

Молекулярно-генетические и биохимические методы оценки таксономической принадлежности СЕМЕЙ ПЧЕЛ*

Медоносная пчела и шмель земляной — первые виды общественных насекомых, у которых изучено большинство микросателлитных локусов (Estoup et al., 1995). К сожалению, стандартные лестницы размеров аллелей микросателлитных локусов для медоносной пчелы еще не разработаны, что затрудняет сравнительный анализ данных полиморфизма по разным популяциям (Schnabel et al., 2000).

Микросателлитные локусы имеют преимущества перед другими маркерами — они высокоинформативны, многочисленны, гипервариабельны и встречаются по всему геному. Разные популяции и подвиды пчел различаются по частотам аллельных вариантов и уровням гетерозиготности микросателлитных локусов. Микросателлитные локусы удобны для анализа генетической структуры популяций пчел, оценки степени инбридинга, уровня гетерозиготности, генетических расстояний между популяциями и подвидами пчел, а также для расчета коэффициента их генетического родства и уровня интрогрессии чужеродных генов в популяции. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов — чрезвычайно важный и популярный инструмент в популяционно-генетических исследованиях медоносной пчелы во всем мире (рис. 3).

Анализ полиморфизма микросателлитных локусов с использованием F-статистики и кластерного анализа позволил описать эволюцию аллелей и дифференцировать африканские и европейские популяции медоносной пчелы (Estoup et al., 1995). Для статистически значимой оценки структуры популяции медоносной пчелы достаточно провести изучение по одной рабочей особи из 40 семей по 10 микросателлитным локусам (Cornuet et al., 1999). Так, на основе анализа полимор-

физма 11 микросателлитных локусов были дифференцированы популяции пчел, относящиеся к эволюционным ветвям М и С на территории Греции, а также показан высокий уровень интрогрессии в популяции во Франции (Garnery et al., 1998).

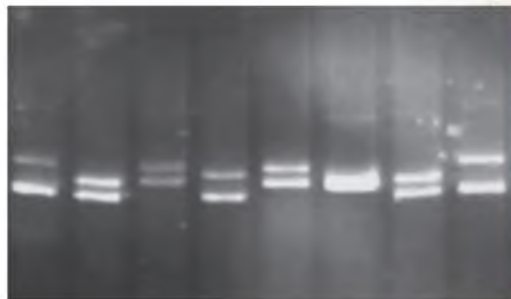


Рис. 3. Электрофоретический паттерн полиморфизма микросателлитных локусов медоносной пчелы

На основе полиморфизма 7 микросателлитных локусов определена зона интрогрессии между пчелами подвигов *A. m. mellifera* и *A. m. ligustica* в Альпах на границе между Францией и Италией (Solignac et al., 2003), в Швейцарии, Норвегии, Франции (Soland-Reckeweg et al., 2009), в Польше (Oleksa et al., 2011), а также в популяции африканизированных пчел между пчелами подвигов *A. m. intermissa* и *A. m. ligustica* на полуострове Юкатан (Clarke et al., 2002).

Анализ полиморфизма микросателлитных локусов позволил выяснить относительную чистоту линий иберийской популяции пчел подвида *A. m. iberiensis* в Испании и доказать генетическую изоляцию от популяции пчел подвида *A. m. intermissa* из Северной Африки и Португалии (De la Rúa et al., 2006). Полиморфизм 8 микросателлитных локусов позволил установить дифференциацию подвигов

*Окончание. Начало см. №7, 2017.

пчел на 4 эволюционные ветви: А, М, С, О (Franck et al., 2000).

Микросателлитные локусы активно используются при изучении генетической структуры локальных популяций медоносной пчелы разных регионов России: гибридных популяций Томской (Островерхова и др., 2015) и Новосибирской (Форнара, 2012) областей, популяций *A. m. mellifera* Пермского края, Республики Башкортостан (Каскина и др., 2015), Красноярского края, Республики Татарстан, Архангельской и Владимирской областей (Зиновьева и др., 2011); популяций *A. m. carnatica* Республики Адыгея и Закарпатской области Украины (Зиновьева и др., 2011); популяций *A. m. caucasica* Краснодарского края и Орловской области [5].

Несмотря на столь высокую популярность, у микросателлитных маркеров есть некоторые недостатки. Так, частота мутаций микросателлитных локусов очень высока и нередко приводит к явлению гомоплазии. Это тот случай, когда ПЦР амплификация аллелей с разным числом tandemных повторов проявляется в виде фрагментов одинакового размера, что может привести к ошибочной оценке аллельного богатства (Estoup et al., 1995).

Явление нулевого аллеля микросателлитных локусов, когда в связи с мутациями в сайтах связывания праймеров ПЦР амплификация не дает видимого продукта, также часто встречается в популяциях медоносной пчелы и показывает ошибочные уровни гетерозиготности (Charpuis, Estoup, 2007). Эти скрытые различия может выявить только секвенирование микросателлитных локусов.

Прорыв в оценке таксономической принадлежности медоносной пчелы, а также характеристике всего генома и реконструкции эволюции был достигнут в последние 10 лет благодаря использованию однонуклеотидного полиморфизма (SNP). Однонуклеотидный полиморфизм заключается в отличиях последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, Г или С) в геноме (или в другой сравниваемой последовательности) представителей одного вида или между гомологичными участками хромосом. Если две последовательности ДНК отличаются на один нуклеотид, то они будут являться аллелями. Однонуклеотидные полиморфизмы обычно возникают в результате точечных мутаций (рис. 4) (Drabovich, Krylov, 2006).

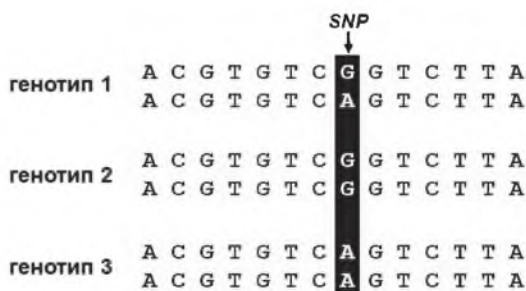


Рис. 4. Схема однонуклеотидного полиморфизма SNP медоносной пчелы

Однонуклеотидный полиморфизм широко используется в качестве генетических маркеров для построения дендрограмм молекулярно-генетической систематики (Griffin, Smith, 2000). Наиболее часто используются спейсеры генов рибосомальной РНК, где мутации, обеспечивая прямую зависимость между степенью полиморфизма и филогенетическим расстоянием между видами, обычно не сказываются на структуре конечных продуктов гена и не влияют на жизнеспособность (Sobrinho et al., 2005).

Маркеры однонуклеотидного полиморфизма SNP — мощное дополнение к существующим молекулярным методам исследования (Evans et al., 2013). Обычно SNP в связи с низкой скоростью мутаций (около 10^{-8} – 10^{-9} замен на нуклеотид на поколение) находятся в биаллельном состоянии (Brumfield et al., 2003). Анализ SNP на данный момент является эффективным инструментом для эволюционных исследований. Однонуклеотидный полиморфизм очень информативен в генетическом картировании локусов количественных признаков как маркер с высоким разрешением благодаря их большому числу и стабильной наследуемости в ряду поколений (Zayed, Whitfield, 2008).

Поиск и анализ SNP проводятся при помощи следующих методов: гибридизационных (гибридизация аллель-специфическая и на микрочипах), ферментативных (ПЦР–ПДРФ, ПЦР, метод удлинения праймеров, TaqMap пробы, лигирование олигонуклеотидов, капиллярный электрофорез), изучения конформационного полиморфизма ДНК (одноцепочечный конформационный полиморфизм (SSCP), электрофорез по градиенту температур (TGGE), жидкостная хроматография в денатурирующих условиях, масс-спектрометрия) и секвенирования ДНК (Sobrinho et al., 2005).

Для картирования SNPs на протяжении всего генома применяется технология Illumina/Solexa — метод нового поколения, разработанный компанией Solexa, в основе которого лежит принцип секвенирования путем синтеза.

Первоначально во всем геноме медоносной пчелы была обнаружена 1136 SNPs (Zayed, Whitfield, 2008), в дальнейшем число SNP-маркеров было увеличено до 1183 (Pinto et al., 2014). Эти SNPs могут быть использованы для идентификации подвидов и определения уровня интрогрессии и скрининга по количественным признакам. На основе анализа 1136 SNPs пчел 14 подвидов была подтверждена дифференциация подвидов пчел на 4 эволюционные ветви: А, М, С, О (Pinto et al., 2014).

В отличие от человека для пчелы разработан всего один коммерческий чип, содержащий 44000 SNPs, который обеспечивает проведение скрининга устойчивых к клещу *V. destructor* пчел подвида *A. m. carnica* и не позволяет дифференцировать подвиды пчел (Spötter et al., 2012). К сожалению, высокая стоимость и сложность SNP-анализа тормозят его применение в массовом скрининге пчел в ближайшем будущем (Pinto et al., 2014).

Анализ 1136 SNPs у 328 особей медоносной пчелы, из которых 175 особей из естественных аборигенных популяций 14 подвидов Европы, Африки и Азии, а 153 особи из интродуцированных популяций пчел Северной и Южной Америки, дал возможность реконструировать эволюцию медоносной пчелы. Выявлено, что медоносная пчела зародилась в Африке и далее распространилась в Европу как минимум три раза, что привело к возникновению популяций пчел Восточной и Западной Европы, близких географически, но отдаленных генетически. Самая современная экспансия африканских пчел произошла в результате интродукции африканского подвида *A. m. scutellata* в Южную и Центральную Америку и способствовала появлению популяций африканизированных пчел-убийц (Whitfield et al., 2006).

В 77 популяциях темной лесной пчелы *A. m. mellifera* из Англии (8 семей), Франции (15 семей), Бельгии (3 семей), Дании (10 семей), Нидерландов (15 семей), Швейцарии (6 семей), Шотландии (10 семей) и Норвегии (10 семей) путем анализа полиморфизма был определен уровень интрогрессии «юж-

ных» генов 1183 SNPs. Уровень интрогрессии «южных» генов в обычных популяциях пчел — 30%, тогда как в охраняемых популяциях заповедников и национальных парков — 8%. Это свидетельствует о том, что охраняемые популяции пчел не полностью защищены от интрогрессии «южных» генов и для сохранения чистоты их генофонда необходима селекция на основе анализа SNPs (Pinto et al., 2014).

Секвенционный анализ 140 геномов медоносной пчелы обнаружил 8,3 млн SNPs в 14 популяциях пчел 9 подвидов Европы, Африки, Южной и Северной Америки, принадлежащих 4 эволюционным ветвям. Было показано, что численность популяции пчел значительно колебалась в зависимости от исторических изменений климата. Высокий уровень генетического разнообразия современных популяций пчел позволил предположить, что в процессе одомашнивания медоносная пчела не была подвержена снижению эффективной численности популяции до критического уровня и не испытала эффекта «бутылочного горлышка». Уровень генетической изменчивости медоносной пчелы формируется преимущественно естественным отбором и тесно коррелирует с экспрессией генов и метилированием ДНК. Авторы обнаружили геномные особенности медоносной пчелы, обеспечивающие их адаптацию и устойчивость к факторам среды обитания (Wallberg et al., 2014).

Для популяций европейских пчел был разработан набор из 1183 SNPs маркеров, который позволяет изучить происхождение семей темной лесной пчелы *A. m. mellifera* и выявить точный уровень интрогрессии генов подвидов эволюционной ветви С в их геном.

В итоге для идентификации уровня интрогрессии «южных» генов в популяции темной лесной пчелы был подобран набор из 96 SNPs, использование которого на 92% дешевле, а по информативности не уступает анализу с использованием набора из 384 SNPs (Mucoz et al., 2014). На основе SNPs локуса COI-COII мтДНК для европейских и российских популяций темной лесной пчелы была разработана новая классификация митотипов. В результате анализа SNPs локуса ND2 мтДНК все подвиды медоносной пчелы были дифференцированы на 4 эволюционные ветви: А, М, С, О (Ильясов и др., 2016). Таким образом, для оценки таксономической

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ скопированы из прошлых публикаций

принадлежности медоносной пчелы метод на основе SNP является самым перспективным и информативным, а его стоимость благодаря созданию минимального набора информативных SNP будет не очень высока.

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

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

В процессе аллопатрической эволюции сформировалось 30 подвидов медоносной пчелы *Apis mellifera* L. Под влиянием природных и антропогенных факторов изоляция географических подвидов пчел была нарушена и аборигенным генофондам подвидов стала угрожать опасность интрогрессии и замещения геномов. Сохранение аборигенных генофондов медоносной пчелы для человека представляет большее значение для успешного устойчивого пчеловодства. Для сохранения чистопородного генофонда подвидов пчел необходима точная идентификация таксономической принадлежности семей пчел. В статье представлены возможности молекулярно-генетических и биохимических методов для оценки таксономической принадлежности семей пчел. Наиболее перспективными и информативными при оценке таксономической принадлежности пчел являются методы на основе анализа однонуклеотидного полиморфизма (SNP).

Ключевые слова: *медоносная пчела, Apis mellifera, подвиды, генофонд, SNP, однонуклеотидный полиморфизм, гибридизация, интрогрессия.*

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., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Митохондриальная ДНК в изучении популяций пчел на Урале // *Материалы межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока*. — Новосибирск, 2006.
3. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Локальные популяции *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // *Генетика*. — 2007. — Т. 43. — № 6.
4. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Новый подход к классификации митотипов темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* и иберийской пчелы *Apis mellifera iberiensis* // *Генетика*. — 2016. — Т. 52. — № 3.
5. Калашиников 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.
6. Каскинова М.Д., Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Анализ генетической структуры популя-

ций медоносной пчелы *Apis mellifera* L. // *Генетика*. — 2015. — Т. 51. — № 10.

7. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В. и др. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелиных семей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала // *Генетика*. — 1998. — Т. 34. — № 11.

8. Острроверхова Н.В., Конусова О.Л., Кучер А.Н., Киреева Т.Н., Воротов А.А., Белых Е.А. Генетическое разнообразие локуса COI-COII мтДНК медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в Томской области // *Генетика*. — 2015. — Т. 51. — № 1.

9. Талинов А.Н., Янбаев Ю.А., Юмагузин Ф.Г. Морфологическая и генетическая изменчивость пчелы медоносной (*Apis mellifera mellifera* L.) в Башкирском Зауралье. — Уфа, 2007.

10. Форнара М.С. Характеристика аллелофонда и дифференциация пород и популяций медоносной пчелы с использованием микросателлитов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Дубровицы. — 2012.

11. Янбаев Ю.А., Косарев М.Н., Бахтиярова Р.М., Николенко А.Г. Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия. — Уфа, 2000.

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., e-mail: possash@yandex.ru, тел. 8 (917) 470-62-18; *Николенко Алексей Геннадьевич*, д-р биол. наук, проф., зав. лабораторией биохимии адаптивности насекомых, e-mail: a-nikolenko@yandex.ru, тел. 8 (960) 807-58-93.

MOLECULAR-GENETIC AND BIOCHEMICAL METHODS OF ASSESSING OF THE TAXONOMIC STATUS OF THE HONEYBEE COLONIES

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

In the process of allopatric evolution, 30 subspecies of the honeybee *Apis mellifera* L. were formed. Under the influence of natural and anthropogenic factors, the isolation of geographical subspecies of honeybees was violated and the aboriginal gene pools of subspecies became threatened with introgression and genome substitution. For humans the preservation of indigenous gene pool of honeybees has greater importance for successful and sustained beekeeping. To preserve a purebred gene pool of honeybee subspecies, correct identification of the taxonomic belonging of honeybee colonies is necessary. The article presents the possibilities of molecular-genetic and biochemical methods for assessing the taxonomic affiliation of honeybee colonies. The most promising and informative in assessing the taxonomic affiliation of honeybees are methods based on the analysis of single nucleotide polymorphism (SNP).

Keywords: *honeybee, Apis mellifera, subspecies, gene pool, SNP, single nucleotide polymorphism, hybridization, introgression.*