



**ОЦЕНКА УРОВНЯ ГИБРИДИЗАЦИИ ПОПУЛЯЦИЙ ТЁМНОЙ ЛЕСНОЙ ПЧЕЛЫ
APIS MELLIFERA MELLIFERA L. В СЕВЕРНЫХ РАЙОНАХ БАШКОРТОСТАНА**

¹Каскинова М.Д.*, ¹Гайфуллина Л.Р., ¹Салтыкова Е.С., ²Каипкулов Р.Н., ²Байтуллин Р.Р.

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, *E-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

²ГАУ Башкирский научно-исследовательский центр по пчеловодству и апитерапии, Уфа, Россия

Резюме

Выполнен анализ генетической структуры выборок пчёл из шести северных районов Республики Башкортостан: Балтачевского, Бирского, Благовещенского, Бураевского, Татышлинского и Янаульского. С помощью анализа межгенного локуса *COI-COII* установлена принадлежность к эволюционной ветви М (*A. m. mellifera*) или С (*A. m. carnica*, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica*). Затем, в пчелиных семьях *A. m. mellifera* на основе полиморфизма девяти микросателлитных локусов ядерной ДНК был определён уровень интрогрессии генофонда эволюционной ветви С. В результате наименьший уровень гибридации выявлен в выборках из Янаульского, Татышлинского, Бураевского и Балтачевского районов. Наибольший уровень гибридации установлен в семьях из Бирского и Благовещенского районов. Кроме того в этих двух районах выявлено большое количество семей из эволюционной ветви С.

Ключевые слова: тёмная лесная пчела, *Apis mellifera mellifera*, локус *COI-COII*, гибридация.

Цитирование: Каскинова М.Д., Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е.С., Каипкулов Р.Н., Байтуллин Р.Р. Оценка уровня гибридации популяций темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. в северных районах Башкортостана // *Biomics*. 2024. Т.16(1). С. 56-60. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-6

© Авторы

**ASSESSMENT OF THE HYBRIDIZATION LEVEL OF POPULATIONS OF THE DARK
FOREST BEE *APIS MELLIFERA MELLIFERA* L. IN THE NORTHERN BASHKORTOSTAN**

¹Kaskinova M.D.*, ¹Gaifullina L.R., ¹Saltykova E.S., ²Kaipkulov R.N., ²Baitullin R.R.

¹Institute of Biochemistry and Genetics of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

²Bashkir Scientific Research Center for Beekeeping and Apitherapy, Ufa, Russian Federation

*E-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

Resume

In this study the results of analysis of the genetic structure of bees samples from six northern districts of the Republic of Bashkortostan (Baltachevsky, Birsky, Blagoveshchensky, Buraevsky, Tatyshlinsky and Yanaulsky) were presented. First, using the analysis of the intergenic locus *COI-COII*, belonging to the evolutionary lineages M (*A. m. mellifera*) or C (*A. m. carnica*, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica*) was established. Then, in bee colonies *A. m. mellifera*, the level of introgression of the gene pool of evolutionary lineage C was established based on the polymorphism of 9 microsatellite loci of nuclear DNA. As a result, the lowest level of hybridization was detected in samples from Yanaulsky, Tatyshlinsky,

Buraevsky and Baltachevsky districts. The highest level of hybridization was detected in colonies from Birskey and Blagoveshchensky districts. In addition, in these two areas, a large number of colonies from the evolutionary lineage C were identified.

Key words: black forest bee, *Apis mellifera mellifera*, *COI-COII* locus, hybridization.

Citation: Kaskinova M.D., Gaifullina L.R., Saltykova E.S., Kaipkulov R.N., Baitullin R.R. Assessment of the hybridization level of populations of the dark forest bee *Apis mellifera mellifera* L. in the northern Bashkortostan. *Biomcs*. 2024. V.16(1). P.56-60. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-6 (In Russian)

© The Authors

Введение

Подвиды *Apis mellifera* на основе анализа их морфометрических признаков и геномов были сгруппированы в четыре эволюционные ветви: африканскую (А), восточную (О), северно-средиземноморскую (С) и западно-европейскую (М) [Ruttner, 1988; Wallberg et al., 2014]. Уральские горы представляют собой восточную границу распространения подвида *A. m. mellifera* L., одного из представителей эволюционной ветви М. На территории Республики Башкортостан (РБ) обитают несколько подвидов *Apis mellifera* L.: тёмная лесная пчела *A. m. mellifera*, карпатская пчела *A. m. carpatica*, серая горная кавказская пчела *A. m. caucasica* и краинская пчела *A. m. carnica* [Кривцов (Krivtsov), 2009; Ильясов и др. (Ilyasov et al.), 2017]. Наибольшее значение имеют популяции тёмной лесной пчелы, поскольку они являются аборигенными.

Исследования генетической структуры популяций пчёл РБ начались в 1990-е годы [Никоноров и др. (Nikonov et al.), 1998]. При этом основное внимание было уделено бурзянской популяции *A. m. mellifera* [Шафиков (Shafikov), 1978; Николенко и др. (Nikloenko et al.), 2000]. Дальнейшие исследования были посвящены поиску новых резерватов тёмной лесной пчелы. Согласно данным [Каскинова и др. (Kaskinova et al.), 2015; Ильясов и др. (Ilyasov et al.), 2017;] в семи районах РБ доля генофонда *A. m. mellifera* варьирует от 0.8 (Караидельский) до 0.98 (Янаульский и Балтачевский). В Бурзянском районе этот показатель составил 0.96 для выборки численностью 326 семей. Если учитывать только выборки большого размера (N>100), то в РБ есть четыре резервата *A. m. mellifera* – в Бурзянском, Караидельском, Татышлинском и Янаульском районах. Наибольший уровень гибридизации наблюдается в Куюргазинском (0.92) и Хайбуллинском (0.94) районах. В остальных районах доля генофонда *A. m. mellifera* варьирует от 0.12 (Мелеузовский район) до 0.75 (Бирский район). Таким образом, в Республике Башкортостан сохранились популяции тёмной лесной пчелы в отдельных, преимущественно горных и лесных районах.

Цель данной работы – оценить текущий уровень интрогрессии генофонда эволюционной ветви С в выборках *A. m. mellifera* из северных районов РБ: Балтачевского, Бирского, Благовещенского, Буряевского, Татышлинского и Янаульского районов.

Материалы и методы

Пробы пчел были отобраны летом 2023 года в шести районах РБ: Балтачевского (N=30 семей), Бирского (N=38), Благовещенского (N=55), Буряевского (N=24), Татышлинского (N=10) и Янаульского (N=42). ДНК выделяли из мышц торакса рабочих пчел с использованием набора ДНК-ЭКСТРАН-2 (ООО СИНТОЛ, Москва). Для установления подвидовой принадлежности были использованы локус *COI-COII* мтДНК и девять микросателлитных локусов яДНК (*Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28*). Смесь ПЦР на 10 образцов общим объемом 150 мкл включала 120 мкл дистиллированной воды, 15 мкл магниевого буфера, 3 мкл смеси dNTP (концентрация 10 мкм каждого), по 5 мкл F-прайма и R-прайма (концентрация 10 пикомоль/мкл) и 3 мкл Taq-полимеразы (компоненты ПЦР-смеси производства ООО "Синтол"). Режим ПЦР: 3 мин 94°C, затем 30 циклов с денатурацией 30 сек при 94°C, отжигом 30 сек при 49°C (для локуса *tRNA^{Leu}-COII*) и 55°C (для микросателлитных локусов), элонгацией 60 сек при 72°C и конечной элонгацией 3 мин при 72°C. Для визуализации продуктов амплификации использовали электрофорез в 8% полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей детекцией в фотосистеме Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad, США). Кластерный анализ осуществлён в ПО Structure 2.3.4. с использованием модели Admixture с Burnin Period и MCMC равными 10 000 и 100 000 соответственно. Число кластеров задано от 1 до 10. Предполагаемое число кластеров рассчитывали в онлайн-сервисе Structure Harvester [Earl, vonHoldt, 2012]. Полученные в Structure результаты обрабатывали в CLUMPP 1.1.2 с помощью алгоритма FullSearch.

Результаты и обсуждение

В пяти из шести районов РБ выявлен аллельный вариант Q, характерный для ветви С (таблица 1). Наибольшее число семей, происходящих по материнской линии от ветви С, зафиксировано в Благовещенском (35% семей) и Бирском (39% семей) районах. Все десять семей из Татышлинского района происходят от эволюционной ветви М.

Основным методом оценки уровня интрогрессии генов является использование Байесовского подхода

при определении популяционно-генетической структуры по данным полиморфизма микросателлитных локусов, реализованного в программе Structure 2.3.4. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов в пчелиных семьях из эволюционной ветви М показал, что наибольший уровень гибридизации имеют семьи из Бирского (34%) и Благовещенского (44%) районов. Наименьший уровень гибридизации наблюдается в Балтачевском (12%) и Янаульском (5%) районах.

Таблица 1. Результаты анализа межгенного локуса *COI-COII* и оценки уровня гибридизации семей *A. m. mellifera*

Table 1 - Results of analysis of the intergenic locus *COI-COII* and assessment of the hybridization level of *A. m. mellifera* colonies

Район / District	Число семей Quantity of family	Вариант аллеля локуса <i>COI-COII</i> <i>Allele variant of COI-COII locus</i>			Доля М* Portion of M*	Доля С* Portion of C*
		PQQQ	PQQ	Q		
Балтачевский / Baltachevsky	30	0	29	1	0.88	0.12
Бирский / Birskey	38	4	19	15	0.66	0.34
Благовещенский / Blagoveshchensky	55	4	32	19	0.56	0.44
Бураевский / Buraevsky	24	0	17	7	0.87	0.13
Татышлинский / Tatyshlinsky	10	1	9	0	0.86	0.14
Янаульский / Yanaulsky	42	7	31	4	0.95	0.05

*доля генофонда М и С рассчитана только для семей из ветви М (аллельный вариант PQQQ, PQQ).

Также для оценки структуры популяции рассчитаны попарные *Fst* между исследуемыми и референсными выборками трёх подвидов (*A. m. mellifera*, *A. m. caucasica*, *A. m. carnica*). В таблице 2 под номерами обозначены: 1 – референсная выборка *A. m. caucasica*, 2 – референсная выборка *A. m. carnica*, 3 – референсная выборка *A. m. mellifera*, 4 – выборка из Бирского района, 5 – выборка из Благовещенского

района, 6 – выборка из Янаульского района, 7 – выборка из Балтачевского района, 8 – выборка из Бураевского района, 9 – выборка из Татышлинского района. Наибольший уровень дивергенции выявлен между выборкой из Татышлинского района и референсной *A. m. caucasica*. Наименьший значимый уровень дивергенции – между янаульской и балтачевской выборками.

Таблица 2.

Попарные *Fst* между исследуемыми и референсными выборками (где NS - not significant, * - $P \leq 0.05$, ** - $P \leq 0.01$)

Table 2 - Pairwise *Fst* between studied and reference samples (where NS - not significant, * - $P \leq 0.05$, ** - $P \leq 0.01$)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	0.0000	**	**	**	**	**	**	**	**
2	0.3921	0.0000	**	**	**	**	**	**	**
3	0.6305	0.6020	0.0000	**	**	**	**	**	NS
4	0.4415	0.3696	0.1710	0.0000	NS	**	*	NS	NS
5	0.3638	0.2972	0.2113	0.0036	0.0000	**	**	**	**
6	0.6066	0.5602	0.0103	0.0889	0.1331	0.0000	*	NS	NS
7	0.5656	0.5133	0.0512	0.0533	0.0927	0.0264	0.0000	NS	NS
8	0.5597	0.5054	0.0546	0.0479	0.0678	0.0129	0.0200	0.0000	NS
9	0.6129	0.5645	0.0188	0.0703	0.1084	0.0094	-0.0110	0.0096	0.0000

Оценка генетического расстояния Nei [Nei, 1983] с использованием метода ближайшего соседа (neighbor-joining method) показала, что две выборки (бирская и благовещенская) вошли в один кластер с

референсными выборками *A. m. caucasica* и *A. m. carnica*. Оставшиеся четыре выборки сформировали общий кластер с *A. m. mellifera*.



Рисунок 1 Дендрограмма филогенетического родства исследуемых выборок *Apis mellifera*
Figure 1 Dendrogram of phylogenetic relationship of the studied samples of *Apis mellifera*

Таким образом, из шести исследуемых районов только в четырёх выявлены семьи *A. m. mellifera* с низким уровнем гибридизации. С целью сохранения генофонда тёмной лесной пчелы пчеловодам было рекомендовано не использовать семьи эволюционной ветви С для дальнейшего разведения или выполнить в них мероприятия по замене матки.

Заключение

Выполнен анализ генетической структуры выборок пчёл из шести северных районов Республики Башкортостан: Балтачевского, Бирского, Благовещенского, Бураевского, Татышлинского и Янаульского. Анализ полиморфизма локуса *COI-COII* мтДНК позволил выполнить первичную оценку пчелосемей – было установлено к какой из эволюционных ветвей (М или С) принадлежат исследуемые семьи. С помощью анализа микросателлитных локусов ядерной ДНК определён уровень гибридизации семей *A. m. mellifera*. Наименьший уровень гибридизации выявлен в выборках из Янаульского, Татышлинского, Бураевского и Балтачевского районов. Наибольший уровень гибридизации наблюдался в семьях из Бирского и Благовещенского районов – в этих двух районах выявлено большое количество семей из эволюционной ветви С.

Литература

1. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Смешение и сохранение чистопородного генофонда тёмной лесной пчелы *Apis mellifera*

mellifera на Урале и в Поволжье // Биомика. 2017. Т. 9(1). С. 6-11.

2. 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.

3. Кривцов Н.И., Сокольский С.С., Любимов Е.М. Серые горные кавказские пчелы // Сочи: Научно-исследовательский институт пчеловодства (НИИП), 2009. 192 с.

4. Николенко А.Г., Саттаров В.Н., Косарев М.Н., Юмагузин Ф.Г. Генетические исследования бурзянской бортовой пчелы // Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия. Уфа: Башкирский государственный университет, 2000. С. 71 – 77.

5. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала // Генетика. 1998. Т. 34. № 11. С. 1574–1577.

6. Шафиков И.В. Изучение и селекция бурзянских бортовых пчел Башкирского государственного заповедника // Пчеловодство. 1978. №5. С. 5.

7. Earl D.A., vonHoldt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conservation Genetics Resources. 2012. V. 4(2). P. 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7

8. Nei M., Tajima F., Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data // *Journal of Molecular Evolution*. 1983. V.19. P.153-170. doi: 10.1007/BF02300753
9. Ruttner F. *Biogeography and Taxonomy of Honey bees* // Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 288 p.
10. Wallberg A., Han F., Wellhagen G., Dahle B., Kawata M., Haddad N., Simões Z.L., Allsopp M.H., Kandemir I., De la Rúa P., Pirk C.W., Webster M.T. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera* // *Nature Genetics*. 2014. V. 6(10). P.1081 – 1088. doi: 10.1038/ng.3077
4. Krivtsov N.I., Sokol'skij S.S., Lyubimov E.M. *Serye Gornye Kavkazskie Pchyoly*. Sochi, Russia. 2009. 192p. (In Russian).
5. Nei M., Tajima F., Tateno Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*. 1983. V.19. P.153-170. doi: 10.1007/BF02300753
6. Nikolenko A.G., Sattarov V.N., Kosarev M.N., YUmaguzhin F.G. Geneticheskie issledovaniya burzyanskoj bortevoj pchely. *Geneticheskie aspekty sohraneniya biologicheskogo raznoobraziya*. Ufa: Bashkirskij gosudarstvennyj universitet. 2000. S. 71 – 77. (In Russian).
7. Nikonorov Yu.M., Benkovskaya G.V., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. The use of the PCR technique for control of pure breeding of honeybee (*Apis mellifera mellifera* L.) colonies from the Southern Urals. *Russ. J. Genet.* 1998. V. 34(11). P. 1344–1347.
8. Ruttner F. *Biogeography and Taxonomy of Honey bees*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 288 p.
9. Shafikov I.V. Izuchenie i selekciya burzyanskih bortevyh pchel Bashkirskogo gosudarstvennogo zapovednika. *Pchelovodstvo*. 1978. №5. S. 5. (In Russian).
10. Wallberg A., Han F., Wellhagen G., Dahle B., Kawata M., Haddad N., Simões Z.L., Allsopp M.H., Kandemir I., De la Rúa P., Pirk C.W., Webster M.T. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*. 2014. V. 6(10). P.1081 – 1088. doi: 10.1038/ng.3077

References

1. Earl D.A., vonHoldt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 2012. V. 4(2). P. 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
2. Ilyasov R.A., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. The admixture and conservation of purebred gene pool in the dark European honeybees *Apis mellifera mellifera* in the Urals and the Volga region. *Biomics*. 2017. V. 9(2). P. 6-11. (In Russian)
3. Kaskinova M.D., Ilyasov R.A., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Analysis of the genetic structure of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations. *Russian Journal of Genetics*. 2015.V. 51(10), P. 1033–1035.