

Молекулярно-генетические и биохимические методы оценки таксономической принадлежности СЕМЕЙ ПЧЕЛ

Для успешного сохранения генофонда популяций пчел необходимо владение информацией об уровне его генетической изменчивости. Первоначально селекцию семей проводили на основе морфологических методов — классических с измерением частей тела пчелы и модернизированных с учетом особенностей жилкования крыльев. На современном этапе развития пчеловодства морфологическая идентификация семей стала затруднительна в связи с интенсивной гибридизацией, массовой транспортировкой семей между удаленными регионами и климатическими изменениями. Поскольку большинство морфологических признаков характеризуется широкой нормой реакции, то любые изменения окружающей среды незамедлительно отражаются на внешних характеристиках пчел. Внутренние молекулярно-генетические и биохимические характеристики меньше зависят от изменений окружающей среды и более корректно отражают таксономическое положение семей.

Для оценки таксономической принадлежности медоносной пчелы могут быть использованы генетически детерминированные множественные молекулярные формы ферментов — изоферменты. Находящиеся под контролем одного гена изоферменты называют аллозимами [11].

Первые популяционно-генетические исследования медоносной пчелы на основе аллозимных локусов относятся к началу 50-х годов XX в. Анализ аллозимного полиморфизма исходил из аллельной вариации локусов ферментов и стал популярен в 80–90-е годы XX в. Применение аллозимного полиморфизма дало возможность изучить структуру и поток генов, а также процесс гибридизации в популяции пчел. Данный метод может быть использован для оценки уровня генетиче-

ского разнообразия и адаптированности популяций пчел к условиям среды обитания (рис. 1) [9].

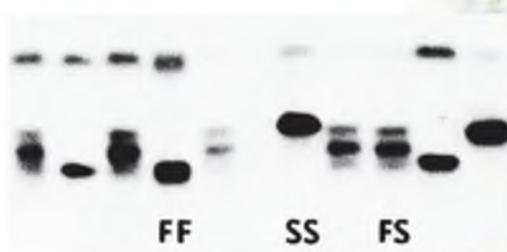


Рис. 1. Электрофоретический паттерн аллозимного полиморфизма локуса малатдегидрогеназы MDH пчел

Специфические особенности медоносной пчелы: очень низкий уровень аллозимного полиморфизма и ограниченность полиморфных аллозимных локусов (Halliday, 1981). По данным маркерам нет фиксированных различий между подвидами, а популяции различаются лишь по частотам аллелей, из-за чего аллозимные локусы становятся малоприспособными для популяционных исследований (Kandemir et al., 2011).

Недостаточно высокий уровень полиморфизма аллозимных локусов делает этот маркер малопривлекательным для исследований в пчеловодстве. Так, в популяции пчел гетерозиготность по аллозимным локусам составляла менее 1% (Sylvester, 1986). Причиной такого положения, возможно, является гаплодиплоидная система размножения (Obrecht, School, 1981).

В популяциях медоносной пчелы полиморфны следующие аллозимные локусы:

♦ малатдегидрогеназы MDH-1 (EC 1.1.1.37) (7 аллелей: MDH65, MDH80, MDH87, MDH100, MDH116, MDH125, MDH133) (Smith, Glenn, 1995);

- ◆ малик-энзима *ME* (EC 1.1.1.40) (4 аллеля: *ME70*, *ME100*, *ME106*, *ME117*) (Kandemir et al., 2011);
- ◆ эстеразы *EST-3* (EC 3.1.1) (8 аллелей: *EST70*, *EST80*, *EST88*, *EST94*, *EST100*, *EST105*, *EST118*, *EST130*) (Ivanova et al., 2011);
- ◆ щелочной фосфатазы *ALP* (EC 3.1.3.1) (3 аллеля: *ALP80*, *ALP90*, *ALP100*) (Ivanova et al., 2010);
- ◆ фосфоглюкомутазы *PGM* (EC 5.4.2.2) (5 аллелей: *PGM75*, *PGM80*, *PGM100*, *PGM114*, *PGM120*) (Ivanova et al., 2010);
- ◆ гекокиназы *HK* (EC 2.7.1.1) (5 аллелей: *HK77*, *HK87*, *HK100*, *HK110*, *HK120*) (Del Lama et al., 1990).

Тем не менее эти локусы активно изучались в популяциях пчел разных подвидов. Одним из самых полиморфных и наиболее популярных в дифференциации африканизированных и европейских популяций пчел принято считать аллозимный локус малатдегидрогеназы *MDH-1*. Известно, что локус *MDH-1* не является селективно-нейтральным, а его вариация — следствие физиологической адаптации пчел к различным климатическим зонам и может некорректно отражать поток генов (Cornuet et al., 1999).

Исследования полиморфизма аллозимных локусов *MDH* в популяции пчел *A. m. ligustica* показали, что завоз пчел из других популяций приводит к росту полиморфизма (Cornuet et al., 1999).

В популяции пчел из Норвегии полиморфными оказались два локуса — *MDH* и *ME* (Sheppard, Berlocher, 1985); в популяциях пчел Южной Америки и Австралии — только один локус *EST* (Gartside, 1980); в популяциях пчел Бразилии и Уругвая — два локуса — *EST* и *PGM* (Lobo et al., 1989); в популяциях пчел Африки — пять локусов — *MDH*, *ME*, *PGM*, *EST* и *HK*. Большое число полиморфных локусов позволяет предположить, что мы имеем дело с африканским происхождением подвидов пчел (Sheppard, Berlocher, 1985).

Каждый аллозимный локус характеризуется определенным числом аллелей. Разные популяции пчел характеризуются встречаемостью неодинаковых аллелей аллозимных локусов (Sheppard, Berlocher, 1985). На основе сравнительного анализа частот аллелей аллозимных локусов можно изучить процесс внутривидовой гибридизации. Так, на осно-

ве полиморфизма аллозимного локуса *EST* была показана гибридизация между пчелами подвидов *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* в Восточной Европе (Biasiolo, Comparini, 1990).

Наряду с биохимическими методами на основе аллозимного полиморфизма для решения таксономических задач медоносной пчелы могут применяться методы анализа полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК), позволяющие расширить его возможности. Митохондриальная ДНК медоносной пчелы — это небольшая кольцевая молекула размером около 16,3 тыс. п. н. с материнским типом наследования. У пчел хорошо изучены маркеры митохондриальной ДНК, но они не позволяют проводить анализ внутривидовых гибридов (Ильясов и др., 2006).

Изучение генетической структуры популяции пчел играет важную роль в исследованиях по сохранению биоразнообразия и управлению генофондом медоносной пчелы (Hoffman et al., 2008). Популяционно-генетический анализ пчел позволяет наиболее полно раскрыть структуру вида *A. mellifera* (Tunca, Kence, 2011).

В мтДНК отсутствуют интроны, но имеются межгенные участки. Самый изученный межгенный участок — локус *COI-COII* протяженностью от 500 до 1500 п. н., характеризующийся вариабельностью длины. Частота возникновения мутаций в мтДНК почти в 10 раз выше, чем в ядерной ДНК, что связано с отсутствием эффективных систем репарации мутаций (Garnery et al., 1998).

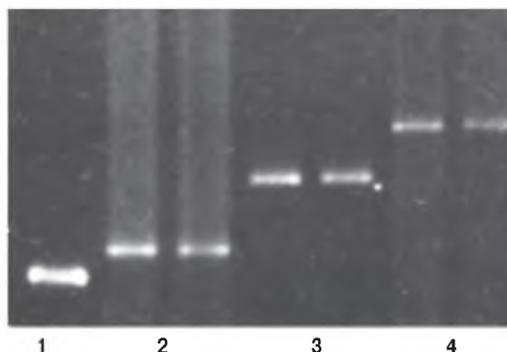


Рис. 2. Электрофоретический паттерн полиморфизма длин фрагментов амплификации локуса *COI-COII* мтДНК медоносной пчелы: 1 — фрагмент *Q*; 2 — фрагменты *PQ*; 3 — фрагменты *PQQ*; 4 — фрагменты *PQQQ*

Полимеразная цепная реакция локуса *COI-COII* мтДНК обнаружила вариабельность длины амплифицированных фрагментов. Так, подвиды пчел *A. m. caucasica* и *A. m. carnica* эволюционной ветви С характеризовались самой короткой последовательностью Q, тогда как подвиды всех остальных эволюционных ветвей содержат один элемент Р и от 1 до 5 последовательностей Q (рис. 2).

Это свойство было использовано в России для дифференциации подвида *A. m. mellifera* эволюционной ветви М от подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carnica* эволюционной ветви С [7].

Существует множество методов изучения полиморфизма мтДНК: рестрикционный полиморфизм ДНК с помощью эндонуклеаз — метод ПДРФ, рестрикционный полиморфизм амплифицированных фрагментов ДНК — метод ПЦР-ПДРФ, полиморфизм нуклеотидной последовательности — метод прямого секвенирования.

Для рестрикции мтДНК медоносной пчелы обычно используют эндонуклеазы *HinfI*, *AccI*, *AvaI*, *BclI*, *BglII*, *EcoRI*, *HincII*, *HindIII*, *HindIII*, *NDel*, *PstI*, *PvuII*, *XbaI* (Smith, 1991).

На основе ПДРФ анализа мтДНК была подтверждена дифференциация подвидов пчел на 4 эволюционные ветви: А, М, С, О (Ruttner, 1988) и выявлены подвидоспецифичные гаплотипы (Smith, 1991). В связи с тем что применение технологии ПЦР позволяет минимизировать количество анализируемой ДНК, в дальнейшем метод ПДРФ был заменен методом ПЦР-ПДРФ (Pinto et al., 2003).

Применяя ПЦР-ПДРФ анализ генов *COI* и *ND5* мтДНК эндонуклеазами *NcoI*, *StyI* и *AluI* у пчел подвида *A. m. macedonica* из Македонии (Stevanovic et al., 2010), эндонуклеазами *SspI*, *HincII* и *FokI* пчел подвидов *A. m. rodopica* из Болгарии и *A. m. macedonica* из Греции (Ivanova et al., 2010), были разработаны диагностические маркеры подвидов. Ген *COI* мтДНК оказался информативным для ПЦР-ПДРФ анализа эндонуклеазами *HincII* и *XbaI* при дифференциации подвидов эволюционных ветвей М (*A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*) и С (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasica*) (Hall, Smith, 1991), эндонуклеазой *HinfI* при идентификации подвида пчел *A. m. lamarckii* (Nielsen et al., 2000), эндонуклеазами *NcoI* и *StyI* при распознавании подвида

A. m. macedonica среди подвидов *A. m. adami*, *A. m. cecropia*, *A. m. cyprica* (Stevanovic et al., 2010).

При дифференциации европейских и африканских популяций пчел ПЦР-ПДРФ анализ гена *CYT B* мтДНК эндонуклеазой *BglII* (Crozier et al., 1991), а гена *Ls rRNA* мтДНК эндонуклеазой *HincII* — при различении подвидов эволюционных ветвей М (*A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*) и С (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasica*) оказался информативным (Hall, Smith, 1991).

Наиболее популярным является ПЦР-ПДРФ анализ межгенного локуса *COI-COII* мтДНК эндонуклеазой *Dral*, кратко называемый в статьях как *Dral*-тест в филогеографических исследованиях пчел европейских подвидов (De la Rúa et al., 2006). В анализе генетической структуры зон гибридизации подвидов (Cánovas et al., 2008), изучении уровня интрогрессии генов южных подвидов (Jensen et al., 2005), мониторинге изменений генофонда по материнской линии в африканизированных популяциях пчел Северной и Южной Америки оказался полезным *Dral*-тест (Clarke et al., 2002).

Dral-тест — мощный инструмент для различения подвидов на основе комбинаций вариантов длин фрагментов рестрикции. Межгенный локус *COI-COII* мтДНК состоит из двух нуклеотидных последовательностей, названных Р и Q, где Р может иметь варианты Р0, Р1 и Р2, отличающиеся небольшими делециями и инсерциями.

Согласно L. Garnery et al. (1998), пчелам разных эволюционных ветвей свойственны разные комбинации элементов Р и Q. Наиболее короткий фрагмент локуса *COI-COII* мтДНК содержат пчелы эволюционной ветви С из Юго-Восточной Европы. У них локус представлен только единственной копией последовательности Q (Garnery, et al., 1998).

Подвиды пчел, относящиеся к эволюционным ветвям О, М, А, Z и Y, имеют более длинный фрагмент локуса *COI-COII* мтДНК, так как содержат одну Р и от 1 до 5 копий последовательности Q (Evans et al., 2013).

Дополнительный полиморфизм локуса *COI-COII* мтДНК наблюдается при ПЦР-ПДРФ анализе эндонуклеазой *Dral*, который позволяет дифференцировать свыше 100 гаплотипов



(Collet et al., 2006). Несмотря на высокий уровень полиморфизма, *Dral*-тест не способен четко дифференцировать подвиды пчел. Так, гаплотип С1 представлен как у *A. m. carnica*, так и у *A. m. ligustica*, хотя и с разными частотами (Mucoz et al., 2014), гаплотип А1 — у *A. m. iberiensis*, *A. m. adansonii* и других африканских подвидов, гаплотип М4 — у *A. m. iberiensis* и *A. m. mellifera* (Cánovas et al., 2008). Тем не менее из всех маркеров мтДНК *Dral*-тест является наиболее мощным и информативным (Evans et al., 2013).

В России популяции темной лесной пчелы изучались без проведения рестрикции на основе полиморфизма длины межгенного локуса *COI-COII* мтДНК (Ильясов и др., 2007). Современные исследователи генов мтДНК медоносной пчелы прежде всего концентрируются на сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей разных подвидов пчел. Секвенционный анализ гена *COI* мтДНК используется для генетического штрихкодирования и применяется в основном для сравнения медоносной пчелы на видовом уровне (Rukhsana et al., 2014). Секвенционный анализ гена *ND2* мтДНК обычно применяется для внутривидовых филогенетических исследований и позволяет дифференцировать подвиды пчел на 4 эволюционные ветви: А, М, С и О [4].

Оценка таксономической принадлежности медоносной пчелы стала еще более эффективной при использовании анализа полиморфизма микросателлитных локусов, разбросанных по всему геному. Микросателлитные локусы — неограниченный источник полиморфных генетических маркеров, и в наши дни в геноме медоносной пчелы обнаружено и описано их около 500 (Solignac et al., 2003).

Эти локусы представляют собой короткие, от 2 до 6 п. н., фрагменты ДНК, тандемно повторяющиеся более 100 раз, и известны как STR и SSR. Полиморфизм микросателлитных локусов обычно изучается на основе ПЦР со специфичными для каждого локуса праймерами (Tautz, 1990).

Окончание следует

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

*Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра
Российской академии наук*