



**БИОМИКА/BIOMICS**

<http://biomics.ru>



## ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОДВИДОВ ПЧЕЛ APIS MELLIFERA

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](mailto:apismell@hotmail.com)

### Резюме

Медоносная пчела является важнейшим фактором, формирующим посредством опыления внешнюю и внутреннюю структуру биоценозов. Для каждого биоценоза имеет значение не только количество пчел, но и их особенности, которые, в первую очередь, определяются таксономической принадлежностью. Это связано с тем, что разные подвиды пчел имеют разное предпочтение к видам опыляемых растений. Для сохранения чистопородного генофонда подвидов пчел необходима точная идентификация таксономической принадлежности семей пчел. Нами описаны основные методы идентификации таксономической принадлежности семей пчел. Наиболее перспективными для сохранения чистопородных генофондов подвидов медоносной пчелы являются методы анализа однонуклеотидного полиморфизма SNP.

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

### Сохранение генофонда и гибридизация подвидов медоносной пчелы

Медоносная пчела *Apis mellifera* подразделена на 30 подвидов, из которых единственный подвид *A. m. mellifera* приспособлен к обитанию в условиях холодного климата Северной Европы. Вследствие гибридизации и неограниченного потока генов между естественными и коммерческими популяциями пчел генофонд аборигенных темных лесных пчел *A. m. mellifera* считается утраченным во многих странах Европы [Jensen et al., 2005]. Так, в Германии в результате массовой интродукции “южных” пчел произошла интенсивная гибридизация подвида *A. m. mellifera* подвидами *A. m. carnica* [Maul, Hähle, 1994]. В России подвид *A. m. mellifera* был также на большой части территории гибридизован с подвидами *A. m. caucasica* и *A. m. carpatica* [Ильясов и др., 2007]. Большинство пчеловодов Скандинавских стран и Британских островов предпочитает разводить *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* или искусственно выведенную породу пчел бэкфаст [Jensen, Pedersen, 2005]. Уже в XVIII веке подвиды *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* стали активно распространяться по всем странам Европы [Ruttner, 1988]. Подвид *A. m. caucasica* был

завезен человеком за последние 100 лет из Кавказа в Турцию, Россию, Украину, Болгарию и Германию [Ivanova et al., 2007].

В результате широкого распространения подвидов *A. m. carnica*, *A. m. caucasica* и *A. m. ligustica* в Евразии произошла их гибридизация с аборигенным для Северной Европы подвидами *A. m. mellifera* и замена пчелами гибридного происхождения [Jensen et al., 2005].

Современные молекулярно-генетические данные показали, что неограниченный поток генов происходит между популяциями пчел подвидов *A. m. carnica*, *A. m. macedonica* и *A. m. cecropia* Балканских стран и Восточной Европы [Kozmus et al., 2007]. Так, в Болгарии аборигенный подвид *A. m. macedonica* с 1980 года был почти полностью заменен интродуцированными подвидами *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica* [Ivanova et al., 2007].

Популяция пчел подвида *A. m. iberiensis* Балеарских островов также подвержена интенсивной гибридизации интродуцированными подвидами *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* [De la Rúa et al., 2006]. Аборигенные пчелы подвида *A. m. mellifera* на острове Сардиния и подвида *A. m. intermissa* на острове Сицилия относительно недавно были

полностью заменены интродуцированными пчелами подвида *A. m. ligustica* из материковой Италии [Franck et al., 2000].

В Северо–Западной Европе и Великобритании замена аборигенного подвида *A. m. mellifera* подвидом *A. m. ligustica* произошла уже в 1859 году [Dews, Milner, 1991], а массовый завоз *A. m. ligustica* в Великобританию — уже с 1915 года после эпидемии болезни пчел острова Уайт [Ruttner, 1988]. В наши дни из–за более высокой медопродуктивности, быстрого наращивания силы семьи по весне, меньшей ройливости и агрессивности, а также низкой стоимости и представленности на рынке по сравнению с аборигенным подвидом *A. m. mellifera* в Великобританию продолжают импортироваться подвиды *A. m. carnica* и *A. m. cecropia*.

Ареал подвида *A. m. mellifera* в Евразии существенно сократился из–за интенсивных вырубок лесов, а также интродукции на северные территории “южных” подвидов, распространения таких новых болезней, как нозематоз типа С, варроатоз и аскосфероз за последние 200 лет [Ильясов, Шареева, 2014]. Многочисленные эксперименты по скрещиванию разных подвидов медоносной пчелы привели к широкому распространению в мире пчел гибридного происхождения [Ильясов и др., 2007].

Во многих странах Европы генофонд аборигенной темной лесной пчелы *A. m. mellifera* считается утраченным. Известна полная замена аборигенной темной лесной пчелы *A. m. mellifera* краинской пчелой *A. m. carnica* в Германии [Jensen, Pedersen, 2005]. Предпочтения пчеловодов в разведении пчел эволюционной ветви С привели к потере целостности ареала *A. m. mellifera* и интрогрессии генофонда “южных” подвидов в Западной и Северной Европе. В России *A. m. mellifera* на большей части аборигенного ареала был заменен подвидами *A. m. caucasica* и *A. m. carpatica* [Ильясов и др., 2016].

Генофонд *A. m. mellifera* в результате сокращения эффективной численности и массовой интрогрессии “южных” генов может быть потерян в ближайшем будущем. Для успешного сохранения и восстановления аборигенного генофонда темной лесной пчелы *A. m. mellifera* необходима точная идентификация подвидов, на основе которой возможно осуществлять мониторинг и контроль [Uzunov et al., 2014].

Для идентификации подвидов пчел совсем недавно во всем мире использовались только морфометрические методы исследования. Несмотря на то, что при классификации пчел морфометрические признаки являются важными, они не всегда информативны при идентификации

подвидов, поскольку под влиянием условий среды обитания и естественного отбора подвержены изменчивости [Franck et al., 2000].

Были разработаны методы идентификации подвидов пчел на основе полиморфизма аллозимных локусов и митохондриальной ДНК. Возлагаемые надежды на аллозимные локусы не оправдались, так как они не обладали достаточным уровнем полиморфизма и оказались малоинформативными для популяционно–генетических исследований пчел.

Исследователей пчел по митохондриальной ДНК ожидал больший успех, она оказалась намного информативней и позволяла дифференцировать подвиды на эволюционные ветви. Однако, показывая только материнскую наследственность, митохондриальная ДНК не отражала полностью основные генетические показатели популяции, как гетерозиготность, генное разнообразие, коэффициенты родства, коэффициенты инбридинга. Такие показатели могут быть получены путем анализа полиморфизма микросателлитных локусов. Вместе с тем, последние не способствуют анализу филогенетических взаимоотношений подвидов и проведению генетического штрихкодирования. Максимально информативным и позволяющим сравнивать все известные виды друг с другом и определять их генетические взаимоотношения, является анализ однонуклеотидного полиморфизма SNP.

#### **Полиморфизм морфологических частей пчелы**

Основы современного морфологического метода анализа семей пчел в России заложил В. В. Алпатов (1948). Для дифференциации подвидов *A. mellifera* было предложено измерять ширину и длину 3 тергита, длину правого переднего крыла, ширину правого переднего крыла, кубитальный индекс, дискоидальное смещение, длину хоботка, что в целом отражает специфику развития хозяйственно–полезных признаков пчел. Метод анализа вариации частей тела между разными подвидами медоносной пчелы подразделяется на четыре группы: характеристика размеров тела, окраска, характеристика жилкования крыльев и характеристика волосков [Алпатов, 1948].

В дальнейшем морфометрический метод на основе 36 признаков был усовершенствован многомерным статистическим анализом [Ruttner, 1988]. Сейчас в морфометрических исследованиях необходимо использование не менее 25 характеристик волосков, хоботка, задней ножки, тергита, стернита, тела и крыльев. Недостатком данного метода является зависимость размеров частей тела от природно–климатических факторов, которая перекрывает морфометрические показатели у разных подвидов пчел (рис. 1) [Алпатов, 1948].

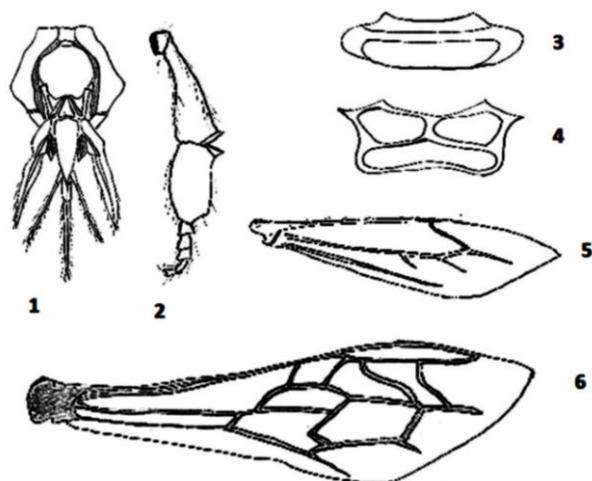


Рисунок 1. Части тела медоносной пчелы, используемые для морфометрических исследований: 1. хоботок, 2. задняя нога, 3. четвертый тергит брюшка, 4. четвертый стернит брюшка, 5. заднее крыло, 6. переднее крыло [Саттаров и др., 2010].

Данный метод анализа в связи с относительной простотой и дешевизной выполнения активно используется в России. Чистопородность популяции темной лесной пчелы путем морфометрических исследований была выявлена в Пермском крае [Бояршинов и др., 2001], в Республике Татарстан [Сафиуллин, 2013], в Республике Башкортостан [Саттаров и др., 2010], в Республике Удмуртия [Колбина и др., 2007].

Для дифференциации подвидов пчел по жилкованию крыльев используют следующие подходы: классическая морфометрия крыла, дискриминантный анализ DAWINO, который проводится по 19 углам между соединениями жилок, 7 линейным измерениям и 5 индексам ([www.beedol.cz](http://www.beedol.cz)), а также геометрический анализ формы крыла [Bookstein, 1991]. Согласование результатов исследований классической морфометрии крыла медоносной пчелы с дискриминантным анализом крыла DAWINO исследовалось в работе I. Kandemir et al. (2011) (рис. 2).

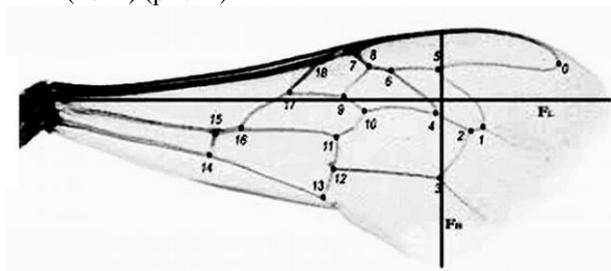


Рис. 2. Дискриминантный анализ подвидов пчел по жилкованию крыльев DAWINO [Kandemir et al. 2011]

Высокая степень корреляции генетических расстояний между подвидами пчел эволюционных ветвей А, М и С, полученных на основе дискриминантного анализа крыльев была продемонстрирована на выборке из 663 семей пчел из 6 популяций Европы и Африки [Miguel et al., 2011].

### Полиморфизм аллозимных локусов медоносной пчелы

Для успешного сохранения генофонда популяций пчел необходимо владение информацией об уровне его генетической изменчивости. Наиболее часто при исследовании полиморфизма медоносной пчелы прибегают к генетически детерминированным множественным молекулярным формам ферментов — изоферментам. Находящиеся под контролем одного гена изоферменты называют аллозимами [Янбаев и др., 2000].

Первые популяционно-генетические исследования медоносной пчелы на основе аллозимных локусов относятся к началу 50 - х годов XX века. Анализ аллозимного полиморфизма пчел исходит из аллельной вариации локусов ферментов и стал популярен в 80-е - 90-е годы XX века. 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 генетического разнообразия и адаптированности популяций пчел к условиям среды обитания (рис. 3) [Талипов и др., 2007].

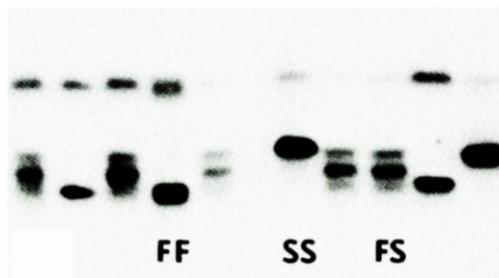


Рис. 3. Электрофоретический паттерн аллозимного полиморфизма локуса малатдегидрогеназы MDH пчел [Smith, Glenn, 1995].

Специфической особенностью медоносной пчелы является 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 популяций пчел. Так, в популяции пчел гетерозиготность по аллозимным локусам составляла менее 1% [Sylvester, 1986]. Причиной такого низкого уровня полиморфизма аллозимных локусов пчел, возможно, является гаплодиплоидная система размножения [Obrecht, School, 1981].

В популяциях медоносной пчелы полиморфными являются следующие аллозимные локусы:

малатдегидрогеназа *MDH* - 1 (EC 1.1.1.37) (7 аллелей: *MDH65*, *MDH80*, *MDH87*, *MDH100*, *MDH116*, *MDH125*, *MDH133*) [Smith, Glenn, 1995]

малик-энзим *ME* (EC 1.1.1.40) (4 аллеля: *ME70*, *ME100*, *ME106*, *ME117*) [Kandemir et al., 2011],

эстераза *EST* - 3 (EC 3.1.1) (8 аллелей: *EST70*, *EST80*, *EST88*, *EST94*, *EST100*, *EST105*, *EST118*, *EST130*) [Ivanova et al., 2011],

щелочная фосфатаза *ALP* (EC 3.1.3.1) (3 аллеля: *ALP80*, *ALP90*, *ALP100*) [Ivanova et al., 2010],

фосфоглюкомутаза *PGM* (EC 5.4.2.2) (5 аллелей: *PGM75*, *PGM80*, *PGM100*, *PGM114*, *PGM120*) [Ivanova et al., 2010],

гексокиназа *HK* (EC 2.7.1.1) (5 аллелей: *HK77*, *HK87*, *HK100*, *HK110*, *HK120*) [Del Lama et al., 1990].

Несмотря на низкий уровень полиморфизма аллозимных локусов, они 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 *MDH1* 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 2 локуса - *MDH* и *ME* [Sheppard, Berlocher, 1985]; в популяциях пчел Южной Америки и Австралии — только 1 локус *EST* [Gartside, 1980]; в популяциях пчел Бразилии и Уругвая - 2 локуса - *EST* и *PGM* [Lobo et al., 1989]; в популяциях пчел Африки - 5 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 количеством 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 основе полиморфизма аллозимного локуса *EST* была показана гибридизация между пчелами подвидов *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* в Восточной Европе [Biasiolo, Comparini, 1990].

#### Полиморфизм митохондриальной ДНК медоносной пчелы

Наряду с морфометрическим методом для изучения популяций медоносной пчелы могут применяться методы анализа полиморфизма митохондриальной ДНК, 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 [Garnevy et al., 1998].

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 P и от 1 до 5 последовательностей Q (рис. 4).

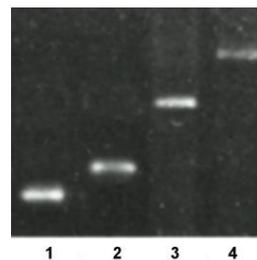


Рис.4. Полиморфизм длин фрагментов амплификации локуса *COI-COII* мтДНК. 1 - фрагмент Q, 2 - фрагменты PQ, 3 - фрагменты PQQ, 4 - фрагменты PQQQ.

Данный полиморфизм локуса *COI-COII* мтДНК был использован в России для дифференциации подвида *A. m. mellifera* эволюционной ветви М от подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carnica* эволюционной ветви С [Никонов и др., 1998].

Существует множество методов изучения полиморфизма митохондриальной ДНК (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 митохондриальной ДНК медоносной пчелы обычно используют эндонуклеазы *HinfI*, *AccI*, *AvaI*, *BclI*, *BglII*, *EcoRI*, *HincII*, *HindII*, *HindIII*, *NdeI*, *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 ПДРФ метод 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 различении подвида *A. m. macedonica* от подвидов *A. m. adami*, *A. m. cecropia*, *A. m. cypria* [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 *DraI*, кратко называемый в статьях как *DraI*-тест в филогеографических исследованиях пчел европейских подвидов [De la Rúa et al., 2006].

*DraI* 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. 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 *DraI*-тест оказался полезным [Clarke et al., 2002].

Согласно L. Garnery et al. (1998), пчелам разных эволюционных ветвей характерны 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 *DraI*, который позволяет дифференцировать свыше 100 гаплотипов [Collet et al., 2006]. Несмотря на высокий уровень полиморфизма *DraI* 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 [Muñoz 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 *DraI* 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 митохондриальной ДНК медоносной пчелы в основном 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 [Ильясов и др., 2016].

#### Полиморфизма микросателлитных локусов медоносной пчелы

Генетическая оценка пчел стала более эффективной после открытия 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].

Медоносная пчела и шмель земляной, являются первыми видами общественных насекомых, у которых изучено большинство микросателлитных локусов [Estoup et al., 1995]. 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. 5).

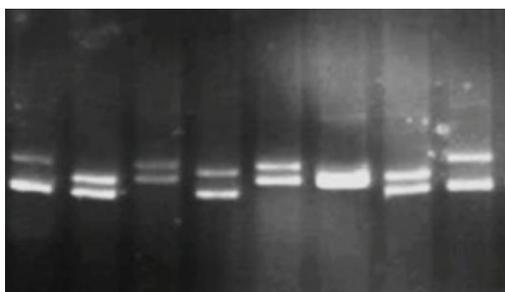


Рис. 5. Электрофоретический паттерн микросателлитного полиморфизма [Каскинова и др., 2015].

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 полиморфизма 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 [Garneray et al., 1998].

На основе полиморфизма 7 микросателлитных локусов определена зона интрогрессии между пчелами подвидов *A. m. mellifera* и *A. m. ligustica* на 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 подвидов *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]. С использованием полиморфизма 8 микросателлитных локусов удалось установить дифференциацию подвидов 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 пчел Томской [Островерхова и др., 2015] и Новосибирской областей [Форнара, 2012], популяций *A. m. mellifera* Пермского края, Республики Башкортостан [Каскинова и др., 2015], Красноярского края, Республики Татарстан, Архангельской и Владимирской областей [Зиновьева и др., 2011]; популяций *A. m. carpatica* Республики Адыгея и Закарпатской области Украины [Зиновьева и др., 2011]; популяций *A. m. caucasica* Краснодарского края и Орловской области [Калашников, 2013].

Несмотря на столь высокую популярность, у микросателлитных маркеров есть некоторые небольшие недостатки. Поскольку частота мутаций микросателлитных локусов очень высока, иногда происходят явления гомоплазии и нулевого аллеля, которые могут привести к немного смещенной оценке аллельного богатства и гетерозиготности [Estoup et al., 1995; Chapuis, Estoup, 2007]. Поскольку

гомоплазия и нулевой аллель достаточно редкие явления, то существенного влияния на достоверность результата исследований они не оказывают.

### Однонуклеотидный полиморфизм медоносной пчелы

Однонуклеотидный полиморфизм (SNP) заключается в отличиях последовательности ДНК размером в один нуклеотид (А, Т, G или С) в сравниваемой последовательности представителей одного вида или между гомологичными участками хромосом. Однонуклеотидные полиморфизмы обычно возникают в результате точечных мутаций (рис. 6) [Drabovich, Krylov, 2006].

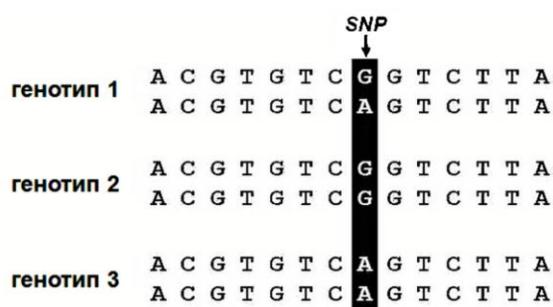


Рис.6. Схема однонуклеотидного полиморфизма SNP.

Однонуклеотидный полиморфизм широко используется в качестве генетических маркеров для построения дендрограмм молекулярно–генетической систематики [Griffin, Smith, 2000]. Наиболее часто используются спейсеры генов рибосомной 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 [Sobrino 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  $10^{-8}$  to  $10^{-9}$  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 количеству и стабильной наследуемости в ряду поколений [Zayed, Whitfield, 2008].

Поиск и анализ SNP проводится при помощи следующих методов: гибридизационных (гибридизация аллель–специфическая и на микрочипах), ферментативных (ПЦР–ПДРФ, ПЦР, метод удлинения

праймеров, TaqMan 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 [Sobrino 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 у медоносной пчелы было обнаружено 1136 SNPs [Zayed, Whitfield, 2008], в дальнейшем SNP маркеры были расширены 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 дает возможность проводить скрининг устойчивых к клещу *V. destructor* пчел подвида *A. m. carnica* и не позволяющий дифференцировать подвиды пчел [Spötter et al., 2012]. К сожалению, высокая стоимость и сложность SNP анализа затрудняет их 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, позволил реконструировать эволюцию медоносной пчелы. Выявлено, что медоносная пчела зародилась в Африке и далее распространилась в Евразию, причем такое распространение имело место 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 к появлению африканизированных популяций пчел–убийц [Whitfield et al., 2006].

В 77 популяциях темной лесной пчелы *A. m. mellifera* из Англии (8 семей), Франция (15 семей), Бельгия (3 семьи), Дания (10 семей), Нидерланды (15 семей), Швейцария (6 семей), Шотландия (10 семей)

и Норвегия (10 семей) путем анализа полиморфизма 1183 SNPs был определен уровень интрогрессии “южных” генов. Уровень интрогрессии “южных” генов в обычных популяциях пчел был 30%, тогда как в охраняемых популяциях заповедников и национальных парков - 8%. Это свидетельствует о том, что охраняемые популяции пчел не могут быть полностью защищены от интрогрессии “южных” генов и для сохранения чистоты их генофонда необходима селекция путем анализа SNPs [Pinto et al., 2014].

На основе секвенционного анализа 140 геномов медоносной пчелы было обнаружено 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 геноме.

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 он не уступает анализу с использованием набора из 384 SNPs [Muñoz 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 исследования медоносной пчелы метод изучения SNPs является самым информативным, а стоимость, благодаря созданию минимального набора информативных SNPs, не будет очень высока.

## Литература

1. Алпатов В. В. Породы медоносной пчелы и их использование в сельском хозяйстве. Москва: Московское общество испытателей природы, 1948. 183 с.
2. Бородачев А. В., Бородачева В. Т. Хозяйственная ценность межпородных помесей // Пчеловодство. 1982. № 9. С. 13 - 15.
3. Бояршинов Б. Д., Коробов Н. В., Шураков А. И., Петухов А. В., Симанков М. К. В камском приуралье // Пчеловодство. 2001. № 5. С. 16 - 18.
4. 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. С. 75 - 79.
5. 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. С. 72 - 74.
6. 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. С. 855 - 858.
7. 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. С. 320 - 331.
8. Ильясов Р. А., Шареева З. В. Действие флувалината и амитраза на семью пчел // Пчеловодство. 2014. № 6. С. 30 - 32.
9. Калашников А. Е. Изучение дифференциации отечественных популяций медоносной пчелы *Apis mellifera* и их инфицированности РНК-содержащими вирусами с помощью молекулярно-генетических методов // Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. Дубровицы: ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии. 2013. С. 21.
10. Каскинова М. Д., Ильясов Р. А., Поскряков А. В., Николенко А. Г. Анализ генетической структуры популяций медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) // Генетика. 2015. Т. 51. № 10. С. 1199 - 1202.
11. Колбина Л. М., Непейвода С. Н., Ильясов Р. А., Поскряков А. В., Николенко А. Г. Использование морфологических и молекулярно-генетических методов для

- исследования *Apis mellifera* // Аграрная наука Евро–Северо–Востока. 2007. Т. 2. № 10. С. 57 - 58.
12. Никоноров Ю. М., Беньковская Г. В., Поскряков А. В., Николенко А. Г., Вахитов В. А. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала // Генетика. 1998. Т. 34. № 11. С. 1574 - 1577.
  13. Островерхова 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. С. 89 - 100.
  14. Сагтаров В. Н., Туктаров В. Р., Борисов И. М., Мигранов М. Г., Хабиров А. Ф. Некоторые аспекты оценки морфометрических признаков медоносной пчелы // Пчеловодство. 2010. № 7. С. 10 - 11.
  15. Сафиуллин Р. Р. Племенные ресурсы среднерусских пчел Республики Татарстан // Пчеловодство. 2013. № 3. С. 8 - 9.
  16. Талипов А. Н., Янбаев Ю. А., Юмагужин Ф. Г. Морфологическая и генетическая изменчивость пчелы медоносной (*Apis mellifera mellifera* L.) в Башкирском Зауралье. Уфа: РИО Башкирского Государственного Университета, 2007. 110 с.
  17. Форнара М. С. Характеристика аллелофонда и дифференциация пород и популяций медоносной пчелы с использованием микросателлитов // Автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. Дубровицы: ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии. 2012. С. 19.
  18. Янбаев Ю. А., Косарев М. Н., Бахтиярова Р. М., Николенко А. Г. Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия. Уфа: БГУ, 2000. 108 с.
  19. Biasiolo A., Comparini A. Esterase - 6 locus, a new enzyme polymorphism in *Apis mellifera* // Apidologie. 1990. V. 21. No. 2. P. 123 - 126.
  20. Bookstein F. L. Morphometric Tools for Landmark Data, Geometry and Biology. New York, USA: Cambridge University Press, 1991. 435 p.
  21. Brumfield R. T., Beerli P., Nickerson D. A., Edwards S. V. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history // Trends in Ecology and Evolution. 2003. V. 18. P. 249 - 256.
  22. Cánovas F., De la Rúa P., Serrano J., Galián J. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae) // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. 2008. V. 46. No. 1. P. 24 - 30.
  23. Chapuis M. P., Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // Molecular Biology and Evolution. 2007. V. 24. No. 3. P. 621 - 631.
  24. Clarke K. E., Rinderer T. E., Franck P., Quezada-Euan J. J. G., Oldroyd B. P. The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time // Evolution. 2002. V. 56. No. 7. P. 1462 - 1474.
  25. Collet T., Ferreira K. M., Arias M. C., Soares A. E.E., Del Lama M. A. Genetic structure of Africanized honey bee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI–COII patterns // Heredity. 2006. V. 97. P. 329 - 335.
  26. Cornuet J. M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals // Genetics. 1999. V. 153. P. 1989 - 2000.
  27. Crozier Y. C., Koulianos S., Crozier R. H. An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA // Experientia. 1991. V. 47. No. 9. P. 968 - 969.
  28. De la Rúa P., Galián J., Pedersen B. V., Serrano J. Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores // Apidologie. 2006. V. 37. P. 699 - 708.
  29. Del Lama M. A., Lobo J. A., Soares A. E.E., Del Lama S. N. Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized honey bee populations from Brazil and from Central America // Apidologie. 1990. V. 21. P. 271 - 280.
  30. Dews J. E., Milner E. Breeding better bees using simple modern methods. Derby, UK: British Isle Bee Breeder's Association, 1991. 51 p.
  31. Drabovich A. P., Krylov S. N. Identification of base pairs in single-nucleotide polymorphisms by MutS protein-mediated capillary electrophoresis // Analytical Chemistry. 2006. V. 78. No. 6. P. 2035 - 2038.
  32. Estoup A., Tailliez C., Cornuet J. M., Solignac M. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). // Molecular Biology and Evolution. 1995. V. 12. No. 6. P. 1074 - 1084.
  33. Evans J. D., Schwarz R. S., Chen Y. P., Budge G., Cornman R. S. Standard methods for molecular research in *Apis mellifera* // Journal of Apicultural Research. 2013. V. 52. No. 4. P. 1 - 56.

34. Whitfield C. W., Behura S. K., Berlocher S. H., Clark A. G., Johnston J. S., Sheppard W. S., Smith D. R., Suarez A. V. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera* // Science. 2006. V. 314. No. October. P. 642 - 645.
35. Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J. M. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*) // Molecular Ecology. 2000. V. 9. No. 7. P. 907 - 921.
36. Garnery L., Franck P., Baudry E. Genetic biodiversity of the West European honeybee (*Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera iberica*). II. Microsatellite loci // Genetics, Selection and Evolution. 1998. V. 30. P. 49 - 74.
37. Gartside D. F. Similar allozyme polymorphism in honeybees (*Apis mellifera*) from different continents // Experientia. 1980. V. 36. P. 649 - 650.
38. Griffin T. J., Smith L. M. Genetic identification by mass spectrometric analysis of single-nucleotide polymorphisms: ternary encoding of genotypes // Analytical Chemistry. 2000. V. 72. No. 14. P. 3298 - 3302.
39. Hall H. G., Smith D. R. Distinguishing African and European honey bee matrilineages using amplified mitochondrial DNA // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991. V. 88. P. 4548 - 4552.
40. Halliday R. B. Heterozygosity and genetic distance in sibling species of meat ants (*Iridomyrmex purpureas* group) // Evolution. 1981. V. 35. P. 234 - 242.
41. Hoffman E. A., Kovacs J. L., Goodisman M. A.D. Genetic structure and breeding system in a social wasp and its social parasite // BMC Evolutionary Biology. 2008. V. 8. P. 1 - 13.
42. Ilyasov R.A., Kutuev L.A., Poskryakov A.V., Petukhov A.V., Nikolenko A.G. Phylogenetic relationships of dark European honeybees *Apis mellifera mellifera* L. from the Russian Ural and west European populations // Journal of Apicultural science. 2011. V. 55. No. 1. P. 67 - 77.
43. Ivanova E., Bienkowska M., Petrov P. Allozyme polymorphism and phylogenetic relationships in *Apis mellifera* subspecies selectively reared in Poland and Bulgaria // Folia biologica. 2011. V. 59. P. 3 - 4.
44. Ivanova E., Staykova T., Petrov P. Allozyme variability in populations of local Bulgarian honey bee // Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2010. V. 24. No. 2. P. 371 - 374.
45. Ivanova E. N., Staykova T. A., Bouga M. Allozyme variability in honey bee populations from some mountainous regions in the southwest of Bulgaria // Journal of Apicultural Research. 2007. V. 46. No. 1. P. 3 - 7.
46. Jensen A. B., Palmer K. A., Boomsma J. J., Pedersen B. V. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe // Molecular Ecology. 2005. V. 14. No. 1. P. 93 - 106.
47. Jensen A. B., Pedersen B. V. Honeybee Conservation: a case story from Læsø island, Denmark // Beekeeping and conserving biodiversity of honeybee. Sustainable bee breeding. Hebden Bridge: Northern Bee Books. 2005. P. 142 - 164.
48. Kandemir I., Ozkan A., Fuchs S. Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: a geometric morphometric approach // Apidologie. 2011. V. 42. No. 5. P. 618 - 627.
49. Kozmus P., Jevrosima S., Stanimirovic Z., Stojic V., Kulicic Z., Meglic V. Analysis of mitochondrial DNA in honey bees (*Apis mellifera*) from Serbia // Acta Veterinaria-Beograd. 2007. V. 57. No. 5 - 6. P. 465 - 476.
50. Lobo J. A., Del Lama M. A., Mestriner M. A. Population differentiation and racial admixture in the Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.) // Evolution. 1989. V. 43. P. 794 - 802.
51. Maul V., Hähnle A. Morphometric studies with purebred stock of *Apis mellifera carnica* Pollmann from Hessen // Apidologie. 1994. V. 25. P. 19 - 132.
52. Miguel I., Baylac M., Iriondo M., Manzano C., Garnery L., Estomba A. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch // Apidologie. 2011. V. 42. No. 2. P. 150 - 161.
53. Muñoz I., Dall'Olio R., Lodesani M., De la Rua P. Estimating introgression in *Apis mellifera siciliana* populations: are the conservation islands really effective? // Insect Conservation and Diversity. 2014. V. 7. No. 6. P. 563 - 571.
54. Nielsen D. J., Ebert P. R., Page R. E., Hunt G. J., Guzman-Novoa E. Improved polymerase chain reaction-based mitochondrial genotype assay for identification of the Africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae) // Annals of Entomological Society of America. 2000. V. 93. P. 1 - 6.
55. Obrecht E., School A. Enzymeelektrophoretische Untersuchungen zur Analyse der Verwandtschaftsgrade zwischen Hummel, und Schmarotz- hummelarten (Apidae, Bombini) //

- Apidologie. 1981. V. 12. P. 257 - 268.
56. Oleksa A., Chybicki I., Tofilski A., Burczyk J. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland // Journal of Apicultural Research. 2011. V. 50. No. 2. P. 116 - 129.
  57. Pinto M. A., Henriques D., Ch'avez-Galarza J., Kryger P., Garnery L., van der Zee R., Dahle B., Soland-Reckeweg G., de la R'ua P., Dall'Olio R., Carreck N. L., Johnston J. S. Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data // Journal of Apicultural Research. 2014. V. 53. No. 2. P. 269 - 278.
  58. Pinto M. A., Johnston J. S., Rubink W. L., Coulson R. N., Patton J. C., Sheppard W. S. Identification of africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae) Mitochondrial DNA: validation of a rapid polymerase chain reaction-based assay // Annals of the Entomological Society of America. 2003. V. 96. No. 5. P. 679 - 684.
  59. Rukhsana K., Akhilesh V.P., Sebastian C.D. Deciphering the molecular phylogenetics of the Asian honey bee, *Apis cerana* and inferring the phylogeographical relationships using DNA barcoding // Journal of Zoology and Entomology Studies. 2014. V. 2. No. 4. P. 218 - 220.
  60. Ruttner F. Biogeography and Taxonomy of Honey bees. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 288 p.
  61. Sheppard W. S., Berlocher S. H. New allozyme variability in Italian honey bees // Journal of Heredity. 1985. V. 76. P. 45 - 48.
  62. Smith D. R., Glenn T. C. Allozyme polymorphisms in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*) // Journal of Heredity. 1995. V. 86. No. 1. P. 12 - 16.
  63. Smith D. R. Mitochondrial DNA and honeybee biogeography // Diversity in the genus *Apis*. Boulder, CO: Westview Press. 1991. P. 131 - 176.
  64. Sobrino B., Brion M., Carracedo A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies // Forensic Science International. 2005. V. 154. No. 2 - 3. P. 181 - 194.
  65. Soland-Reckeweg G., Heckel G., Neumann P., Fluri P., Excoffier L. Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera* // Journal of Insect Conservation. 2009. V. 13. P. 317 - 328.
  66. Solignac M., Vautrin D., Pizzo A., Navajas M., Le Conte Y., Cornuet J.M. Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives // Molecular Ecology Notes. 2003. V. 3. No. 4. P. 556 - 559.
  67. Spötter A., Gupta P., Nürnberg G., Reinsch N., Bienefeld K. Development of a 44K SNP assay focussing on the analysis of a varroa-specific defence behaviour in honey bees (*Apis mellifera carnica*) // Molecular Ecology Resources. 2012. V. 12. No. 2. P. 323 - 332.
  68. Stevanovic J., Stanimirovic Z., Radakovic M., Kovacevic S.R. Biogeographic Study of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia Based on Mitochondrial DNA Analyses // Russian Journal of Genetics. 2010. V. 46. No. 5. P. 603 - 609.
  69. Sylvester H. A. Biochemical genetics // Bee genetics and breeding. Orlando, Florida: Academic Press. 1986. P. 177 - 203.
  70. Tautz D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences // DNA fingerprinting state of the science. Basel, Switzerland: Birkhauser. 1990. P. 21 - 28.
  71. Tunca R. I., Kence M. Genetic diversity of honey bee (*Apis mellifera* L.: Hymenoptera: Apidae) populations in Turkey revealed by RAPD markers // African Journal of Agricultural Research. 2011. V. 6. No. 29. P. 6217 - 6225.
  72. Uzunov A., Meixner M. D., Kiprijanovska H., Andonov S., al. E. Genetic structure of *Apis mellifera macedonica* in the Balkan Peninsula based on microsatellite DNA polymorphism // Journal of Apicultural Research. 2014. V. 53. No. 2. P. 288 - 295.
  73. Wallberg A., Han F., Wellhagen G. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* // Nature Genetics. 2014. V. 46. P. 1081 - 1088.
  74. Whitfield C. W., Behura S. K., Berlocher S. H., Clark A. G., Johnston J. S., Sheppard W. S., Smith D. R., Suarez A. V., Weaver D., Tsutsui N. D. Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera* // Science. 2006. V. 314. No. 5799. P. 642 - 645.
  75. Zayed A., Whitfield C. W. A genome-wide signature of positive selection in ancient and recent invasive expansions of the honey bee *Apis mellifera* // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008. V. 105. No. 9. P. 3421 - 3426.

## BASIC METHODS OF IDENTIFICATION OF HONEYBEE SUBSPECIES *APIS MELLIFERA*

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

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,  
450054, Ufa, Prospekt Octyabrya, 71 \* E-mail: [apismell@hotmail.com](mailto:apismell@hotmail.com)

### Resume

The honey bee is the most important factor that forms the external and internal structure of biocenoses through pollination. For each biocenosis is important not only the number of bees, but also their traits, which, in first is determined by their taxonomic affiliation. This is due to the fact that different subspecies of bees have a different preference for the species of plants. To preserve a purebred gene pool of honeybee subspecies, precise identification of the taxonomic belonging of honeybee colonies is necessary. We have described a methods of identification of taxonomic affiliation of honeybee colonies are considered. The most promising for the conservation of purebred gene pools of honeybee subspecies are methods of the analysis of single nucleotide polymorphisms SNPs.

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