



ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ВЫБОРКИ НА ОЦЕНКУ ПОДВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ *APIS MELLIFERA MELLIFERA*

Каскинова М.Д., Гайфуллина Л.Р., Соколянская М.П., Салтыкова Е.С.

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия, E-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

Резюме

В данной работе приводится сравнительный анализ результатов оценки принадлежности к подвиду *Apis mellifera mellifera* в зависимости от количества проанализированных образцов с семьи. Подвидовую принадлежность установили при помощи микросателлитных локусов *Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28* ядерной ДНК и локуса *COI-COII* митохондриальной ДНК. Установлено, что при анализе пчел на принадлежность к подвиду *A. m. mellifera* важно использовать как минимум три пробы с каждой семьи. Это увеличивает время и стоимость анализа, но дает надежные результаты для дальнейшей селекционной работы. Кроме того, была выявлена роль благоприятного трутневого фона для селекции *A. m. mellifera*.

Ключевые слова: локус *COI-COII*; микросателлиты; *Apis mellifera mellifera*

Цитирование: Каскинова М.Д., Гайфуллина Л.Р., Соколянская М.П., Салтыкова Е.С. Влияние размера выборки на оценку подвидовой принадлежности *Apis mellifera mellifera* // *Biomics*. 2023. Т.15(2). С.82-86.
DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-11

© Авторы

EFFECT OF SAMPLE SIZE ON THE ASSESSMENT OF THE *APIS MELLIFERA MELLIFERA* SUBSPECIES

Kaskinova M.D., Gaifullina L.R., Sokolyanskaya M.P., Saltykova E.S.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia
E-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

Resume

This paper provides a comparative analysis of the results of assessing belonging to the subspecies *Apis mellifera mellifera*, depending on the number of analyzed samples from the one colony. Subspecies identification was established using microsatellite loci *Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28* of nuclear DNA and the *COI-COII* locus of mitochondrial DNA. We found that when analyzing bees for belonging to the *A. m. mellifera*, it is important to use at least three samples from each colony. This increases the time and cost of analysis, but gives reliable results for further breeding work. In addition, the role of a favorable drone background for the selection of *A. m. mellifera* was shown.

Key words: *COI-COII* loci; microsatellite loci; *Apis mellifera mellifera*

Citation: Kaskinova M.D., Gaifullina L.R., Sokolyanskaya M.P., Saltykova E.S. Effect of sample size on the assessment of the *Apis mellifera mellifera* subspecies. *Biomcs*. 2023. V.15(2). P. 82-86. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-11 (In Russian)

© The Authors

Введение

На территории России остался обширный, но довольно фрагментированный ареал обитания темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera*. Этот подвид принадлежит к эволюционной ветви М. Выделяют четыре основные эволюционные ветви: ветвь М (северо- и западно-европейские подвиды *A. m. mellifera* и *A. m. iberiensis*), А (африканские подвиды *A. m. scutellata*, *A. m. sahariensis* и др.), ветвь С (подвиды из юго-восточной Европы *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* и др.) и ветвь О (ближневосточные и западно-азиатские *A. m. caucasica*, *A. m. anatolica* и др.) [Ruttner, 1988; De la Rúa et al., 2009; Meixner et al., 2013; Cridland et al., 2017]. Неконтролируемый импорт пчел привел к массовой гибридизации и потере местной популяции медоносных пчел на большей территории России. Перед лабораторией биохимии адаптивности насекомых была поставлена задача научиться различать подвид *A. m. mellifera* от интродуцированных подвидов *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. caucasica* с помощью надежных генетических маркеров. С помощью метода, основанного на анализе полиморфизма межгенного локуса *COI-COII* (или *tRNA^{Leu}-COII*) митохондриальной ДНК [Garner et al., 1998] стало возможным определить происхождение пчел по материнской линии, но невозможно было оценить влияние трупного фона. Для установления уровня гибридизации семей нами был использован метод, основанный на анализе полиморфизма микросателлитных локусов [Solignac et al., 2003]. Мы отобрали локусы, которые проявили наибольшую дифференцирующую способность для выборок *A. m. mellifera*, *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. caucasica*, отобранных нами из разных регионов России, а также Узбекистана. Набор из девяти микросателлитных локусов *Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28* позволил дифференцировать подвид *A. m. mellifera* от представителей эволюционных ветвей С и О. С помощью данного метода были обнаружены сохранившиеся популяции *A. m. mellifera* на территории РБ и частично в других регионах России [Ильясов и др. (Ilyasov et al.), 2007; Каскинова и др. (Kaskinova et al.), 2022].

Как правило, для оценки принадлежности к *A. m. mellifera* с целью мониторинга мы используем только одну пробу с семьи. Если же пчеловоды

планируют использовать наши результаты для селекционной работы, мы проводим анализ дополнительных проб с каждой семьи. В данной работе мы хотим установить, зависят ли результаты оценки принадлежности к подвиду *A. m. mellifera* от количества проанализированных образцов с семьи.

Материалы и методы

В исследовании были использованы рабочие пчелы *A. m. mellifera* из Республики Башкортостан (РБ, Иглинский район N=12 семей, отобранные в 2019 г.; Янаульский район N=30 семей, отобранные в 2020 г.) и Татарстан (РТ, Мамадышский район, N=5, отобранные в 2022 г.). В качестве референсной группы эволюционной ветви М были использованы выборки *A. m. mellifera* из Бурзянского района РБ и Пермского края (N=136). Выборки из Краснодарского края, Республики Адыгея и Узбекистана (N=120) были использованы в качестве представителей эволюционной ветви С и О.

Выделение ДНК проводили из трех пчел с семьи с помощью набора реактивов ДНК-ЭКСТРАН-2 (Синтол, Москва). Исследование включало ПЦР-анализ локуса *COI-COII* мтДНК и микросателлитных локусов *Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28*. Смесь ПЦР состояла 17 мкл дистиллированной воды, 2 мкл магниевого буфера, 0,4 мкл dNTP (10 мкм), 0,6 мкл F- и R- праймера (2 ОЕ) и 0,3 мкл Taq-полимеразы. Режим ПЦР: 5 мин 94°C, затем 30 циклов с денатурацией 30 сек при 94°C, отжигом 30 сек при 55°C, элонгацией 60 сек при 72°C и конечной элонгацией 7 мин при 72°C (термоциклер T100, Bio-Rad Laboratories). Для визуализации продуктов амплификации использовали электрофорез в 8% полиакриламидном геле с последующей детекцией в фотосистеме Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories).

Для определения генетической структуры популяций медоносной пчелы была использована программа Structure 2.3.4 с заданным числом кластеров от 1 до 10. Количество предполагаемых групп (K) рассчитывали в Structure Harvester. Анализ был выполнен при помощи модели Admixture с указанием информации о географической локализации выборок (LocPrior) и с Burnin Period и MCMC равных 10 000 и 100 000 повторов соответственно. Результаты анализа обрабатывали в CLUMPP 1.1.2 с помощью алгоритма FullSearch.

Результаты и обсуждение

С помощью анализа полиморфизма межгенного локуса *COI-COII* мтДНК и девяти микросателлитных локусов нами была проанализирована генетическая структура исследуемых выборок. Анализ локуса *COI-COII* подтвердил, что все исследуемые семьи происходят от эволюционной ветви М по материнской линии. Все семьи из РБ имеют аллельный вариант PQQ локуса *COI-COII*, в РТ две семьи имеют вариант PQQ и три семьи - PQQQ.

В таблице 1 представлены результаты кластерного анализа в зависимости от количества проанализированных образцов с одной семьи. Средние показатели с увеличением количества проб немного улучшились только для пасеки из Иглинского района РБ. Показатели для янаульской выборки держатся на одном уровне и не зависят от числа проб. Для выборки из РТ наблюдается снижение доли М на 0.07.

Таблица 1. Средние значения результатов кластерного анализа для исследуемых пасек в зависимости от числа проб пчел с семьи

Table 1 - The average values of the cluster analysis results for the studied apiaries, depending on the number of bee samples from the family

Число проб с семьи Number of samples per family	РБ, Иглинский район RB, Iglinsky district		РБ, Янаульский район RB, Yanaulsky district		РТ, Мамадышский район RT, Mamadyshsky district	
	доля М portion M	доля C/O portion C/O	доля М portion M	доля C/O portion C/O	доля М portion M	доля C/O portion C/O
1	0.842	0.158	0.972	0.028	0.948	0.052
2	0.846	0.154	0.970	0.030	0.884	0.116
3	0.854	0.146	0.967	0.033	0.878	0.122

По средним значениям сложно сказать, что увеличение числа проанализированных проб как-то влияет на полученные результаты. Чтобы оценить влияние числа проб на результаты оценки принадлежности к подвиду *A. m. mellifera* необходимо рассмотреть индивидуально каждую семью.

На рисунке 1 представлены результаты кластерного анализа выборки из Иглинского района. Для семей под номерами 3, 4, 6, 8 и 9 были получены неоднородные данные. Так, в семье № 3 показатели интрогрессии генофонда ветвей C/O составили 0.78 для первого образца из семьи, 0.43 для второго и 0.76 для третьего (среднее 0.66). В семье №4 - 0.48, 0.74 и 0.94 (0.72), в семье № 6 - 0.95, 0.57 и 0.97 (0.83), в семье № 8

- 0.63, 0.85 и 0.60 (0.69), в семье № 9 - 0.95, 0.96 и 0.71 (0.87). К подвиду *A. m. mellifera* относятся семья с аллельным вариантом P(Q)_{1-n} и долей генофонда М > 0.88 [Каскинова и др. (Kaskinova et al.), 2022]. Следовательно, анализ только одного образца в семьях № 4, 6 и 9 привел бы к получению недостоверных представлений об их подвиговой принадлежности. Такой разброс в результатах наблюдается из-за полиандрии пчел - матка спаривается с несколькими трутнями, часть из которых могут соответствовать подвиду *A. m. mellifera*, часть иметь гибридное происхождение или же вовсе принадлежать к подвидам из эволюционных ветвей C/O.

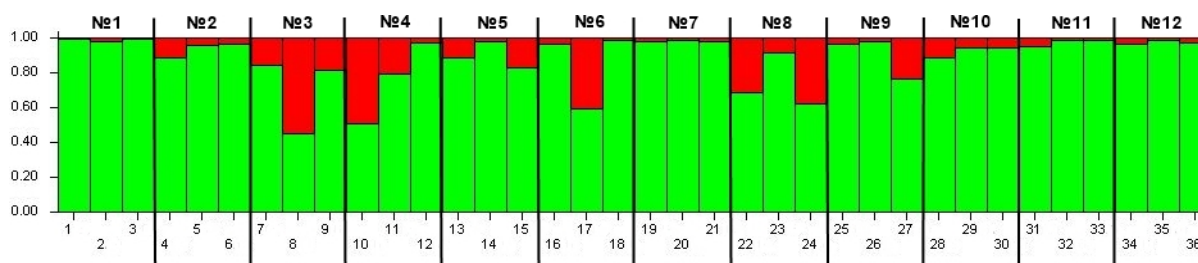


Рис. 1. Генетическая структура выборки из Иглинского района Республики Башкортостан
Fig. 1. Genetic structure of the sample from the Iglinsky district of the Republic of Bashkortostan

Такая же картина наблюдается в пасеке из Мамадышского района РТ (рис. 2). В семье № 1 показатели интродукции генофонда ветвей С/О составили 0.93 для первого образца, 0.82 для второго и 0.76 для третьего (среднее 0.84). В семье № 2 - 0.97, 0.45 и 0.84 (0.75), в семье № 5 - 0.92, 0.87 и 0.79 (0.86).

В выборке из Янаульского района генетическая структура для всех семей однородная (рис. 3). Это говорит о наличии благоприятного тропического фона в данной пасеке.

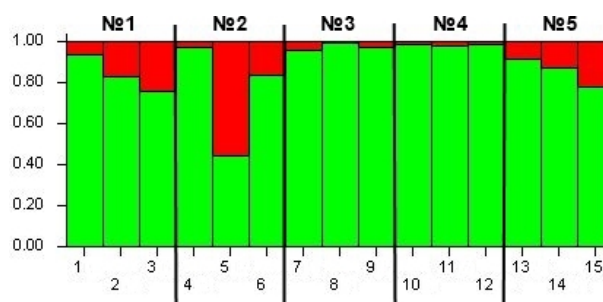


Рис. 2. Генетическая структура выборки из Мамадышского района Республики Татарстан
Fig. 2. Genetic structure of the sample from Mamadyshsky district of the Republic of Tatarstan

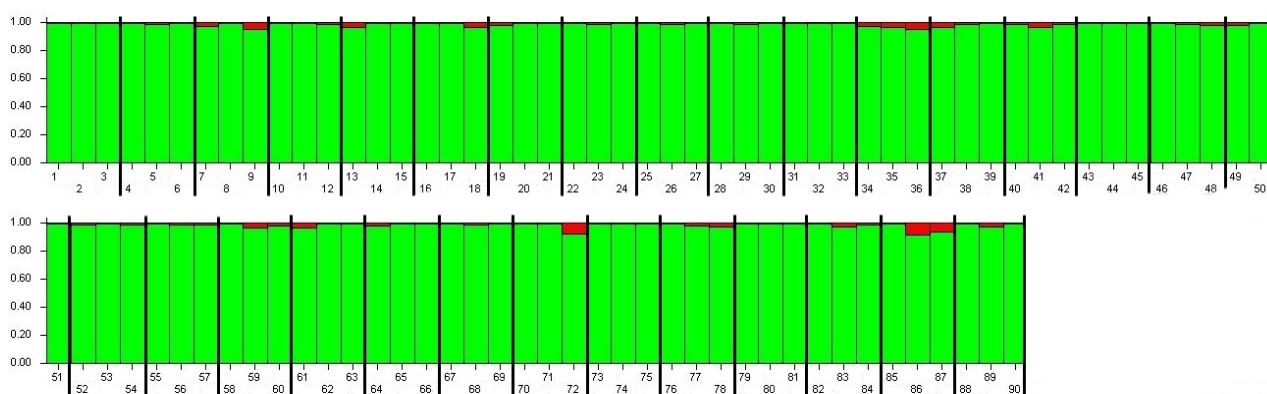


Рис. 3. Генетическая структура выборки из Янаульского района Республики Башкортостан
Fig. 3. Genetic structure of the sample from the Yanaulsky district of the Republic of Bashkortostan

Следовательно, при анализе пчел на принадлежность к подвиду *A. m. mellifera* важно использовать как минимум три пробы. Это увеличивает время и стоимость работы, но дает надежные результаты для дальнейшей селекционной работы.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания № 122041400162-3 с использованием ресурсов ЦКП УФИЦ РАН «Агидель».

Литература

1. Ильясов Р.А., Петухов А.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Локальные популяции *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // Генетика. 2007. Т.43(6). С.855 – 858.
2. Каскинова М.Д., Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е.С., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Динамика генетической структуры популяций медоносной пчелы *Apis mellifera* на Южном Урале // Генетика. 2022. Т.58(1). С. 45–51. DOI: 10.31857/S0016675822010040
3. Cridland J.M., Tsutsui N.D., Ramirez S.R. The complex demographic history and evolutionary origin of

- the western honey bee, *Apis mellifera* // Genome Biol. Evol. 2017. V.9. P.457–472. DOI: 10.1093/gbe/2Fgbe%2Fevx009
4. De la Rúa P., Jaffe R., Dall'Olio R., Munoz I., Serrano J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees // Apidologie. 2009. V.40. P. 263–284. DOI: 10.1051/apido/2009027
 5. Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.-M., Solignac M. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA // Genet. Sel. Evol. 1998. V.30(Suppl. 1). S31. DOI:10.1186/1297-9686-30-S1-S31
 6. Meixner M.D., Pinto M.A., Bouga M., Kryger P., Ivanova E., Fuchs S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera* // J. Apic. Res. 2013. V.52. P. 1–28. DOI:10.3896/IBRA.1.52.4.05
 7. Ruttner F. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer, Berlin, 1988. 291 p. DOI: 10.1007/978-3-642-72649-1
 8. Solignac M., Vautrin D., Loiseau A., Mougél F., Baudry E., Estoup A., Garnery L., Haberl M., Cornuet J.-M. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome //

Molecular Ecology Notes. 2003. V.3. P.307-311. DOI:10.1046/j.1471-8286.2003.00436.x

References

1. Cridland J.M., Tsutsui N.D., Ramírez S.R. The complex demographic history and evolutionary origin of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Biol. Evol.* 2017. V.9. P. 457–472. DOI: 10.1093/gbe/evx009
2. De la Rúa P., Jaffé R., Dall'Olio R., Muñoz I., Serrano J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*. 2009. V.40. P. 263–284. DOI: 10.1051/apido/2009027
3. Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.-M., Solignac M. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA. *Genet. Sel. Evol.* 1998. V.30(Suppl. 1). S31. DOI: 10.1186/1297-9686-30-S1-S31
4. Il'yasov R.A., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G., Petukhov A.V. Local honeybee (*Apis mellifera mellifera* L.) populations in the Urals. *Russian Journal of Genetics*. 2007. V. 43(6). P. 709-711. DOI: 10.1134/S1022795407060166
5. Kaskinova M.D., Gaifullina L.R., Saltykova E.S., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Dynamics of the genetic structure of *Apis mellifera* populations in the southern Urals. *Russian Journal of Genetics*. 2022. V. 58(1). P. 36-41. DOI: 10.1134/S1022795422010045
6. Meixner M.D., Pinto M.A., Bouga M., Kryger P., Ivanova E., Fuchs S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 2013. V.52. P. 1–28. DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.05
7. Ruttner F. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer, Berlin, 1988. 291 p. DOI:10.1007/978-3-642-72649-1
8. Solignac M., Vautrin D., Loiseau A., Mougel F., Baudry E., Estoup A., Garnery L., Haberl M., Cornuet J.-M. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Molecular Ecology Notes*. 2003. V.3. P.307-311. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2003.00436.x