

УДК 638.12:631.523.5

СЕЛЕКЦИЯ НА ОСНОВЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

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 [11]. Экосистемы северных регионов России, Урала и Поволжья особенно сильно зависят от опылительной деятельности пчел. Пчела подвида *A. m. mellifera*, называемая темной лесной пчелой, — абориген этого региона, максимально приспособлена к местным условиям и экономически выгодна для разведения здесь. 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 [14]. Отсюда идентификация сохранившихся популяций и селекция семей темной лесной пчелы в условиях массовой гибридизации и повышенной смертности становятся актуальны [3].

Представляющая большой интерес для пчеловодства темная лесная пчела на территории Урала и Поволжья изучена лишь частично морфометрическими и молекулярно-генетическими методами. Морфометрические методы позволяют предполагать сохранность популяций этой пчелы в регионе. Для точной оценки пчелы Урала и Поволжья необходимо провести молекулярно-генетические исследования с использованием микросателлитных маркеров ядерной ДНК. Микросателлитные локусы — современные уникальные информативные ядерные маркеры, позволяющие выявлять популяционно-генетическую структуру, генетическое разнообразие и уровень интрогрессии подвидов пчел в популяции [8].

Поддержание генетического разнообразия — основа сохранения генофонда темной лесной пчелы [12]. Таксономическое разнообразие пчел в Европе — важнейший компонент общего генетического разнообразия вида *Apis mellifera*. Генетическое разнообразие — материал для естественного и искусственного отбора и показатель сохранения генетически стабильной высокой продуктивности.

В популяционно-генетических исследованиях медоносной пчелы микросателлитные локусы приобретают все большую популярность. В России на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов получены генетические характеристики популяций пчел Республики Башкортостан и Пермского края [2, 3], республик Татарстан и Адыгея, Красноярского края, Архангельской и Новосибирской областей [1, 7], Краснодарского края [4, 5], Томской области [6].

В России еще не разработаны генетические стандарты для популяции и семьи пчел темной лесной пчелы. В статье представлены генетические характеристики популяции и семьи пчел темной лесной пчелы, полученные на основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов, которые можно принять за генетический стандарт *A. m. mellifera*.

Изучены рабочие особи 3059 семей пчел Урала и Поволжья (темная лесная пчела *A. m. mellifera*) и 64 семей Кавказа и Карпат, привлеченных для сравнения в качестве маркера генофонда популяций южных пчел (*A. m. caucasica*, *A. m. carpatica*, *A. m. carnica*). В Республике Башкортостан изучены пчелы 2309 семей, в Пермском крае — 362 семей, в Республике Удмуртия — 200 семей, в Республике Татарстан — 52 семей, в Кировской области — 64 семей, в Свердловской области — 58 семей, в Республике Чувашия — 14 семей, в Краснодарском крае — 32 се-

мей, в Республике Адыгея — 15 семей, в Закарпатской области Украины — 17 семей.

Для оценки генетических характеристик семей темной лесной пчелы использовали по 4 рабочих особи из 13 семей Бурзянского района Республики Башкортостан.

Рабочих пчел фиксировали в 96%-ном этаноле и хранили при температуре -20°C до выделения ДНК. Извлечение ДНК из мышц торакса рабочих особей пчел 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.

Проводили анализ полиморфизма микросателлитных локусов *AP243*, *4A110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *AP049*, *A28* яДНК. Продукты амплификации при силе тока 40 мА разделяли по размерам в 8% ПААГ, окрашивали бромистым этидием и визуализировали в геледокументирующей 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).

Все генетические характеристики для популяций и семей темной лесной пчелы были получены на основе анализа популяций и семей с минимальным (<5%) уровнем интрогрессии генов южных подвидов. Уровни интрогрессии генов южных подвидов пчел эволюционной ветви С (*A. m. caucasica*) в популяциях и семьях темной лесной пчелы были рассчитаны на основе полиморфизма 9 микросателлитных локусов с использованием программы STRUCTURE 2.3.4.

Статистический анализ полученных результатов полиморфизма ДНК проводили с использованием программ 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.

Данные анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов легли в основу расчетов генетических характеристик популяции и семьи темной лесной пчелы *A. m. mellifera*. Под

генетическими характеристиками понимают такие показатели, как гетерозиготность (наблюдаемая — H_o , ожидаемая — H_s также обозначается как H_e , общая ожидаемая — H_t), коэффициенты инбридинга (субпопуляционный — F_{is} , общий — F_{it}) и коэффициент генетической подразделенности F_{st} . Гетерозиготность показывает долю особей в популяции, гетерозиготных по изучаемым локусам. Для популяции каждого вида существует оптимальный уровень гетерозиготности. Коэффициенты инбридинга показывают вероятность того, что аллели изучаемых локусов идентичны по происхождению. Положительные значения коэффициента инбридинга характеризуют преобладание близкородственного скрещивания в популяции, а отрицательные значения — отдаленного. Коэффициент генетической подразделенности показывает наличие подразделенности на группы. Значение 0 коэффициента генетической подразделенности показывает отсутствие генетических структур в популяции, а значение 1 — наличие структур, не имеющих между собой родства.

На основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов яДНК рассчитали следующие генетические характеристики 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*.

Значения гетерозиготности в популяциях местных пчел Урала и Поволжья были сходны с европейскими популяциями пчел подвиды *A. m. mellifera* эволюционной ветви М [13], и выше по сравнению с локальными популяциями пчел южных подвидов с Кавказа и Карпат. Гетерозиготность в популяциях чистопородной темной лесной пчелы оказалась ниже ($H_o=0,24$, $H_s=0,23$, $H_t=0,28$), чем в популяциях гибридного происхождения ($H_o=0,35$, $H_s=0,36$, $H_t=0,40$). Такие же низкие значения гетерозиготности характерны для чистопородных популяций пчел южных подвидов с Кавказа и Карпат ($H_o=0,21$, $H_s=0,21$, $H_t=0,26$). Следовательно, значения гетерозиготности менее 0,3 характерны в основном для интактных чистопородных популяций пчел, тогда как процесс гибридизации в результате интродукции пчел из других популяций приводит к росту этого значения. Коэффициенты инбридинга в локальных популяциях местных пчел Урала и Поволжья сходны с европейскими популяциями пчел



подвида *A. m. mellifera* эволюционной ветви М [9, 13] и ниже по сравнению с локальными популяциями пчел южных подвидов с Кавказа и Карпат. Значения коэффициентов инбридинга в популяции темной лесной пчелы были ниже ($F_{is}=0,06$, $F_{it}=0,14$), чем в популяциях гибридного происхождения ($F_{is}=0,08$, $F_{it}=0,15$). Значение коэффициента подразделенности в популяции темной лесной пчелы ($F_{st}=0,17$) было выше, чем в популяциях гибридного происхождения ($F_{st}=0,11$). Более высокие значения коэффициентов инбридинга ($F_{is}=0,13$, $F_{it}=0,29$), а также коэффициента подразделенности ($F_{st}=0,23$) отмечаются для чистопородных популяций пчел южных подвидов. Таким образом, чистопородные популяции темной лесной пчелы характеризуются незначительным отклонением распределения генотипов от равновесного распределения по Харди-Вайнбергу, высокими уровнями генетической подразделенности.

Сходство генетических характеристик популяций пчел Урала и Поволжья с европейскими популяциями *A. m. mellifera* эволюционной ветви М свидетельствует об одинаковости протекающих в них микроэволюционных процессов и подтверждает гипотезу о единстве их происхождения. Небольшие различия генетических показателей между разными локальными популяциями вызваны микроклиматическими факторами и особенностями разведения пчел. Сильные отклонения генетических показателей от стандартных значений, вероятно, вызваны процессами гибридизации с южными подвидами пчел эволюционной ветви С.

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} . Возможно, что в условиях длительной изоляции в горно-лесной зоне бурзянского района эволюция семей темной лесной пчелы привела к установлению оптимального уровня генетического разнообразия, обеспечивающего максимальную приспособленность к условиям среды обитания. Более высокие значения гетерозигот-

ности наблюдались в семьях с интрогрессией «южных» генов ($H_o=0,30$, $H_s=0,21$, $H_t=0,20$). Следовательно, более высокий уровень гетерозиготности в семьях темной лесной пчелы, возможно, является результатом интрогрессии «южных» генов. 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 ($F_{is}=-0,45$, $F_{it}=-0,56$, $F_{st}=-0,07$). 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 оптимального уровня генетических характеристик. Вероятно, что интрогрессия «южных» генов приводит к значительному отклонению генотипов от равновесного распределения и снижает генетическую подразделенность.

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 $F_{st} \geq 0,11$. Качество селекционного 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*.

Данный подход селективного предпочтения заключается в отборе максимально чистопородных семей темной лесной пчелы с оптимальным уровнем гетерозиготности, минимальным уровнем отклонения распределения генотипов от равновесного значения по Харди-Вайнбергу и максимальным уровнем генетической подразделенности. Такие семьи будут формировать популяции пчел с высоким адаптивным потенциалом и стабильностью генофонда во времени.

Генетические стандарты популяции и семьи темной лесной пчелы будут полезны для

последующих популяционных исследований медоносной пчелы в качестве материала для сравнения, а методика селекции семей темной лесной пчелы позволит подойти к пчеловодству и контролю генофонда на молекулярно-генетическом уровне. Такой подход позволит повысить рентабельность отрасли за счет повышения продуктивности и снижения смертности в популяции благодаря селекции семей с оптимальными генетическими характеристиками.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 13-04-01802 и 14-04-97084 п.поволжье.а на оборудовании ЦКП «Биомика» отделения биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель».

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

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук
450054, г. Уфа, пр. Октября, 71
E-mail: apismell@hotmail.com

Проведен молекулярно-генетический анализ популяций и семей темной лесной пчелы *A. m. mellifera* Урала и Поволжья в сравнении с популяциями пчел южных подвигов *A. m. caucasica* и *A. m. carpatica* Кавказа и Карпат на основе полиморфизма 9 микросателлитных локусов ДНК. В статье рассчитаны генетические характеристики 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* и предложена методика селекции семей темной лесной пчелы с интрогрессией «южных» генов не более 5% и генетическими показателями, характерными для чистопородных семей *A. m. mellifera* ($H_o \leq 0,30$, $H_s \leq 0,30$, $H_t \leq 0,30$, $F_{is} \leq 0,45$, $F_{it} \leq 0,55$, $F_{st} \geq 0,11$).

Ключевые слова: темная лесная пчела, сохранение аборигенного генофонда, *Apis mellifera mellifera*, микросателлитные локусы, сохранившиеся популяции, генетический стандарт, гетерозиготность, генетические характеристики, коэффициенты инбридинга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зиновьева Н.А., Кривцов Н.И., Форнара М.С. Микросателлиты как инструмент для оценки динамики аллелофонда при создании приокского типа среднерусской породы медоносной пчелы *Apis mellifera* L. // Сельскохозяйственная биология. — 2011. — № 6.
2. Ильясов Р.А. Полиморфизм *Apis mellifera* L. на Урале: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Уфа, 2006.
3. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николenco А.Г. Генетическая дифференциация локальных популяций темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // Генетика. — 2015. — Т. 51. — № 7.
4. Калаишиков А.Е. Изучение дифференциации отечественных популяций медоносной пчелы *Apis mellifera* и их инфицированности РНК-содержащими вирусами с помощью молекулярно-генетических методов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Дубровицы, 2013.
5. Калаишиков А.Е., Кривцов Н.И., Бородачев А.В. Дифференциация отечественных пород пчел по микросателлитным локусам // Наука Кубани. — 2011. — Т. 4.
6. Островерхова Н.В., Конусова О.Л., Кучер А.Н., Киреева Т.Н., Багиров Р.Т. Характеристика генетического

разнообразия медоносных пчел (*Apis mellifera* L.) Томской популяции по комплексу ДНК-маркеров // Чтения памяти Алексея Ивановича Куренцова. — Владивосток, 2015. — Т. XXVI.

7. Форнара М.С. Характеристика аллелофонда и дифференциация пород и популяций медоносной пчелы с использованием микросателлитов // автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Дубровицы, 2012.
8. Clarke K.E., Rinderer T.E., Franck C., Quezada-Euan J.J.G., Oldroyd B.C. The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time // Evolution. — 2002. — Т. 56. — № 7.
9. Franck C., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M. The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data // Evolution. — 1998. — Т. 52.
10. Nedić N., Francis R.M., Stanisavljević L., al. E. Detecting population admixture in the honey bees of Serbia // Journal of Apicultural Research. — 2014. — Т. 53.
11. Pinto M.A., Munoz I., Chavez-Galarza J., Rua C. D.L. The Atlantic side of the Iberian peninsula: a hot-spot of novel African honey bee maternal diversity // Apidologie. — 2012. — Т. 43.
12. Pinto M.A., Henriques D., Chavez-Galarza J. Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data // J. Apic. Res. — 2014. V. — 53. — №2.
13. Soland-Reckeweg G., Heckel G., Neumann C., Fluri C., Excoffier L. Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera* // Journal of Insect Conservation. — 2009. — Т. 13.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ: Ильясов Рустем Абузарович, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., тел.: (347) 235-60-88, 8-917-461-23-86, e-mail: apismell@hotmail.com; Поскряков Александр Витальевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., тел. (347) 235-60-88. e-mail: possash@yandex.ru; Николenco Алексей Геннадьевич, д-р биол. наук, проф., зав. лабораторией биохимии адаптивности насекомых, тел. (347) 235-60-88, e-mail: a-nikolenko@yandex.ru.

A SELECTION OF THE DARK FOREST BEE

A. M. MELLIFERA COLONIES BASED ON THE GENETIC CHARACTERISTICS

R.A.Ilyasov, A.V.Poskryakov, A.G.Nikolenko

A molecular genetic analysis of populations and colonies of the dark forest bee *A. m. mellifera* from the Urals and the Volga region in comparison with populations of the bees of southern subspecies *A. m. caucasica* and *A. m. carpatica* from the Caucasus and the Carpathians have carried out based on the polymorphism 9 microsatellite loci of the nuclear DNA. The genetic characteristics of the population ($H_o=0,24$, $H_s=0,23$, $H_t=0,28$, $F_{is}=0,06$, $F_{it}=0,14$, $F_{st}=0,17$) and the colony ($H_o=0,20$, $H_s=0,16$, $H_t=0,15$, $F_{is}=0,23$, $F_{it}=0,35$, $F_{st}=0,11$) of the dark forest bee *A. m. mellifera* were calculated and the method of selection of the dark forest bee colonies with introgression of "southern" less than 5% and genetic characteristic of thoroughbred colonies *A. m. mellifera* ($H_o \leq 0,30$, $H_s \leq 0,30$, $H_t \leq 0,30$, $F_{is} \leq 0,45$, $F_{it} \leq 0,55$, $F_{st} \geq 0,11$) was proposed in this article.

Keywords: dark European bees, preserving of the aboriginal gene pool, *Apis mellifera mellifera*, microsatellite loci, remaining populations, introgression, genetic standard, heterozygosity, genetic characteristics, inbreeding coefficients.