



НОВЫЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА СЕМЕЙ ТЕМНОЙ ЛЕСНОЙ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFERA MELLIFERA* НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

*Р.А. Ильясов, ¹**М.Н. Косарев, А.В. Поскряков, А.Г. Николенко

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

¹Государственный природный биосферный заповедник «Шульган-Таш». 453585, Россия, Республика Башкортостан, Бурзянский район, деревня Иргизлы, ул. Заповедная 4, **E-mail: mnkos@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В России и странах Западной и Северной Европы темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* была признана наиболее эффективной для коммерческого разведения. Ранее пчеловоды северных стран были другого мнения и ставили массовые эксперименты по интродукции и разведению подвидов из Южной и Восточной Европы на своих пасеках. Такое развитие событий привело к массовой интрогрессии генов южных пчел в популяции темной лесной пчелы и стало результатом потери чистоты аборигенного генофонда. Для восстановления генофонда темной лесной пчелы в пределах исторического ареала необходимо проводить селекцию пчелиных семей на основе генетической стандартизации в сохранившихся изолятах *A.m.mellifera*. По результатам анализа уровня интрогрессии южных генов и оценки уровня средней гетерозиготности по данным полиморфизма 9 микросателлитных локусов мы показали возможность идентификации пчелиных семей с оптимальным генетическим потенциалом. Мы обнаружили, что генетический потенциал пчелиных семей, обитающих в естественных и искусственных дуплах (бортях и колодах) в условиях дикой природы, поддерживается эффективнее по сравнению с семьями, разводимыми в ульях на пасеках.

Ключевые слова: *Apis mellifera mellifera*, бортевая темная лесная пчела, бурзянский экотип темной лесной пчелы, генетическое разнообразие семьи пчел, интрогрессия южных генов, оптимальный генетический потенциал семьи пчел, сохранение генетического разнообразия, гибридизация подвидов.

ВВЕДЕНИЕ

Деятельность человека оказывает существенное влияние на распространение медоносной пчелы *Apis mellifera*. Из 30 известных подвидов пчел, распространенных на всей территории Старого Света, 24 аллопатрических подвида населяют Европу [Ruttner 1988; Hepburn, Radloff, 1998; Engel, 1999; Sheppard, Meixner, 2003; Meixner et al., 2011; Ильясов и др., 2015]. Из всех европейских пчел только темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* приспособлена к обитанию в условиях резко-континентального климата Северной Европы с длительными морозными зимами [Ильясов и др., 2012]. Межрегиональные транспортировки пчел привели к фрагментации, сокращению численности аборигенных популяций пчел и смешению подвидов [Ruttner 1988; Garnery et al., 1998; Franck et al., 2001; De la Rua et al., 2002;

Schneider et al., 2004; Jensen et al., 2005].

За последние 100 лет в результате массовых транспортировок подвидов пчел, таких как *A.m.ligustica*, *A.m.carnica*, *A.m.carpatica*, *A.m.caucasica*, *A.m.cecropia*, относящихся к эволюционной ветви С, из Восточной и Южной Европы в Северную и Западную, генофонд популяции темной лесной пчелы был практически полностью уничтожен [Bouga et al., 2005; Uzunov et al., 2009; Stevanovic et al., 2010; Uzunov et al., 2014].

Темная лесная пчела *A.m.mellifera*, представитель эволюционной ветви М [Jensen et al., 2005; Whitfield et al., 2006; Soland-Reckeweg et al., 2009; Oleksa et al., 2011; Pinto et al., 2014; Wallberg et al., 2014], на сегодняшний день признана подвидом, находящимся под угрозой вымирания в результате массовой интрогрессии генофонда подвидов пчел эволюционной ветви С [Jensen et al., 2005; Muñoz et

al., 2009; Soland-Reckeweg et al., 2009; Oleksa et al., 2011; Nedić et al., 2014; Pinto et al., 2014; Uzunov et al., 2014].

Исследования последних лет показали, что в Европе сохранились небольшие изоляты темной лесной пчелы с той или иной степенью интрогрессии южных генов. А. Oleksa et al. (2011) на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов A7, A24, A28, A88, A113, Ap43, Ap55, Ap66, Ap81 показали до 30% интрогрессии аллелей южных подвидов в популяциях темной лесной пчелы *A.m.mellifera* в Восточной Польше. А.В. Jensen et al. (2005) на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов A7, A8, A24, A28, A43, A88, A113, Ap36, Ap43, B124, A79 обнаружили в популяциях северного экотипа «Brown» темной лесной пчелы в Скандинавских странах до 10% интрогрессии аллелей южных подвидов. G. Soland-Reckeweg et al. (2009) на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов A007, A28, A43, Ac306, Ap33, Ap273, Ap226, Ap289, B24, A29, A76, Ap1 показали до 70% интрогрессии аллелей южных подвидов в популяциях альпийского экотипа «Nigra» темной лесной пчелы. J.P. Strange et al. (2008) на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов A7, A24, A28, A88, A113, B124, Ap43, Ap55, Ap66, Ap81 показали до 20% интрогрессии аллелей южных подвидов в популяциях экотипа «Landes» темной лесной пчелы во Франции. А.Г. Николенко, А.В. Поскряков (2002) и Р.А. Ильясов с соавт. (2007) на основе анализа полиморфизма локуса COI-COII мтДНК показали до 2% интрогрессии в популяции «Бурзянского» экотипа темной лесной пчелы в Республике Башкортостан. Оценка уровня интрогрессии южных генов в популяции «Бурзянского» экотипа темной лесной пчелы по ядерному геному ранее не проводилась. Таким образом, все сохранившиеся изоляты темной лесной пчелы в Европе содержат следы интрогрессии южных подвидов эволюционной ветви С.

Риск загрязнения аборигенного генофонда темной лесной пчелы постоянно растет как в России, так и в Европе по причине интенсификации сельского хозяйства и отсутствия эффективного законодательного регулирования пчеловодства. В результате бесконтрольных перемещений пчел из южных регионов на северные территории аборигенного обитания темной лесной пчелы происходит интрогрессия генов завезенных пчел в аборигенный генофонд темной лесной пчелы в результате миграции трутней. В итоге аборигенная популяция темной лесной пчелы постепенно теряет адаптированность к местным условиям среды, которая была сформирована в течение длительной

эволюции [Jensen et al., 2005; Soland-Reckeweg et al., 2009; Rortais et al., 2011; De la Rúa et al., 2013; Ильясов и др., 2015в]. Риску генетического загрязнения подвержена и популяция «Бурзянского» экотипа темной лесной пчелы, генетическая изоляция и эффективная численность которой поддерживается небольшим количеством людей в условиях дефицита финансового обеспечения [Николенко, Поскряков, 2002; Ильясов и др., 2007; Ильясов и др., 2015а].

Для успешного сохранения популяции темной лесной пчелы необходимо проводить генетическую стандартизацию с целью идентификации пчелиных семей с минимальным уровнем интрогрессии генов южных подвидов и оптимальным генетическим разнообразием. Генетическое разнообразие в популяции пчел является материалом для естественного отбора и генетического дрейфа и служит основой для протекания микроэволюционных процессов [Jensen et al., 2005; Soland-Reckeweg et al., 2009; Oleksa et al., 2011; Muñoz et al., 2012; Pyasov et al., 2015]. Генетическое разнообразие пчелиных семей является основой экологической пластичности, которая характеризует приспособленность популяции пчел к изменяющимся условиям окружающей среды [De la Rúa et al., 2009; Dietemann et al., 2009; Meixner et al., 2010; Ильясов и др., 2015б].

Оценка генетического разнообразия имеет важное значение при разработке стратегий сохранения и рационального использования генофонда медоносной пчелы [van Engelsdorp, Meixner, 2010; Hargur et al., 2012; De la Rúa et al., 2013; Hargur et al., 2013; Pinto et al., 2014]. В 1995 году в Европе был запущен международный проект по оценке и поддержанию генетического разнообразия домашних животных MoDAD (the Maintenance of Domestic Animal Genetic Diversity). Проект предусматривал количественную оценку генетического разнообразия популяций домашних животных на основе микросателлитных локусов [Weigend et al., 2002]. В 2014 году в Европе был запущен международный проект SmartBees по оценке и сохранению генетического разнообразия в популяциях темной лесной пчелы *A.m.mellifera* в Европе. Уральская популяция темной лесной пчелы до сих пор остается неизученной ни одним из европейских и российских проектов, поэтому стратегия сохранения генетического разнообразия этой популяции еще не разработана.

Основу генетического разнообразия составляет гетерозиготность, поэтому оценка величины средней гетерозиготности по всем локусам будет характеризовать уровень

генетического разнообразия популяции. Поскольку адаптированность всей пчелиной семьи обеспечивается деятельностью нескольких тысяч рабочих особей, то оценка средней гетерозиготности и величины интрогрессии южных генов для выборки рабочих пчел будет характеризовать генетический потенциал всей пчелиной семьи. Оценка генетических характеристик темной лесной пчелы и генетическая стандартизация на уровне отдельно взятой семьи ранее нигде не проводилась.

Цель наших исследований – генетическая стандартизация пчелиных семей темной лесной пчелы и идентификация пчелиных семей с лучшим генетическим потенциалом на основе полиморфизма локуса COI-COII мтДНК и 9 микросателлитных локусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании были использованы рабочие особи пчелиных семей подвидов *A.m.mellifera* и *A.m.caucasica*, собранные в 2015 году. Отобранные из каждой семьи живые рабочие пчелы фиксировались в 96% этаноле и хранились до выделения ДНК при минус 10⁰С. Для анализа генетического разнообразия и уровня интрогрессии южных генов анализировалось по 4 пчелы из каждой семьи. Для исследования были отобраны 12 семей темной лесной пчелы (*A.m.mellifera*) из Бурзянского района Республики Башкортостан (рис. 1), а также из 3 семей серой горной кавказской пчелы (*A.m.caucasica*) из Сочинского района Краснодарского края, которые были использованы в качестве материала для сравнения. Всего нами было исследовано 60 образцов рабочих пчел из 15 семей (таб. 1).

Таблица 1

Объем выборки и локализация пчелиных семей, использованных в генетических исследованиях

№	Пасека (локализация)	Подвид	Семья	Выборка особей	Рабочие названия семей
1	Борти (заповедник «Шульган-Таш»)	<i>A.m.mellifera</i>	1	4	Борть 1
2			4	Борть 2	
3			4	Борть 3	
4	Пасека «Куш-Елга-Баш» (заповедник «Шульган-Таш»)	<i>A.m.mellifera</i>	7	4	Куш-Елга-Баш 7
5			25	4	Куш-Елга-Баш 25
6			29	4	Куш-Елга-Баш 29
7	Пасека «Капова Пещера» (заповедник «Шульган-Таш»)	<i>A.m.mellifera</i>	15	4	Капова Пещера 15
8			24	4	Капова Пещера 24
9			31	4	Капова Пещера 31
10	Пасека «Байсаян» (заповедник «Шульган-Таш»)	<i>A.m.mellifera</i>	1	4	Байсаян 1
11			13	4	Байсаян 13
12			14	4	Байсаян 14
13	Пасека «Красная Поляна» (Краснополянская опытная станция пчеловодства)	<i>A.m.caucasica</i>	1	4	Красная Поляна 1
14			2	4	Красная Поляна 2
15			3	4	Красная Поляна 3
	Всего			60	

Выделение ДНК из мышц торакса рабочих особей пчел проводили набором ДНК-ЭКСТРАН-2 по протоколу СИНТОЛ (Москва) (www.syntol.ru). Качество и количество выделенной ДНК анализировали на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo, США).

Полимеразная цепная реакция была выполнена в термоциклере BIO-RAD T100 (США) в 15 мкл общего объема смеси по протоколу СИЛЕКС (Москва) (www.sileks.com/ru/) при температуре отжига 55⁰С для 9 микросателлитных локусов

(ap243, 4a110, a24, a8, a43, a113, a88, ap049, a28) [Estoup et al., 1995; Haberl, Tautz, 1999; Solignac et al., 2003] и 48⁰С – для локуса COI-COII мтДНК [Garnerly et al., 1993]. Фрагментарный анализ продуктов ПЦР был выполнен на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems (США).

В проанализированных семьях пчел по микросателлитным локусам наблюдались следующие аллели: по локусу ap243 3 аллеля - 254 п.н., 257 п.н. и 260 п.н.; по локусу 4a110 - 3 аллеля: 160 п.н., 163 п.н. и 168 п.н.; по локусу a24 - 3 аллеля:

98 п.н., 106 п.н. и 108 п.н.; по локусу a8 - 5 аллелей: 154 п.н., 156 п.н., 158 п.н., 164 п.н. и 173 п.н.; по локусу a43 - 4 аллеля: 128 п.н., 134 п.н., 140 п.н., и 142 п.н.; по локусу a113 - 6 аллелей: 216 п.н., 218 п.н., 220 п.н., 222 п.н., 228 п.н. и 234 п.н.; по локусу a88 - 5 аллелей: 143 п.н., 146 п.н., 148 п.н., 152 п.н. и 155 п.н.; по локусу ap049 - 4 аллеля: 123 п.н., 129 п.н., 130 п.н. и 142 п.н.; по локусу a28 - 3 аллеля: 134 п.н., 140 п.н. и 144 п.н.

По межгенному локусу COI-COII мтДНК в проанализированных семьях пчел детектировались фрагменты следующих размеров: фрагменты PQQ - 825 п.н., характеризующие пчел, происходящих от *A.m.mellifera* по материнской линии (эволюционная

ветвь M) и фрагменты Q - 644 п.н., характеризующие пчел, происходящих от *A.m.caucasica*, *A.m.carnica*, *A.m.carpatica*, *A.m.ligustica* по материнской линии (эволюционная ветвь C) [Garnery et al., 1993].

Продукты амплификации разделялись в 8% ПААГ при силе тока 40мА, окрашивались бромистым этидием и фотографировались в геле-документирующей системе DocPrint Vilber Lourmat (Франция).

Статистический анализ полученных результатов проводился с использованием программ FSTAT 2.9.3.2, GENEPOP 4.2.2, POPULATIONS 1.2.28, STRUCTURE 2.3.4, STATISTICA 8.0, MICROSOFT EXCEL 2010.



Рисунок 1. Географическая локализация изученных семей темной лесной пчелы на территории заповедника «Шульган-Таш».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первый этап наших исследований был направлен на получение данных полиморфизма локусов ядерной и митохондриальной ДНК. В 60 рабочих особях выбранных пчелиных семей был проанализирован полиморфизм локуса COI-COII

мтДНК и 9 микросателлитных локусов ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28 (таб. 1). Второй этап исследований базировался на анализе полученных данных полиморфизма локусов с помощью статистических методов и интерпретации результатов.

Нами была проанализирована встречаемость вариантов Q и PQQ межгенного локуса COI-COII мтДНК в выбранных пчелиных семьях. Известно, что присутствие варианта Q локуса COI-COII является показателем южного происхождения семей от подвидов *A.m.caucasica*, *A.m.carnica*, *A.m.carpatica*, *A.m.ligustica*, а PQQ – северного происхождения семей от темной лесной пчелы *A.m.mellifera* по материнской линии. Так, в бурзянской популяции все особи пчелиных семей

являлись носителями варианта PQQ, что указывает на их происхождение по материнской линии от маток темной лесной пчелы *A.m.mellifera*. Все взятые для сравнения пчелиные семьи из Сочинского района Краснодарского края имели происхождение по материнской линии от серой горной кавказской пчелы *A.m.caucasica* и характеризовались вариантом Q локуса COI-COII мтДНК (таб. 2).

Таблица 2

Частоты аллелей локуса COI-COII мтДНК и 9 микросателлитных локусов ар243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ар049, A28 в отобранных пчелиных семьях

Локус	Аллель	Борть 1	Борть 2	Борть 3	Куш-Елга-Баш 7	Куш-Елга-Баш 25	Куш-Елга-Баш 29	Капова Пещера 15	Капова Пещера 24	Капова Пещера 31
Выборка, N		4	4	4	4	4	4	4	4	4
COI-COII	Q	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	PQQ	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
ар243	Аллель 1	1,00	1,00	0,50	0,50	0,75	1,00	1,00	0,50	0,50
	Аллель 2	0,00	0,00	0,50	0,50	0,25	0,00	0,00	0,50	0,50
4a110	Аллель 1	0,88	0,50	0,50	0,50	0,50	0,75	0,25	0,50	0,75
	Аллель 2	0,13	0,25	0,50	0,25	0,00	0,25	0,75	0,50	0,25
	Аллель 3	0,00	0,25	0,00	0,25	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
A24	Аллель 1	1,00	1,00	0,50	1,00	1,00	0,50	0,75	1,00	1,00
	Аллель 2	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,50	0,25	0,00	0,00
	Аллель 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A8	Аллель 1	0,75	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	1,00	0,75
	Аллель 2	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Аллель 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,25
	Аллель 5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A43	Аллель 1	0,75	1,00	1,00	0,75	1,00	1,00	1,00	0,75	0,75
	Аллель 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Аллель 3	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Аллель 4	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,25	0,25
A113	Аллель 1	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,25
	Аллель 2	0,75	1,00	1,00	1,00	0,50	0,75	1,00	0,75	0,75
	Аллель 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00
	Аллель 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00
	Аллель 5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Аллель 6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A88	Аллель 1	0,75	0,75	1,00	0,75	1,00	1,00	0,75	1,00	1,00
	Аллель 2	0,25	0,25	0,00	0,25	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
	Аллель 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Аллель 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Аллель 5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ар049	Аллель 1	1,00	0,50	1,00	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Аллель 3	0,00	0,50	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Аллель 4	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A28	Аллель 1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	1,00	0,75
	Аллель 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,25

Таблица 2

Продолжение

Локус	Аллель	Байсалян 1	Байсалян 13	Байсалян 14	Красная Поляна 1	Красная Поляна 2	Красная Поляна 3	Среднее
Выборка, N		4	4	4	4	4	4	
СОI-СОII	Q	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,20
	PQQ	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,80
ap243	Аллель 1	0,75	0,00	0,25	1,00	1,00	1,00	0,72
	Аллель 2	0,25	1,00	0,75	0,00	0,00	0,00	0,28
4a110	Аллель 1	1,00	0,50	0,75	1,00	1,00	0,88	0,68
	Аллель 2	0,00	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	0,24
	Аллель 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,08
A24	Аллель 1	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,72
	Аллель 2	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,88	0,28
	Аллель 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,01
A8	Аллель 1	1,00	0,88	0,63	0,00	0,00	0,00	0,72
	Аллель 2	0,00	0,13	0,25	0,00	0,00	0,00	0,04
	Аллель 3	0,00	0,00	0,13	1,00	1,00	0,88	0,23
	Аллель 5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,01
A43	Аллель 1	1,00	0,88	0,50	0,00	0,00	0,00	0,69
	Аллель 2	0,00	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,20
	Аллель 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
	Аллель 4	0,00	0,13	0,50	0,00	0,00	0,00	0,09
A113	Аллель 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,07
	Аллель 2	1,00	1,00	0,88	0,13	0,00	0,25	0,72
	Аллель 3	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,04
	Аллель 4	0,00	0,00	0,13	0,50	0,38	0,13	0,09
	Аллель 5	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,25	0,03
	Аллель 6	0,00	0,00	0,00	0,13	0,38	0,38	0,06
A88	Аллель 1	0,50	1,00	1,00	0,88	0,50	0,63	0,83
	Аллель 2	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
	Аллель 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,01
	Аллель 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,01
	Аллель 5	0,00	0,00	0,00	0,13	0,50	0,13	0,05
Ap049	Аллель 1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,93
	Аллель 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
	Аллель 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
A28	Аллель 1	0,75	1,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,75
	Аллель 2	0,25	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,25

Для получения генетических характеристик и оценки генетического потенциала пчелиных семей необходимо анализировать полиморфизм локусов ядерной ДНК. Известно, что матка оплодотворяется 15-20 неродственными трутнями, которые вносят генетическое разнообразие в популяцию рабочих особей пчелиной семьи [Baudry et al., 1998; Oxley et al., 2010; Harpur et al., 2012]. Отсюда, в популяции рабочих особей в одной семье может присутствовать

потомство от разных трутней одновременно. Данное явление должно проявляться в виде значительного генетического разнообразия среди рабочих особей пчелиной семьи. На основе результатов анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28 ядерной ДНК нами была рассчитана средняя гетерозиготность пчелиных семей (таб. 3).

Таблица 3

Средняя гетерозиготность и уровень интрогрессии генов подвидов эволюционных ветвей М и С в семьях пчел, рассчитанные на основе анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов ар243, 4a110, А24, А8, А43, А113, А88, Ар049, А28.

Семья пчел	Выборка особей	Ветвь М, %	Ветвь С, %	Средняя гетерозиготность
Борть 1	4	100	0	0,23
Борть 2	4	100	0	0,25
Борть 3	4	100	0	0,21
Куш-Елга-Баш 7	4	100	0	0,40
Куш-Елга-Баш 25*	4	99,5	0,5	0,25
Куш-Елга-Баш 29*	4	99	1	0,21
Капова Пещера 15*	4	99	1	0,25
Капова Пещера 24	4	100	0	0,21
Капова Пещера 31*	4	98	2	0,35
Байсаян 1	4	100	0	0,20
Байсаян 13	4	100	0	0,12
Байсаян 14*	4	99,5	0,5	0,30
Красная Поляна 1	4	0	100	0,11
Красная Поляна 2	4	0	100	0,15
Красная Поляна 3	4	0	100	0,23

* - отмечены пчелиные семьи, содержащие незначительный уровень интрогрессии генов пчел южного происхождения.

Для популяции пчел характерен собственный оптимальный уровень генетического разнообразия. Дефицит генетического разнообразия приводит к потере экологической пластичности и адаптированности к окружающей среде, а избыток – к потере сбалансированности генома. Уровень средней гетерозиготности среди семей бурзянской популяции темной лесной пчелы *A.m.mellifera* варьировал от 0,12 до 0,40, а среди семей сочинской популяции серой горной кавказской пчелы *A.m.caucasica* – от 0,11 до 0,23.

К сожалению, в литературе нет исследований по оценке уровня средней гетерозиготности на уровне пчелиной семьи, которые можно было бы использовать для сравнения. Все исследования гетерозиготности пчел проводились на уровне популяций. Так, средняя гетерозиготность, рассчитанная на основе полиморфизма микросателлитных локусов В124, А113, А7, А24, А28, А8 в популяциях *A.m.iberiensis* в Испании варьировала от 0,43 до 0,47 [De la Rúa et al., 2004]; в популяциях *A.m.ligustica* в Португалии по данным полиморфизма микросателлитных локусов В124, А113, А7, А24, А28, А8 - от 0,22 до 0,29 [De la Rúa et al., 2006]; в популяциях *A.m.carnica* в Швейцарии по данным полиморфизма микросателлитных локусов А007, А28, А43, Ас306, Ар33, Ар273, Ар226, Ар289, В24 - от 0,34 до 0,57, а в

популяциях *A.m.mellifera* в Швейцарии, Норвегии и Франции – от 0,37 до 0,58 [Soland-Reckeweg et al., 2009]; в популяциях *A.m.mellifera* в Польше по данным полиморфизма микросателлитных локусов А7, А24, А28, А88, А113, Ар43, Ар55, Ар66, Ар81 - от 0,49 до 0,64 [Oleksa et al., 2011]; в популяциях *A.m.mellifera* в районах Республики Башкортостан по данным полиморфизма микросателлитных локусов ар243, 4a110, А24, А8, А43, А113, А88, Ар049, А28 – от 0,32 до 0,41 [Ильясов и др., 2015б].

Таким образом, исходя из сравнения средних показателей гетерозиготности семей темной лесной пчелы бурзянского района и других популяций *A.m.mellifera* и *A.m.iberiensis* (эволюционная ветвь М), а также *A.m.caucasica*, *A.m.ligustica* и *A.m.carnica* (эволюционная ветвь С) мы можем констатировать, что в пчелиных семьях уровень гетерозиготности примерно сходен с гетерозиготностью на уровне популяций. В отдельных семьях наблюдается более низкий уровень средней гетерозиготности.

Так, наибольшей средней гетерозиготностью характеризуются: 7 и 25 семьи с пасеки Куш-Елга-Баш (0,40 и 0,25), 15 и 31 семьи с пасеки Капова Пещера (0,35 и 0,25), 14 семья с пасеки Байсаян (0,3), 2 семья бортевых пчел (0,25). Наименьшей средней гетерозиготностью характеризуются: 1 и 2 семьи с пасеки Красная поляна (0,11 и 0,15), 1 и 13

семьи с пасеки Байсаян (0,20 и 0,12). Средние значения гетерозиготности отмечены в 1 и 3 семьях бортовых пчел (0,23 и 0,21), в 29 семье с пасеки Куш-Елга-Баш (0,21), в 24 семье с пасеки Капова Пещера (0,21), в 3 семье с пасеки Красная поляна (0,23). Вероятно, что средний уровень гетерозиготности семьи темной лесной пчелы от 0,21 до 0,23 можно будет принять за оптимальный уровень для популяций пчел Урала и Поволжья. Возможно, что величина средней гетерозиготности зависит от уровня интрогрессии южных генов в семьях пчел бурзянской популяции. Тогда семьи пчел со следами интрогрессии южных генов будут характеризоваться высоким уровнем гетерозиготности.

ОБСУЖДЕНИЕ

С целью оценки генетических взаимоотношений пчелиных семей нами были рассчитаны генетические дистанции М. Nei (1978) между всеми 15 семьями пчел на основе данных полиморфизма микросателлитных локусов ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28 (таб. 4). По полученным значениям генетических дистанций нами была построена дендрограмма методом кластеризации ближайшего соседа (Neighbour joining) (NJ), отражающая генетические взаимоотношения всех отобранных нами пчелиных семей (рис. 2). На дендрограмме можно наблюдать разделение всех семей на два крупных кластера, которые делят пчелиные семьи южного (сочинская популяция) и северного происхождения (бурзянская популяция).

Таблица 4

Генетические дистанции М. Nei (1978) между пчелиными семьями

Семья	Борть 1	Борть 2	Борть 3	Куш-Елга-Баш 7	Куш-Елга-Баш 25	Куш-Елга-Баш 29	Капова Пещера 15
Борть 1	0,00	0,07	0,11	0,10	0,08	0,06	0,09
Борть 2	0,07	0,00	0,11	0,05	0,08	0,08	0,08
Борть 3	0,11	0,11	0,00	0,08	0,10	0,04	0,07
Куш-Елга-Баш 7	0,10	0,05	0,08	0,00	0,09	0,12	0,12
Куш-Елга-Баш 25	0,08	0,08	0,10	0,09	0,00	0,08	0,13
Куш-Елга-Баш 29	0,06	0,08	0,04	0,12	0,08	0,00	0,07
Капова Пещера 15	0,09	0,08	0,07	0,12	0,13	0,07	0,00
Капова Пещера 24	0,07	0,09	0,05	0,05	0,07	0,08	0,09
Капова Пещера 31	0,07	0,11	0,07	0,07	0,08	0,09	0,10
Байсаян 1	0,05	0,08	0,11	0,08	0,10	0,09	0,10
Байсаян 13	0,17	0,17	0,06	0,07	0,13	0,17	0,16
Байсаян 14	0,12	0,17	0,09	0,07	0,13	0,15	0,18
Красная Поляна 1	0,87	1,15	0,92	1,29	1,00	0,72	0,82
Красная Поляна 2	0,95	1,29	1,06	1,47	1,16	0,83	0,92
Красная Поляна 3	0,87	1,13	0,93	1,27	1,02	0,76	0,80

Внутри кластера темной лесной пчелы бурзянской популяции наблюдается дифференциация на подгруппы, которая характеризует генетическую подразделенность популяции. В первую подгруппу объединились все семьи бортовых пчел, а также 7 семья с пасеки Куш-Елга-Баш и 1 и 13 семьи с пасеки Байсаян. Возможно, что семьи на этих пасеках имели происхождение от бортовых пчелиных семей в недавнем прошлом, или же эти пчелиные семьи сформировались под влиянием потока генов через

трутней бортовых пчел. Во вторую подгруппу вошли 25 и 29 семьи пчел с пасеки Куш-Елга-Баш, 24 семья с пасеки Капова Пещера и 14 семья с пасеки Байсаян. В третью подгруппу вошли 15 и 31 семьи пчел с пасеки Капова Пещера. Возможно, что такая кластеризация семей пчел бурзянской популяции на подгруппы сформирована под влиянием наличия следов интрогрессии южных генов в некоторых семьях, где сближаются между собой пчелиные семьи со сходными уровнями интрогрессии.

Таблица 4

Продолжение

Семья	Капова Пещера 24	Капова Пещера 31	Бай-салян 1	Бай-салян 13	Бай-салян 14	Красная Поляна 1	Красная Поляна 2	Красная Поляна 3
Борть 1	0,07	0,07	0,05	0,17	0,12	0,87	0,95	0,87
Борть 2	0,09	0,11	0,08	0,17	0,17	1,15	1,29	1,13
Борть 3	0,05	0,07	0,11	0,06	0,09	0,92	1,06	0,93
Куш-Елга-Баш 7	0,05	0,07	0,08	0,07	0,07	1,29	1,47	1,27
Куш-Елга-Баш 25	0,07	0,08	0,10	0,13	0,13	1,00	1,16	1,02
Куш-Елга-Баш 29	0,08	0,09	0,09	0,17	0,15	0,72	0,83	0,76
Капова Пещера 15	0,09	0,10	0,10	0,16	0,18	0,82	0,92	0,80
Капова Пещера 24	0,00	0,02	0,09	0,04	0,04	1,07	1,20	1,09
Капова Пещера 31	0,02	0,00	0,07	0,06	0,04	0,81	0,91	0,82
Байсалян 1	0,09	0,07	0,00	0,14	0,13	0,92	1,00	0,89
Байсалян 13	0,04	0,06	0,14	0,00	0,04	1,29	1,50	1,31
Байсалян 14	0,04	0,04	0,13	0,04	0,00	0,99	1,15	1,03
Красная Поляна 1	1,07	0,81	0,92	1,29	0,99	0,00	0,03	0,02
Красная Поляна 2	1,20	0,91	1,00	1,50	1,15	0,03	0,00	0,03
Красная Поляна 3	1,09	0,82	0,89	1,31	1,03	0,02	0,03	0,00

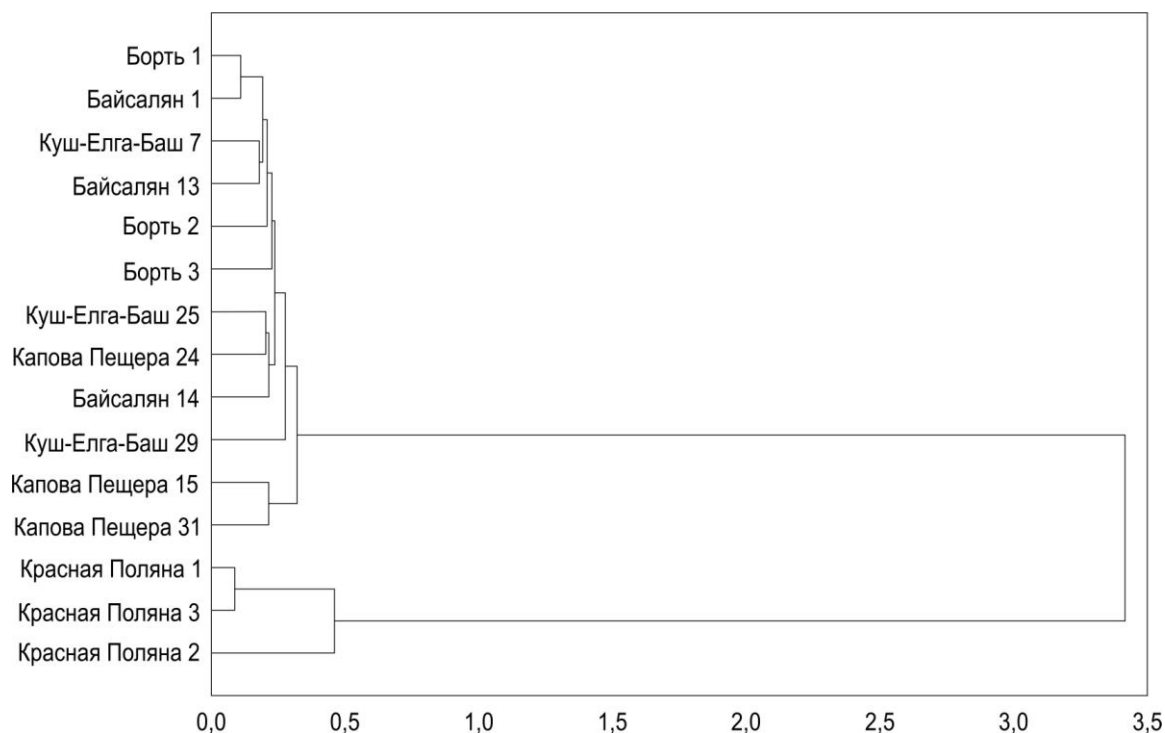


Рисунок 2. Дендрограмма генетических взаимоотношений пчелиных семей, построенная методом ближайшего соседа по генетическим расстояниям М. Nei (1978) по результатам анализа полиморфизма 9 микросателлитных локусов ar243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28.

Самой важной и интересной оценкой при генотипировании семей пчел является оценка уровня интрогрессии южных генов в геноме темной лесной пчелы, поскольку результаты этого анализа позволяют принимать решение о направленности селекции. Понятие гибридизация и интрогрессия хоть и сходны между собой, но все же отличаются. При гибридизации происходит просто объединение отцовского и материнского генома разных подвидов

в одном генотипе гибридного потомства, то есть гомологичные хромосомы будут от разных родителей. В случае интрогрессии смешивание генома происходит на более глубоком уровне и в геном темной лесной пчелы гены интегрируются не в виде гомологичных хромосом, а в виде вставок участков хромосом в результате обмена участками при кроссинговере (рис. 3).

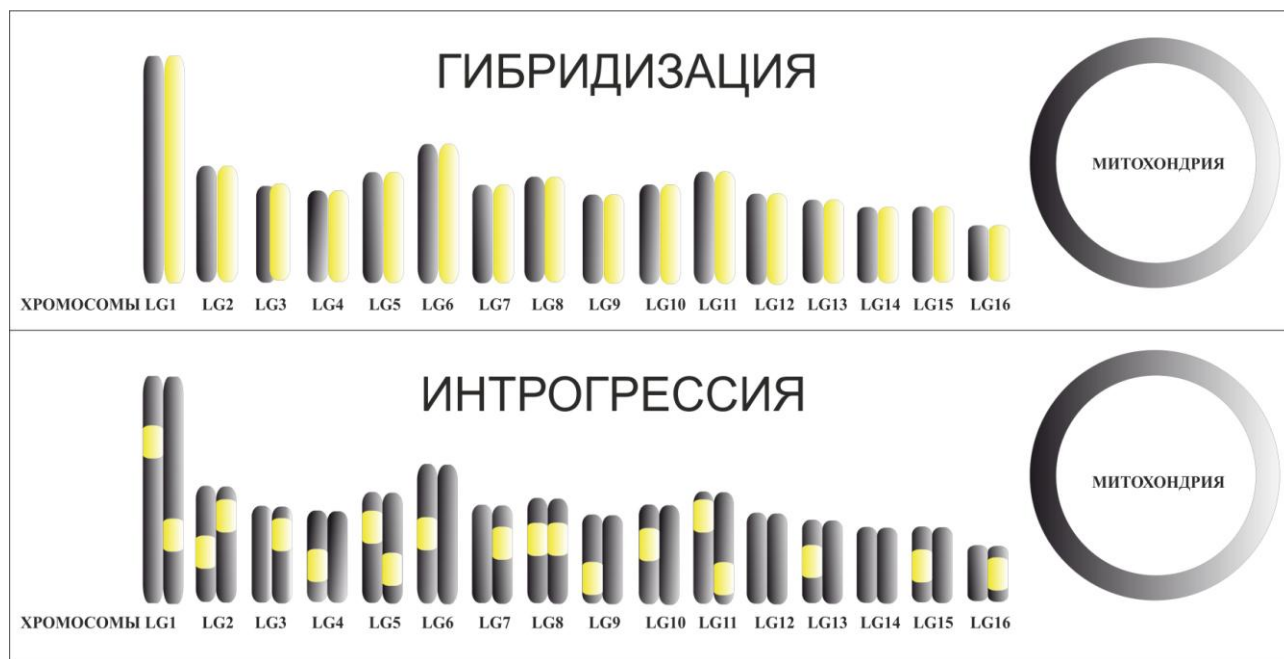


Рисунок 3. Гибридизация и интрогрессия генов южных подвидов в ядерный геном темной лесной пчелы (236 млн. п.н.) (Темным цветом указаны фрагменты генома темной лесной пчелы, а светлым – южных подвидов).

Поэтому интрогрессия представляет для генома темной лесной пчелы большую опасность, поскольку избавиться от таких внедрившихся во все хромосомы чужеродных фрагментов ДНК практически невозможно. Следует отметить, что интрогрессия происходит только на уровне ядерного генома, в то время как митохондриальный геном (16 тыс. п.н.) наследуется потомством в чистом виде по материнской линии. Потому митохондриальный геном в анализе уровня интрогрессии является неинформативным. Редким исключением является гетероплазмия – когда зигота может сформироваться при участии материнского и отцовского митохондриального геномов, иногда передающихся сперматозоидами от трутней [Никоноров и др., 1998].

Оценку уровня интрогрессии южных генов в семьях пчел бурзянской популяции мы выполнили

на основе данных по полиморфизму 9 микросателлитных локусов ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28 с использованием программы STRUCTURE 2.3.4 [Pritchard et al., 2000]. На основе Байесовского анализа (Bayesian analysis) с применением метода кластеризации Монте-Карло с цепями Маркова (Monte Carlo Markov Chain) (MCMC) [Pritchard et al., 2000] при заданном числе кластеров $K=2$ с использованием модели смешивания (Admixture model) и повторности MCMC (iteration) 5000 были рассчитаны процентные значения интрогрессии генов эволюционной ветви С (*A.m.caucasica*) в семьях пчел эволюционной ветви М (*A.m.mellifera*) (таб. 3). На основе полученных значений нами был построен график в виде гистограммы (plot), отражающий уровень интрогрессии для каждой особи из каждой отобранной семьи пчел (рис. 4).

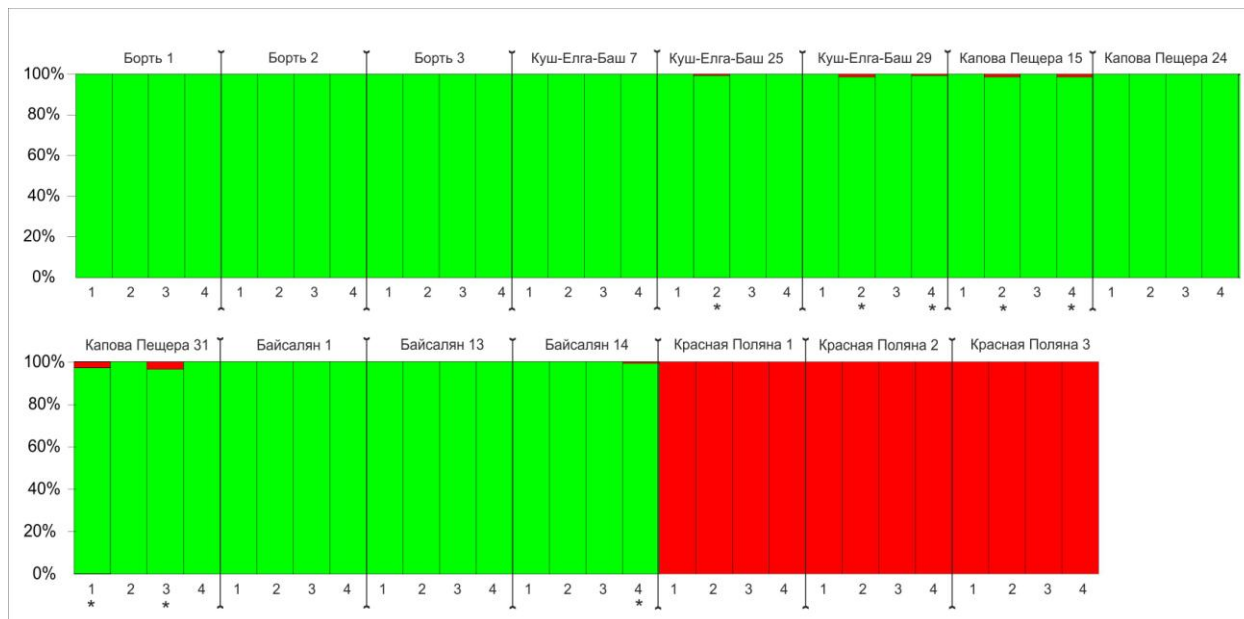


Рисунок 4. График, отражающий уровень интрогрессии южных генов рабочих особей семей темной лесной пчелы, построенный на основе данных полиморфизма 9 микросателлитных локусов ar243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28 с применением Байесовского анализа методом кластеризации Монте-Карло с цепями Маркова [Pritchard et al., 2000] в программе STRUCTURE 2.3.4 с числом кластеров K=2.

Мы можем отметить, что в 25 и 29 семьях пчел с пасеки Куш-Елга-Баш, 15 и 31 семьях с пасеки Капова Пещера, 14 семье с пасеки Байсалян наблюдались следы интрогрессии южных генов от 0,5 до 2%. Пчелиные семьи Сочинского района подвида *A.m.caucasica*, взятые для сравнения, были отмечены отсутствием интрогрессии северных генов и охарактеризованы как 100% серые горные кавказские пчелы.

Таким образом, по митохондриальному геному по полиморфизму локуса COI-COII семьи пчел бурзянской популяции охарактеризованы как 100% *A.m.mellifera*, а семьи пчел сочинской популяции – как 100% *A.m.caucasica*. По ядерному геному нет такого однозначного 100% разделения на *A.m.mellifera* и *A.m.caucasica*. Конечно интрогрессией 2% можно пренебречь и охарактеризовать эти пчелиные семьи как *A.m.mellifera*, округлив 98% до 100%. Однако, в селекции так поступать не следует, поскольку при отсутствии селекционного контроля содержание южных генов будет расти и накапливаться. При встрече двух геномов со следами интрогрессии южных генов их потомство может содержать суммарный уровень интрогрессии родительских геномов. Факт наличия следов интрогрессии говорит

о том, что в бурзянской популяции темной лесной пчелы изоляция не идеальная и поток генов извне все же происходит. Вероятно, что поток генов происходит в результате залета чужих трутней, что и приводит к появлению следов интрогрессии южных генов только у части рабочих особей.

Мы отметили, что в 5 семьях пчел от 1 до 2 пчел из 4 несут следы интрогрессии южных генов, что составляет от 25 до 50% рабочих особей пчелиной семьи на данный период. Соотношение рабочих особей, несущих следы интрогрессии южных генов и с ее отсутствием в пчелиной семье может незначительно варьировать из года в год. Эти временные изменения соотношения рабочих особей в пчелиной семье будут очень незначительными, поскольку матка равномерно выводит потомство от 15-20 трутней. Поэтому вполне достаточно выполнить оценку уровня интрогрессии южных генов в пчелиной семье однократно.

Вероятно, что на дендрограмме 2 и 3 подгруппы были сформированы пчелиными семьями со следами интрогрессии южных генов. Во 2 группу попала 24 семья с пасеки Капова Пещера, которая не содержала следы интрогрессии и состояла в генетической близости с 14 семьей с пасеки Байсалян, содержащей 0,5% интрогрессии южных

генов. Это можно объяснить тем, что данные пчелиные семьи являются потомками преимущественно близкородственных трутней. Кластерный анализ на основе генетических дистанций не смог дифференцировать 14 семью с пасеки Байсалян со следами интрогрессии от 24 семьи с пасеки Капова Пещера с отсутствием интрогрессии. Возможно, что величина интрогрессии южных генов в 0,5% столь мала, что практически не оказала влияния на оценку генетической дистанции.

Почти все семьи с наибольшим значением средней гетерозиготности от 0,25 до 0,40 характеризовались следами интрогрессии южных генов. Исключением являлись 7 семья с пасеки Куш-Елга-Баш [0,40] и 2 семья бортовых пчел [0,25], которые не содержали интрогрессии. Практически все семьи со средним значением гетерозиготности от 0,21 до 0,23 не содержали интрогрессии южных генов. Исключение составляла 29 семья с пасеки Куш-Елга-Баш, которая содержала 1% интрогрессии южных генов. Все пчелиные семьи с наименьшим уровнем средней гетерозиготности от 0,11 до 0,20 не содержали интрогрессии чужеродных генов.

Так, из всех проанализированных семей темной лесной пчелы оптимальным генетическим потенциалом обладали семьи со средним и наибольшим уровнями средней гетерозиготности и отсутствием интрогрессии южных генов. В данном случае, оптимальными для селекции являются 7 семья с пасеки Куш-Елга-Баш, 24 семья с пасеки Капова Пещера и все 3 семьи бортовых пчел.

Вероятно, что обитание пчел в условиях дикой природы в бортах создает благоприятные условия для сохранения пчелиных семей *A.m.mellifera* с оптимальным генетическим потенциалом. Поэтому чрезвычайно важно сохранение бурзянской популяции темной лесной пчелы, обитающей в условиях дикой природы на территориях Государственного природного биосферного заповедника «Шульган-Таш», регионального природного заказника «Алтын Солок» и национального парка «Башкирия».

В.А.Nagpur et al. (2012; 2013) на основе сравнительного анализа нуклеотидной последовательности ядерной ДНК размером 16.5 Kb, включающий 20 генов и 358 сайтов SNP у пчел из 96 семей африканской, европейской и североамериканской популяций экспериментально доказали, что в диких популяциях медоносной пчелы уровень генетического разнообразия выше по сравнению с пчелиными семьями на пасеках. Они предполагают, что при пасечном разведении пчел под давлением искусственного отбора происходит постоянное снижение генетического разнообразия

семей пчел. Таким образом, сохранение генетического разнообразия пчелиных семей может самостоятельно происходить в популяциях бортовых пчел в условиях дикой природы. A. Oleksa et al. (2013) на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов A113, A24, A7, A88, Ap28, Ap43, Ap55, Ap66, A025, Ac011, Ap090, Ap103, Ap226, Ap238, Ap243, Ap249, Ap256 показали, что в Восточной Польше матки темной лесной пчелы без интрогрессии южных генов преимущественно скрещиваются с трутнями темной лесной пчелы без интрогрессии. Они пришли к выводу, что темная лесная пчелы *A.m.mellifera* обладает свойством частичной репродуктивной изоляции от других подвидов. Этот факт дает надежду на вероятность сохранения чистоты генофонда популяции темной лесной пчелы на территории Бурзянского района в условиях окружения популяций гибридного происхождения.

Наша Лаборатория биохимии адаптивности насекомых ИБГ УНЦ РАН совместно с региональной общественной организацией «Пчеловоды Башкирии» пришли к соглашению о создании ассоциации «Российская ассоциация *Apis mellifera mellifera*» (Russian association of *Apis mellifera mellifera*) РААММ (RAAMM), деятельность которой будет способствовать интеграции пчеловодов и сохранению генофонда темной лесной пчелы *A.m.mellifera* в регионах России. На данный момент РААММ проходит этап государственной регистрации некоммерческой общественной организации. Мы надеемся, что деятельность РААММ позволит перевести пчеловодство и селекцию темной лесной пчелы на уровень молекулярной генетики, который позволит прогнозировать и сохранить чистоту генофонда и генетического разнообразия популяции *A.m.mellifera* на десятки поколений вперед.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ 13-04-01802 А и 14-04-97084 р_поволжье_a на оборудовании ЦКП «Биомика» отделения биохимических методов исследований и нанобиотехнологии РЦКП «Агидель» и УСУ «КОДИНК» (Комплекс оборудования для исследования нуклеиновых кислот).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ильясов Р.А., Косарев М.Н., Юмагузин Ф.Г. Бурзянская бортевая пчела и бортевое пчеловодство на Южном Урале // Пчеловодство. 2015а. № 7. С. 12-15.
2. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Генетическая дифференциация локальных популяций темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // Генетика. 2015б. Т. 51. № 7. С. 792–798.
3. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Новые SNP маркеры в гене вителлогена *Vg* медоносной пчелы для идентификации *Apis mellifera mellifera* L. // Генетика. 2015в. Т. 51. № 2. С. 194–199.
4. 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.
5. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г., Брандорф А.З., Ивойлова М.М. Генетический и фенотипический анализ генофонда популяции *Apis mellifera* L. в Кировской области. Биомика. 2012. Т.3. № 1. С. 47-49.
6. Николенко А.Г., Поскряков А.В. Полиморфизм локуса COI-COII митохондриальной ДНК *Apis mellifera* L. на Южном Урале // Генетика. 2002. Т. 38. № 4. С. 458-462.
7. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В. и др. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала // Генетика. 1998. Т. 34. № 11. С. 1574-1577.
8. Baudry E., Solignac M., Garnery L. Relatedness among honeybees (*Apis mellifera*) of a drone congregation // Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences. 1998. V. 265. P. 2009–2014.
9. Bouga M., Harizanis P.C., Kiliadis G., Alahiotis S. Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR - RFLP analysis of three mtDNA Segments // Apidologie. 2005. V. 36. P. 335-344.
10. 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.
11. De la Rúa P., Hernández-García R., Pedersen B.V. et al. Molecular diversity of honeybee *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) from Western Andalusia // Arch. Zootec. 2004. V. 53. P. 195-203.
12. De La Rúa P., Jaffé R., Dall'olio R. et al. Biodiversity, conservation and current threats to European honey bees // Apidologie. 2009. V. 40. P. 263-284.
13. De La Rúa P., Jaffé R., Muñoz I. et al. Conserving genetic diversity in the honey bee. Comments on Harpur et al. (2012) // Mol. Ecol. 2013. V. 22. P. 3208-3210.
14. De la Rúa P., Serrano J., Galián J. Biodiversity of *Apis mellifera* populations from Tenerife (Canary Islands) and hybridisation with East European races // Biodivers. Conserv. 2002. V. 11. P. 59-67.
15. Dietemann V., Pirk C.W.W., Crewe R. Is there a need for conservation of honey bees in Africa? // Apidologie. 2009. V. 40. P. 285-295.
16. Engel M.S. The taxonomy of recent and fossil honey bees (Hymenoptera: Apidae; Apis) // J. Hym. Res. 1999. V. 8. P. 165-196.
17. Estoup A., Garnery L., Solignac M., Cornuet J. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: Hierarchical genetic structure and tests of infinite allele and stepwise mutation models // Genetics. 1995. V. 140. P. 679-695.
18. Franck P., Garnery L., Loiseau B.P. et al. Genetic diversity of the Honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data // Heredity. 2001. V. 86. P. 420-430.
19. Garnery L., Franck P., Baudry E. et al. Genetic biodiversity of the West European honeybee (*Apis mellifera mellifera* and *A.m.iberica*). I. Mitochondrial DNA // Genet. Sel. Evol. 1998. V. 30. P. 31–47.
20. Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.-M. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. // Experientia. 1993. V. 49. P. 1016–1021.
21. Haberl M., Tautz D. Tri- and tetranucleotide microsatellite loci in honey bees (*Apis mellifera*) – a step towards quantitative genotyping // Molecular Ecology. 1999. V. 8. P. 1351-1362.
22. Harpur B.A., Minaei S., Kent C.F., Zayed A. Admixture increases diversity in managed honey bees: reply to De la Rúa et al., 2013 // Mol Ecol. 2013. V. 22. P. 3211-3215.
23. Harpur B.A., Minaei S., Kent C.F., Zayed A. Management increases genetic diversity of honey bees via admixture // Mol

- Ecol. 2012. V. 18. P. 4414-4421.
24. Hepburn H.R., Radloff S.E. Honeybees of Africa. Berlin: Springer, 1998. 130 p.
 25. Ilyasov R.A., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Nucleotide polymorphism of the gene VG of honey bees. *Biomics*. 2015. V. 7 (1). P. 54-61.
 26. 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 // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 93-106.
 27. Meixner M.D., Costa C., Kryger P. et al. Conserving diversity and vitality for honey bee breeding // *Journal of Apicultural Research*. 2010. V. 49. № 1. P. 85-92.
 28. Meixner M.D., Leta M.A., Koeniger N., Fuchs S. The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera* - *Apis mellifera simensis* n. ssp. // *Apidologie*. 2011. V. 42. P. 425-437.
 29. Muñoz I., Dall'Olio R., Lodesani M., De La Rúa P. Population genetic structure of coastal Croatian honeybees (*Apis mellifera carnica*) // *Apidologie*. 2009. V. 40. P. 617-626.
 30. Muñoz I., Stevanovic J., Stanimirovic Z., De La Rúa P. Genetic variation of *Apis mellifera* from Serbia inferred from mitochondrial analysis // *J. Apic. Sci.* 2012. V. 56. P. 59-69.
 31. Nedić N., Francis R.M., Stanisavljević L. et al. Detecting population admixture in the honey bees of Serbia. *J. Apic. Res.* 2014. V. 53. P. 303-313.
 32. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // *Genetics*. 1978. V. 2. P. 341-369.
 33. Oleksa A., Chybicki I., Tofilski A., Burczyk J. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland // *J. Apic. Res.* 2011. V. 50. P. 116-129.
 34. Oleksa A., Wilde J., Tofilski A., Chybicki I. Partial reproductive isolation between European subspecies of honey bees // *Apidologie*. 2013. DOI: 10.1007/s13592-013-0212-y.
 35. Oxley P.R., Hinhumpatch P., Gloag R., Oldroyd B.P. Genetic evaluation of a novel system for controlled mating of the honeybee, *Apis mellifera* // *J. Hered.* 2010. V. 101. P. 334-338.
 36. Pinto M.A., Henriques D., Chavez-Galarza J. et al. Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data // *J. Apic. Res.* 2014. V. 53. №2. P. 269-278.
 37. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000. V. 155. P. 945-959.
 38. Rortais A., Arnold G., Alburaki M. et al. Review of the DraI COI-COII test for the conservation of the black honeybee (*Apis mellifera mellifera*) // *Conserv. Genet. Resour.* 2011. V. 3. P. 383-391.
 39. Ruttner F. Biogeography and Taxonomy of Honey bees. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 288 p.
 40. Schneider S.S., DeGrandi-Hoffman G., Smith D.R. The African honey bee: factors contributing to a successful biological invasion // *Annu. Rev. Entomol.* 2004. V. 49. P. 351-376.
 41. Sheppard W.S., Meixner M.D. *Apis mellifera pomonella*, a new honey bee subspecies from Central Asia // *Apidologie*. 2003. V. 34. P. 367-375.
 42. Soland-Reckeweg G., Heckel G., Neumann P. et al. Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera* // *J. Insect Conserv.* 2009. V. 13. P. 317-328.
 43. Solignac M., Vautrin D., Loiseau A. et al. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome // *Mol. Ecol. Notes*. 2003. V. 3. P. 307-311.
 44. 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 // *Rus. J. Genetics*. 2010. V. 46. №5. P. 603-609.
 45. Strange J.P., Garnery L., Sheppard W. Morphological and molecular characterization of the Landes honey bee (*Apis mellifera* L.) ecotype for genetic conservation // *J. Insect Conserv.* 2008. V. 12. P. 527-537.
 46. Uzunov A., Kiprijanovska H., Andonov S. et al. Morphological diversity and racial determination of the honey bee (*Apis mellifera* L.) population in the Republic of Macedonia // *J. Apic. Res.* 2009. V. 48. №3. P. 196-203.
 47. Uzunov A., Meixner M.D., Kiprijanovska H. et al. Genetic structure of *Apis*

mellifera macedonica population based on microsatellite DNA polymorphism // J. Apic. Res. 2014. V. 53. №2. P. 288-295.

48. van Engelsdorp D., Meixner M.D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them // J. Invertebr. Pathol. 2010. V. 103. P. 80–95.

49. Wallberg A., Han F., Wellhagen G. et al. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary

history of the honeybee *Apis mellifera* // Nat. Genet. 2014. V. 46. P. 1081–1088.

50. Weigend S., Romanov M.N. The World Watch List for Domestic Animal Diversity in the context of conservation and utilisation of poultry biodiversity // World's Poultry Sci. J. 2002. V. 58. №4. P. 411-430.

51. Whitfield C.W., Behura S.K., Berlocher S.H. et al. Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera* // Science. 2006. V. 314. P. 642–645.

NEW APPROACH TO THE ASSESSMENT OF GENETIC POTENTIAL OF COLONIES OF DARK EUROPEAN BEE *APIS MELLIFERA MELLIFERA* BASED ON POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE LOCI

*R.A. Ilyasov, ¹**M.N. Kosarev, A.V. Poskryakov, A.G. Nikolenko

Ufa Scientific Centre of the Russian Academy of Science, Institute of Biochemistry and Genetics, 450054, Russia, Ufa, prospect Oktyabrya, 71. *E-mail: apismell@hotmail.com

¹State Nature Biosphere Reserve «Shulgan-Tash», 453585, Russia, Bashkortostan republic, Irgizly, Zapovednaya 4. **E-mail: mnkos@mail.ru

RESUME

In Russia and the countries of Western and Northern Europe dark European bee *Apis mellifera mellifera* has been recognized as the most effective for commercial breeding. Earlier beekeepers of Nordic countries were of a different opinion and put massive experiments on the introduction and breeding subspecies of the Southern and Eastern Europe in their apiaries. This development led to massive introgression of genes of bees from southern populations into dark European bees. Therefore they lost of the purity of the aboriginal gene pool. For restore the gene pool of the dark European bees within the historic range is necessary selection of colonies based on the genetic standardization in the preserved isolates of *A.m.mellifera*. We have shown the ability to identify bee colonies with the best genetic potential. We found that the genetic potential of bee colonies, nesting in natural and artificial tree trunks (bort and koloda) and inhabiting in the wild nature, maintain more effective than colonies in commercial beehives on apiaries using the analysis of the level of introgression of southern genes and assess the level of average heterozygosity according based on polymorphism of 9 microsatellite loci.

Key words: *Apis mellifera mellifera*, dark European bee, tree hollow nesting dark bee, Burzyan ecotype of dark European bee, genetic diversity of bee colonies, the introgression of southern genes, the optimal genetic potential of bee colonies, the preservation of the genetic diversity, hybridization of subspecies.