

Оценка генетического потенциала семей ТЁМНОЙ ЛЕСНОЙ ПЧЕЛЫ

За последние 100 лет массовые перевозки пчел *Apis mellifera ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. carpatica*, *A. m. caucasica*, *A. m. scrotopia* (подвиды эволюционной ветви С) из Восточной и Южной Европы на север и запад континента практически полностью уничтожили генофонд популяции темной лесной пчелы. Сегодня *A. m. mellifera* (представитель эволюционной ветви М) признана подвидом, находящимся под угрозой вымирания.

Однако в Европе еще сохранились небольшие изоляты этой пчелы с разной степенью интрогрессии южных генов. В популяциях *A. m. mellifera* в Восточной Польше интрогрессия аллелей южных подвидов составляет 30% (A.Oleksa et al., 2011), в популяциях северного экотипа «Brown» в Скандинавских странах — до 10% (A.V.Jensen et al., 2005), в популяциях альпийского экотипа «Nigra» — до 70% (G.Soland-Reckeweg et al., 2009), в популяциях экотипа «Landes» во Франции — до 20% (J.P.Strange et al., 2008). На основе анализа полиморфизма локуса COI-COII мтДНК было выявлено до 2% интрогрессии в популяции экотипа темной лесной пчелы «Бурзянский» в Республике Башкортостан. Уровень интрогрессии южных генов в данной популяции по ядерному геному ранее не оценивали [4, 5].

При бесконтрольных перемещениях пчел из южных регионов на север ареала *A. m. mellifera* интрогрессия генов завезенных особей в ее аборигенный генофонд происходит в результате миграции трутней. Это приводит к постепенной утрате местной пчелой адаптированности к локальным условиям среды, формировавшейся в течение длительной эволюции [3]. Риск дальнейшего загрязнения аборигенного генофонда темной лесной пчелы постоянно растет как в России, так и в Европе из-за интенсификации сельского хозяйства и отсутствия эффективного законодательного регулирования в пчеловодстве. Это касается и популяции экотипа «Бурзянский» [1, 4, 5].

Для успешного сохранения популяции *A. m. mellifera* необходима генетическая

стандартизация, чтобы идентифицировать семьи с минимальным уровнем интрогрессии генов южных подвидов и оптимальным генетическим разнообразием.

Оценка генетического разнообразия имеет важное значение при разработке стратегий сохранения и рационального использования генофонда медоносной пчелы. Основу генетического разнообразия составляет гетерозиготность, поэтому оценка величины средней гетерозиготности по всем локусам и будет характеризовать уровень генетического разнообразия популяции. Поскольку адаптированность пчелиной семьи обеспечивает деятельность нескольких тысяч рабочих особей, то оценка средней гетерозиготности и величины интрогрессии южных генов в выборке рабочих пчел станет характеризовать ее генетический потенциал. Оценка генетических характеристик темной лесной пчелы и генетическую стандартизацию на уровне отдельно взятой семьи ранее нигде не проводили.

Цель наших исследований — генетическая стандартизация пчелиных семей темной лесной пчелы и идентификация семей с лучшим генетическим потенциалом на основе полиморфизма локуса COI-COII мтДНК и девяти микросателлитных локусов.

Исследования проводили в 2015 г. Использовали 12 семей темной лесной пчелы из Бурзянского района Республики Башкортостан и 3 семьи серой горной кавказской породы из Сочинского района Краснодарского края. Для анализа генетического разнообразия и уровня интрогрессии южных генов от каждой семьи отбирали четырех живых рабочих пчел, фиксировали их в 96%-ном этаноле и хранили до выделения ДНК при -10°C . Всего проанализировано 60 образцов из 15 семей.

ДНК из мышц торакса (груди) рабочих пчел выделяли набором ДНК-ЭКСТРАН-2 по протоколу СИНТОЛ (Москва) (www.syntol.ru). Качество и количество выделенной ДНК анализировали на спектрофотометре «NanoDrop 1000» (Thermo, США).

Аmplификацию выполняли в термоциклере BIO-RAD T100 (США) в 15 мкл общего объема смеси по протоколу СИЛЕКС (Москва) (www.sileks.com/ru/). Температура отжига для микросателлитных локусов ар243, 4а110, а24, а8, а43, а113, а88, ар049, а28 — 55°C (Estoup et al., 1995; Haberl, Tautz, 1999; Solignac et al., 2003), для локуса COI-COII мтДНК — 48°C (Garnerly et al., 1993). Фрагментарный анализ продуктов ПЦР провели на автоматическом секвенаторе «Applied Biosystem Sequencer» (США).

По микросателлитным локусам наблюдали следующие аллели: по локусу ар243 — 3 (254, 257 и 260 п.н.); по 4а110 — 3 (160, 163 и 168 п.н.); по а24 — 3 (98, 106 и 108 п.н.); по а8 — 5 (154, 156, 158, 164 и 173 п.н.); по а43 — 4 (128, 134, 140 и 142 п.н.); по а113 — 6 (216, 218, 220, 222, 228 и 234 п.н.); по а88 — 5 (143, 146, 148, 152 и 155 п.н.); по ар049 — 4 (123, 129, 130 и 142 п.н.); по локусу а28 — 3 (134, 140 и 144 п.н.).

По межгенному локусу COI-COII мтДНК определили следующие фрагменты: PQQ — 825 п.н., характеризующие пчел, происходящих по материнской линии от *A. m. mellifera*, и Q — 644 п.н., характеризующие пчел, происходящих по материнской линии от *A. m. caucasica*, *A. m. carnica*, *A. m. carpatica*, *A. m. ligustica* (Garnerly et al., 1993).

Продукты амплификации разделяли в 8% ПААГ при силе тока 40 мА, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в геледокументирующей системе DocPrint Vilber Lourmat (Франция). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ FSTAT 2.9.3.2, GENEPOR 4.2.2, POPULATIONS 1.2.28, STRUCTURE 2.3.4, STATISTICA 8.0, MICROSOFT EXCEL 2010.

Первый этап исследований был направлен на получение данных полиморфизма локусов ядерной и митохондриальной ДНК. У 60 рабочих особей, отобранных в семьях, проанализированы морфы локуса COI-COII мтДНК и микросателлитных локусов ар243, 4а110, А24, А8, А43, А113, А88, Ар049, А28 (табл.). Второй этап — анализ полученных данных с помощью статистических методов и интерпретация результатов.

Изучена частота встречаемости вариантов Q и PQQ межгенного локуса COI-COII мтДНК в выбранных пчелиных семьях. В бурзянской популяции особи всех семей оказались носителями варианта PQQ, а все семьи сочинской популяции характеризовались вариантом Q локуса COI-COII мтДНК.

Для получения генетических характеристик и оценки генетического потенциала пчелиных

семей необходимо проанализировать локусы ядерной ДНК. Матка оплодотворяется 15–20 неродственными трутнями, которые вносят генетическое разнообразие в популяцию рабочих особей семьи (Baudry et al., 1998; Oxley et al., 2010; Harpur et al., 2012). В одной семье одновременно может присутствовать потомство разных трутней. Проанализировав микросателлитные локусы ар243, 4а110, А24, А8, А43, А113, А88, Ар049, А28 ядерной ДНК, мы рассчитали среднюю гетерозиготность пчелиных семей (см. табл.).

Для популяции пчел характерен собственный оптимальный уровень генетического разнообразия. Его дефицит приводит к потере экологической пластичности и адаптированности популяции к окружающей среде, а избыток — к утрате сбалансированности генома. Уровень средней гетерозиготности среди семей бурзянской популяции варьировал от 0,12 до 0,40, среди семей сочинской популяции — от 0,11 до 0,23.

К сожалению, в литературе нет данных оценки уровня средней гетерозиготности пчелиной семьи, которые можно было бы использовать для сравнения. Все исследования гетерозиготности пчел проводили на уровне популяций. Так, средняя гетерозиготность, рассчитанная на основе полиморфизма микросателлитных локусов В124, А113, А7, А24, А28, А8, в популяциях *A. m. iberiensis* в Испании варьировала от 0,43 до 0,47 (De la Rúa et al., 2004); *A. m. ligustica* в Португалии (эти же локу-

Средняя гетерозиготность и уровень интрогрессии генов в пчелиных семьях, рассчитанные на основе анализа полиморфизма (n = 4)

| Пасека, № семьи | Ветвь М, % | Ветвь С, % | Средняя гетерозиготность |
|-------------------|------------|------------|--------------------------|
| Борть 1 | 100 | 0 | 0,23 |
| Борть 2 | 100 | 0 | 0,25 |
| Борть 3 | 100 | 0 | 0,21 |
| Куш-Елга-Баш 7 | 100 | 0 | 0,40 |
| Куш-Елга-Баш 25* | 99,5 | 0,5 | 0,25 |
| Куш-Елга-Баш 29* | 99 | 1 | 0,21 |
| Капова Пещера 15* | 99 | 1 | 0,25 |
| Капова Пещера 24 | 100 | 0 | 0,21 |
| Капова Пещера 31* | 98 | 2 | 0,35 |
| Байсаян 1 | 100 | 0 | 0,20 |
| Байсаян 13 | 100 | 0 | 0,12 |
| Байсаян 14* | 99,5 | 0,5 | 0,30 |
| Красная Поляна 1 | 0 | 100 | 0,11 |
| Красная Поляна 2 | 0 | 100 | 0,15 |
| Красная Поляна 3 | 0 | 100 | 0,23 |

* Семьи с незначительной интрогрессией генов пчел южного происхождения.

сы) — от 0,22 до 0,29 (De la Rúa et al., 2006); в популяциях *A. m. carnica* в Швейцарии (локусы A007, A28, A43, Ac306, Ap33, Ap273, Ap226, Ap289, B24) — от 0,34 до 0,57, *A. m. mellifera* в Швейцарии, Норвегии и Франции — от 0,37 до 0,58 (Soland-Reckeweg et al., 2009); *A. m. mellifera* в Польше (локусы A7, A24, A28, A88, A113, Ap43, Ap55, Ap66, Ap81) — от 0,49 до 0,64 (Oleksa et al., 2011); *A. m. mellifera* в Республике Башкортостан (локусы ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28) — от 0,32 до 0,41 [2].

Таким образом, уровень гетерозиготности семей темной лесной пчелы Бурзянского района и других популяций *A. m. mellifera* и *A. m. iberiensis* (эволюционная ветвь М), а также *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* и *A. m. carnica* (эволюционная ветвь С) примерно сходен с уровнем гетерозиготности популяций, хотя в отдельных семьях он заметно ниже (см. табл.).

Вероятно, среднюю гетерозиготность семьи темной лесной пчелы (0,21–0,23) можно принять за оптимальную для популяций пчел Урала и Поволжья. Возможно, ее величина зависит от уровня интрогрессии южных генов в семьях бурзянской популяции. Если это так, то высокой гетерозиготностью будут характеризоваться семьи со следами интрогрессии.

Для оценки генетических взаимоотношений пчелиных семей мы рассчитали генетические дистанции M.Nei (1978) между всеми 15 семьями на основе данных полиморфизма микросателлитных локусов ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28. По полученным значениям построили дендрограмму методом кластеризации ближайшего соседа (Neighbour joining — NJ), отражающую генетические взаимоотношения этих семей (рис. 1). Они распределились по двум крупным кластерам: семьи южного (сочинская популяция) и северного (бурзянская популяция) происхождения.

Внутри кластера бурзянской популяции наблюдается дифференциация на группы, которая характеризует ее генетическую подразделенность. В первую группу объединились все семьи бортевых пчел, семья № 7 (Куш-Елга-Баш) и семьи № 1 и № 13 (Байсаян). Возможно, в недавнем прошлом их предками были бортевые пчелы или они сформировались под влиянием потока генов через трутней бортевых пчел. Во вторую группу вошли семьи № 25 и № 29 (Куш-Елга-Баш), семья № 24 (Капова Пещера) и семья № 14 (Байсаян), в третью группу — семьи № 15 и № 31 (Капова Пещера). Скорее всего, такая кластеризация семей бурзянской популяции

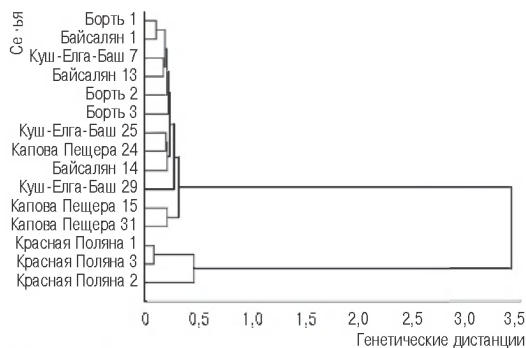


Рис. 1. Дендрограмма генетических взаимоотношений пчелиных семей

обусловлена влиянием следов интрогрессии южных генов в некоторых из них, сближающих между собой семьи со сходными уровнями интрогрессии.

Самая важная и интересная оценка при генотипировании пчелиных семей — оценка уровня интрогрессии южных генов в геноме темной лесной пчелы, поскольку результаты этого анализа позволяют принимать решение о направленности селекции. Понятия «гибридизация» и «интрогрессия» хоть и сходны между собой, но все же отличаются. При гибридизации просто происходит объединение отцовского и материнского геномов разных подвидов в одном генотипе гибридного потомства, то есть гомологичные хромосомы будут от разных родителей. В случае интрогрессии смешивание генома происходит на более глубоком уровне и в геноме темной лесной пчелы гены интегрируются не в виде гомологичных хромосом, а в виде вставок участков хромосом в результате кроссинговера (рис. 2).

Поэтому интрогрессия представляет для генома темной лесной пчелы большую опасность, поскольку избавиться от внедрившихся во все хромосомы чужеродных фрагментов ДНК очень сложно. Интрогрессия происходит только на уровне ядерного генома, в то время как митохондриальный геном (16 тыс. п.н.) наследуется потомством в чистом виде по материнской линии и в анализе уровня интрогрессии является неинформативным. Редкое исключение — гетероплазмия: когда зигота может сформироваться при участии материнского и отцовского митохондриальных геномов, иногда передающихся сперматозоидами от трутней [6].

Уровень интрогрессии южных генов в семьях бурзянской популяции мы оценивали на основе данных по полиморфизму микросателлитных локусов ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28 с использованием програм-



мы STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). На основе Байесовского анализа (Bayesian analysis) с применением метода кластеризации Монте-Карло с цепями Маркова (Monte Carlo Markov Chain — MCMC) (Pritchard et al., 2000) при заданном числе кластеров $K=2$ с использованием модели смешивания (Admixture model) и повторности MCMC (iteration) 5000 рассчитали значения интрогрессии генов эволюционной ветви С (*A. m. caucasica*) в семьях эволюционной ветви М (*A. m. mellifera*). Согласно полученным значениям построили гистограмму (plot), отражающую уровень интрогрессии для каждой особи из каждой отобранной семьи.

В семьях № 25 и № 29 (Куш-Елга-Баш), № 15 и № 31 (Капова Пещера), № 14 (Байсаян) отмечены следы интрогрессии южных генов (0,5–2%). Семьи сочинской популяции, взятые для сравнения, не имели признаков интрогрессии северных генов.

Таким образом, по митохондриальному гену по полиморфизму локуса COI-COII семьи бурзянской популяции охарактеризованы как 100%-ные *A. m. mellifera*, а семьи сочинской популяции — как 100%-ные *A. m. caucasica*. По ядерному геному такого однозначного разделения по породам нет. Конечно, интрогрессией в 2% можно пренебречь и охарактеризовать эти семьи как *A. m. mellifera*, округлив 98 до 100%. Однако в селекции так поступать не следует, поскольку при отсутствии селекционного контроля содержание южных генов будет расти и накапливаться. При встрече двух геномов со следами интрогрессии южных генов их потомство может содержать суммарный уровень интрогрессии родительских геномов. Наличие следов ин-

трогрессии только у части рабочих особей свидетельствует о том, что в бурзянской популяции изоляция не идеальная, поток генов извне все же происходит, и вероятнее всего в результате залета чужих трутней.

Мы отметили, что в пяти семьях одна—две особи из четырех несут следы интрогрессии южных генов — это 25–50% состава семьи на данный период. Соотношение рабочих пчел, несущих следы интрогрессии южных генов, и чистых может незначительно варьировать из года в год. Эти временные изменения в составе семьи будут очень незначительными, поскольку матка равномерно выводит потомство от 15–20 трутней. Поэтому вполне достаточно однократно оценить уровень интрогрессии южных генов в семье.

Вероятно, на дендрограмме вторая и третья группы были сформированы семьями со следами интрогрессии южных генов. Во вторую группу попала семья № 24 (Капова Пещера), которая не содержала следы интрогрессии и состояла в генетической близости с семьей № 14 (Байсаян) с 0,5% интрогрессии южных генов. Это можно объяснить тем, что данные пчелиные семьи — потомки преимущественно близкородственных трутней. Кластерный анализ на основе генетических дистанций не смог дифференцировать семью № 14 со следами интрогрессии от семьи № 24, не имеющей признаков интрогрессии. Возможно, величина интрогрессии южных генов в 0,5% столь мала, что практически не оказала влияния на оценку генетической дистанции.

Почти все семьи с наибольшими значениями средней гетерозиготности (от 0,25 до 0,40) характеризовались следами интрогрессии южных генов. Исключение составили семья № 7 (Куш-Елга-Баш) — 0,40 и № 2 (бортевые пчелы) — 0,25. Практически все семьи со средним значением гетерозиготности (0,21–0,23) не имели интрогрессии южных генов, исключение — семья № 29 (Куш-Елга-Баш) — 1%. Все семьи с наименьшим уровнем средней гетерозиготности (0,11–0,20) не содержали интрогрессии чужеродных генов.

Итак, оптимальный генетический потенциал свойствен семьям со средним и наибольшим уровнями средней гетерозиготности при отсутствии интрогрессии южных генов. В данном случае оптимальными для селекции оказались

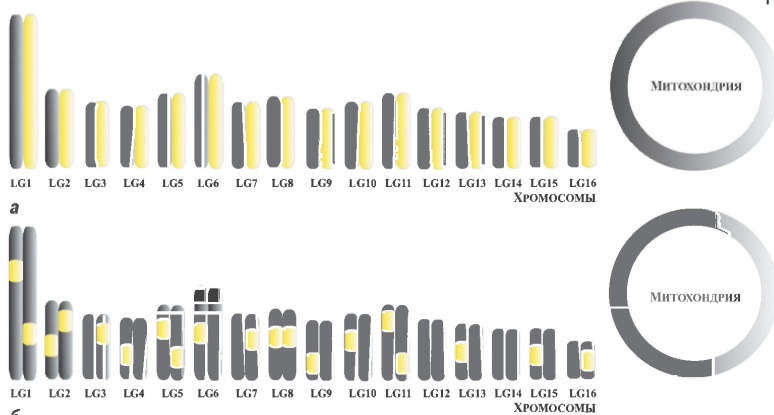


Рис. 2. Гибридизация (а) и интрогрессия (б) генов южных подвидов в ядерный геном темной лесной пчелы (236 млн п.н.). Темным цветом указаны фрагменты генома темной лесной пчелы, светлым — южных подвидов

семьи № 7 (Куш-Елга-Баш), № 24 (Капова Пещера) и три бортевые семьи.

Вероятно, обитание пчел в бортях в условиях дикой природы способствует сохранению семей *A. m. mellifera* с оптимальным генетическим потенциалом. Поэтому чрезвычайно важно сохранять бурзянскую популяцию темной лесной пчелы в Государственном природном биосферном заповеднике «Шульган-Таш», Природном заказнике «Алтын Солок» и Национальном парке «Башкирия».

В.А.Narpur et al. (2012) и В.А.Narpur et al. (2013) на основе сравнительного анализа нуклеотидной последовательности участка ядерной ДНК размером 16.5 Kb, включающего 20 генов и 358 сайтов SNP у пчел из 96 семей африканской, европейской и североамериканской популяций, экспериментально доказали, что в диких популяциях медоносной пчелы уровень генетического разнообразия выше по сравнению с семьями на пасеках. Они предполагают, что при пасечном разведении под давлением искусственного отбора генетическое разнообразие в семьях постоянно снижается. Таким образом, генетическое разнообразие может самостоятельно сохраняться в популяциях бортевых пчел в дикой природе. А.Oleksa et al. (2013) на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов A113, A24, A7, A88, Ap28, Ap43, Ap55, Ap66, A025, Ac011, Ap090, Ap103, Ap226, Ap238, Ap243, Ap249, Ap256 показали, что в Восточной Польше матки темной лесной пчелы без интрогрессии южных генов преимущественно скрещиваются с трутнями этой пчелы без интрогрессии. Они пришли к выводу, что темная лесная пчела обладает свойством частичной репродуктивной изоляции от других подвидов. Это позволяет надеяться, что на территории Бурзянского района в условиях окружающей популяциями гибридного происхождения чистота генофонда темной лесной бортевой пчелы сохранится.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 13-04-01802 А и 14-04-97084 р_поволжье_а на оборудовании ЦКП «Биомика» отделения биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель» и УСУ «КОДИНК» (Комплекс оборудования для исследования нуклеиновых кислот).

**Р.А.ИЛЬЯСОВ, М.Н.КОСАРЕВ,
А.В.ПОСКРЯКОВ, А.Я.ШАРИПОВ, А.Г.НИКОЛЕНКО**

По результатам анализа уровня интрогрессии и оценки уровня средней гетерозиготности, определенного по данным полиморфизма девяти микросателлитных локусов, показана возможность выявления пчелиных семей с оптимальным генетическим потенциалом. Генетический потенциал пчел, обитающих в естественных и искусственных дуплах (бортях и колодах) в дикой природе, поддерживается эффективнее по сравнению с семьями, разводимыми на пасеках.

Ключевые слова: *Apis mellifera mellifera*, темная бортевая лесная пчела, бурзянский экотип темной лесной пчелы, генетическое разнообразие семьи пчел, интрогрессия южных генов, оптимальный генетический потенциал семьи пчел, сохранение генетического разнообразия, гибридизация подвидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ильясов Р.А., Косарев М.Н., Юмагузин Ф.Г. Бурзянская бортевая пчела и бортевое пчеловодство на Южном Урале // Пчеловодство. — 2015. — №7.
2. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Генетическая дифференциация локальных популяций темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // Генетика. — 2015. — Т. 51. — №7.
3. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Новые SNP маркеры в гене вителлогенина Vg медоносной пчелы для идентификации *Apis mellifera mellifera* L. // Генетика. — 2015 — Т. 51. — №2.
4. Ильясов Р.А., Петухов А.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Локальные популяции *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // Генетика. — 2007. — Т. 43. — №6.
5. Николенко А.Г., Поскряков А.В. Полиморфизм локуса COI-COII митохондриальной ДНК *Apis mellifera* L. на Южном Урале // Генетика. — 2002. — Т. 38. — №4.
6. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В. и др. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала // Генетика. — 1998. — Т. 34. — №11.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ: Ильясов Рустем Абузарович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории биохимии адаптивности насекомых Уфимского научного центра РАН, тел. (347) 235-60-88, e-mail: apismell@hotmail.com; Поскряков Александр Витальевич, канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории биохимии адаптивности насекомых Уфимского научного центра РАН, тел. (347) 235-60-88, e-mail: possash@yandex.ru; Шарипов Аглям Якубович, канд. биол. наук, зам. директора по пчеловодству Государственного природного биосферного заповедника «Шульган-Таш», тел. (34755)3-37-10, e-mail: asharipov63@mail.ru; Косарев Михаил Николаевич, канд. с.-х. наук, директор Государственного природного биосферного заповедника «Шульган-Таш», тел. (34755)3-37-10, e-mail: mnkos@mail.ru; Николенко Алексей Геннадьевич, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии адаптивности насекомых Уфимского научного центра РАН, тел. (347) 235-60-88, e-mail: a-nikolenko@yandex.ru.

THE ASSESSMENT OF GENETIC POTENTIAL OF COLONIES OF DARK EUROPEAN BEES

R.A.Ilyasov, M.N.Kosarev,

A.V.Poskryakov, A.Y.Sharipov, A.G.Nikolenko

We have shown the ability to identify bee colonies with the best genetic potential. We found that the genetic potential of bee colonies, nesting in in natural and artificial tree trunks (bort and koloda) and inhabiting in the wild nature, maintain more effective than colonies in commercial beehives on apiaries using the analysis of the level of introgression of southern genes and assess the level of average heterozygosity according based on polymorphism of 9 microsatellite loci.

Keywords: *Apis mellifera mellifera*, dark European bee, tree hollow nesting dark bee, Burzian ecotype of European bee, genetic diversity of bee colonies, the introgression of southern genes, the optimal genetic potential of bee colonies, the preservation of the genetic diversity, hybridization of subspecies.