. - Уфа: Гилем, Башкирская энциклопедия, 2015. - С. 255-265.
25. Ильясов, Р. А. Диагностика темной лесной пчелы башкирской популяции на основе полиморфизма гена вителлогенина VG / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, Е. С. Салтыкова, А. Г. Николенко // Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. Республики Башкортостан. - Уфа: Гилем, Башкирская энциклопедия, 2015. - С. 265-274.
26. Николенко, А. Г. Ареал бурзянской популяции темной лесной пчелы / А. Г. Николенко, Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков // Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. Республики Башкортостан. - Уфа: Гилем, Башкирская энциклопедия, 2015. - С. 218-227.
27. Фархутдинов, Р. Г. Применение фитосбора для лечения аскосфероза темной лесной пчелы башкирской популяции / Р. Г. Фархутдинов, Р. А. Ильясов, Ф. Г. Юмагужин, Н. А. Уразбахтина, Ю. В. Туктарова, В. М. Шафикова, М. Ф. Абдуллин // Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L. Республики Башкортостан. - Уфа: Гилем, Башкирская энциклопедия, 2015. - С. 163-176.
28. Ilyasov, R. A. The genetic structure of dark european honey bee population in the Ural / R. A. Ilyasov, A. V. Poskryakov, A. G. Nikolenko // Honeybees: biology, behavior and benefits. - Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, 2016. - P. 1-13.
29. Ilyasov, R. A. Herbal dietary supplement with antifungal effect for increasing the productivity of honey bee colonies / R. A. Ilyasov, R. G. Farkhutdinov // Honeybees: biology, behavior and benefits. - Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, 2016. - P. 15-22.
30. Ильясов, Р. А. Организация генома медоносной пчелы *Apis mellifera* / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Биомика. - 2016. - Т. 8. - № 2. - С. 97-99.

31. Каскинова, М. Д. Генетические показатели бурзянской популяции *Apis mellifera mellifera* L. / М. Д. Каскинова, Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, М. Н. Косарев, А. Я. Шарипов, А. Г. Николенко // Биомика. - 2016. - Т. 8. - № 2. - С. 117-124.

32. Ильясов, Р. А. Генетическая структура популяции темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья / Р. А. Ильясов, А. В. Поскряков, А. Г. Николенко // Роль генетического ресурса медоносных пчел среднерусской породы в продовольственной и экологической безопасности России. - Киров: НИИСХ Северо-Востока, 2016. - С. 99-102.

Патенты

1. Фархутдинов, Р. Г. Состав для стимуляции развития пчелиных семей, профилактики и лечения аскосфероза / Р. Г. Фархутдинов, Р. А. Ильясов, А. А. Иванов, В. М. Шафикова, Ю. В. Туктарова, Ю. П. Воронков // Патент России. - 2015. - № RU 2552672. - Бюл. № 16.

