



# БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ АЛТАЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ТЕМНОЙ ЛЕСНОЙ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFERA MELLIFERA* L.

Каскинова М.Д.<sup>1\*</sup>, Салтыкова Е.С.<sup>1</sup>, Гайфуллина Л.Р.<sup>1</sup>, Поскряков А.В.<sup>1</sup>, Шунк А.А.<sup>2</sup>, Николенко А.Г.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Республика Башкортостан, Уфа, проспект Октября, д. 71. \*E-mail: [kaskinovamilyausha@mail.ru](mailto:kaskinovamilyausha@mail.ru)

<sup>2</sup>Алтайский край, Третьяковский р-н, с. Староалейское

### Резюме

Алтайская популяция темной лесной пчелы, наряду с башкирской и орловской, считалась наиболее известной и стабильной. До последнего времени в Алтайском крае предполагалось существование горнотаежной и лесостепной популяций *Apis mellifera mellifera* L., однако их генофонд требовал ревизии. Установление современного генетического состояния и уровня интрогрессии генов из эволюционной линии С в данной популяции даст возможность определить степень ее сохранности и позволит предпринять меры по улучшению ситуации. Представлены результаты анализа подвидовой принадлежности медоносной пчелы из лесостепной и горнотаежной зон Алтайского края при помощи SSR локусов Ar243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ar049, A28 и локуса *COI-COII* мтДНК. Анализ локуса *COI-COII* мтДНК подтвердил текущий опасный завоз пчёл эволюционной линии С в лесостепную зону. Кластерный анализ на основе полиморфизма девяти SSR локусов ядерной ДНК выявил уровень интрогрессии С на уровне 0.28. Тогда как в выборках *A.m.mellifera* из Республики Башкортостан и Пермского края он был лишь на уровне 0.013 и 0.003 соответственно. В то же время относительно низкий показатель гетерозиготности позволяет рассчитывать на возможность восстановления генофонда алтайской популяции темной лесной пчелы. Различий между выборками из лесостепной и горнолесной зон не выявлено. Горно-таежная зона Алтайского края представляет собой перспективную территорию для разведения темной лесной пчелы.

**Ключевые слова:** *Apis mellifera* L., темная лесная пчела, SSR полиморфизм, локус *COI-COII*, гибридизация, Алтайский край

**Цитирование:** Каскинова М.Д., Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Поскряков А.В., Шунк А.А., Николенко А.Г. Генетическое состояние алтайской популяции темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. Биомика. 2018. Т.10(3). С. 281-285. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-37

## THE GENETIC STATUS OF DARK FOREST BEE POPULATION (*APIS MELLIFERA MELLIFERA*) IN ALTAI KRAI

\*Kaskinova M.D.<sup>1</sup>, Saltykova E.S.<sup>1</sup>, Gaifullina L.R.<sup>1</sup>, Poskryakov A.V.<sup>1</sup>, Shunk A.A.<sup>2</sup>, Nikolenko A.G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Russia, Ufa, 450054, Prospect Oktyabrya 71, \*Email: [kaskinovamilyausha@mail.ru](mailto:kaskinovamilyausha@mail.ru)

<sup>2</sup>Russia, Altai Krai, Tret'yakovskiy district, vil. Staroaleiskoe

### Resume

The Altai population of the dark forest bee, along with the Bashkir and Orlov ones, was considered the most famous and stable. Until recently in Altai Krai assumed the existence of mountain taiga and forest-

steppe populations of *Apis mellifera mellifera*, but their gene pool required revision. The establishment of a modern genetic state and the level of introgression of genes from the evolutionary line C in this population will allow to determine the degree of its preservation and allow to take measures to improve the situation. The results of the analysis of genetic origin of the honey bee from the forest-steppe and mountain-taiga zones of Altai Krai with the help of SSR loci Ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28 and the locus *COI-COII* mtDNA are presented. Analysis of the *COI-COII* locus of mtDNA confirmed the current hazardous importation of the bees of the evolutionary line C to the forest-steppe zone. Cluster analysis based on the polymorphism of nine SSR loci of nuclear DNA revealed an introgression level of C line at 0.28. At the same time, a relatively low heterozygosity allows one to count on the possibility of restoring the gene pool of the Altai population of a dark forest bee.

**Key words:** *Apis mellifera* L., dark forest bee, SSR polymorphism, locus *COI-COII*, hybridization, Altai Krai

**Citation:** Kaskinova M.D., Saltykova E.S., Gaifullina L.R., Poskryakov A.V., Shunk A.A., Nikolenko A.G. The genetic status of dark forest bee population (*Apis mellifera mellifera* L.) in Altai Krai. *Biomics*. 2018. V.10(3) P. 281-285. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-37

### Введение

Рост потерь пчелиных семей заставил генетиков и селекционеров обратить особое внимание на устойчивость колоний к окружающей среде, свойственную, в первую очередь, аборигенным популяциям. Для пчеловодства России и Северной Европы в целом наиболее значимым с точки зрения устойчивости является такой подвид как тёмная лесная пчела *A.m.mellifera*. За последние годы было обнаружено несколько сохранившихся популяций *A.m.mellifera*: бурзянская и татышлинская – в Республике Башкортостан (РБ), вишерская – в Пермском крае, камбарская – в Республике Удмуртия [Ильясов и др., 2016]. Поиск резерватов продолжается. Большой интерес представляет вопрос о сохранности алтайской популяции, которая в советское время наряду с башкирской и орловской (полесской) считалась наиболее известной и стабильной [Билаш, Кривцов, 1991].

Естественный ареал медоносной пчелы на востоке ограничен Уральскими горами. Впервые в Сибирь, на Алтай в Усть-Каменогорскую крепость 30 колод с пчелами были завезены в 1776 году из Башкирии по ходатайству главного медика пограничных сибирских войск Беренса, однако зимних кормов было оставлено недостаточно, и в период зимовки 1778 года пчелы погибли [Миньков, 1954]. В 1786 году по просьбе полковника Аршеневского пчелы были повторно завезены из Полесья Киевской губернии. Условия оказались благоприятными: пчел стали разводить, а затем и продавать. В итоге линия казацких крепостей между Кузнецком и Бийском стала опорной базой расселения тёмной лесной пчелы в Сибири [Костенков, 1992].

До последнего времени в Алтайском крае предполагалось существование горнотаежной и лесостепной популяций этого подвида [Шунк, 2008],

однако их генофонд требовал ревизии. По морфометрическим данным С.Е. Чернышева [Чернышев, 1982] эти популяции в конце прошлого века были гибридными, но сохраняли физиологические и поведенческие особенности пчёл среднерусской породы.

Для установления подвидовой принадлежности алтайских пчел мы проанализировали выборки пчел из лесостепной и горно-таежной зон при помощи SSR локусов Ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28 и локуса *COI-COII* мтДНК.

### Материалы и методы

В исследовании были использованы рабочие пчелы из Алтайского края (N=74 семей), собранные осенью 2017 года в с. Староалейское Третьяковского района (N=27), с. Волчиха Волчихинского района (N=19), урочище Кулемное Чарышского (N=20) района и в г. Барнаул (N=8). Также были использованы данные, полученные в 2003 году для выборки из Шипуновского района (N=12). Город Барнаул, Волчихинский, Третьяковский и Шипуновский районы имеют равнинный рельеф и относятся к лесостепной зоне, тогда как Чарышский район – к горнотаежной. В качестве референтных групп были использованы выборки *A.m.mellifera* из Бурзянского района РБ (N=123) и Пермского края (N=135), и выборки из Республики Адыгея (*A.m.carnica*, N=15), Краснодарского края (*A.m.caucasica*, N=42) и Закарпатской области Украины (*A.m.carpatica*, N=15), принадлежащие к эволюционной ветви C.

Выделение ДНК проводили набором реактивов ДНК-ЭКСТРАН-2 фирмы Синтол. Исследование включало ПЦР-анализ локуса *COI-COII* мтДНК и SSR локусов Ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28. Смесь ПЦР включала 17

мкл дистиллированной воды, 2 мкл магниевого буфера, 0,4 мкл dNTP (10 мкм), 0,6 мкл F- и R-праймеров (2 ОЕ) и 0,3мкл Taq-полимеразы. Режим ПЦР: 5 мин 94<sup>0</sup>С, затем 30 циклов с денатурацией 30 сек при 94<sup>0</sup>С, отжигом 30 сек при 54,5<sup>0</sup>С, элонгацией 60 сек при 72<sup>0</sup>С и конечной элонгацией 7 мин при 72<sup>0</sup>С.

Вычисления показателей генетического разнообразия производили при помощи программ FSTAT ver. 2.9.3.2 и GenePop ver.4.7.0. Для определения генетической структуры популяций медоносной пчелы была использована программа Structure 2.3.4 с заданным числом кластеров от 1 до 10 и от 1 до 5. 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 MСMС равных 10 000 и 100 000 повторов соответственно. Результаты анализа обрабатывали в CLUMPP 1.1.2 с помощью алгоритма FullSearch.

### Результаты и обсуждение

Результаты исследования представлены на рисунке 1. Анализ локуса *COI-COI* мтДНК показал встречаемость аллеля Q, характерного для эволюционных линий С и О, с частотой 0.148 в Третьяковском районе и 0.834 в Шипуновском районе, что отражает продолжающийся завоз южных пород в лесостепную зону Алтайского края. В пробах из остальных районов был выявлен аллель PQQ, характерный для *A.m.mellifera L.*, с частотой 1.00.

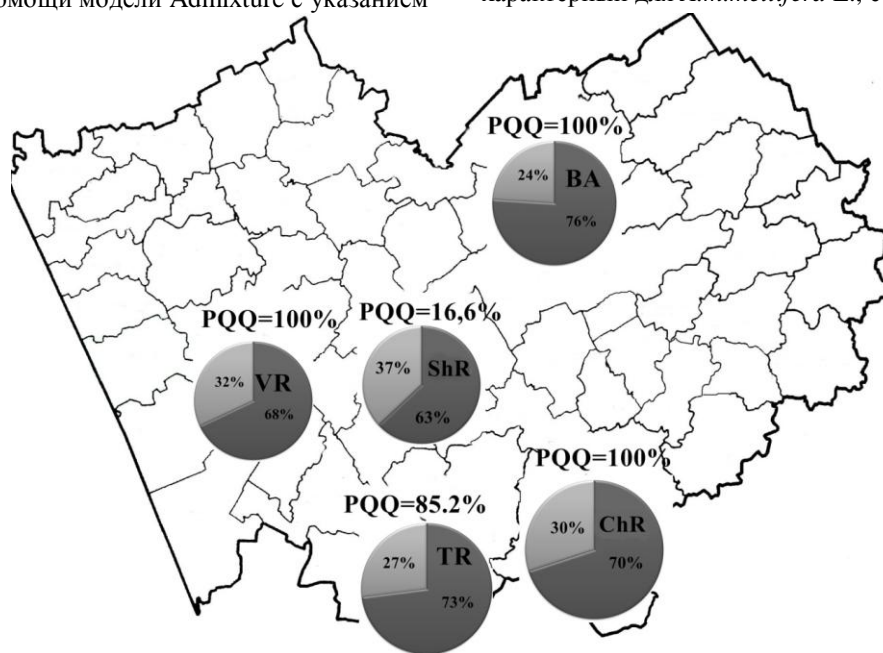


Рис. 1. Географическая локализация выборок *Apis mellifera L.* из Алтайского края: TR – выборка из Третьяковского района, VR – выборка из Волчихинского района, ChR – выборка из Чарышского района, BA – выборка из г. Барнаул, ShR – выборка из Шипуновского района  
 Fig. 1. Geographic localization of samples of *Apis mellifera L.* from the Altai region: TR – a sample from the Tret'yakov district, VR – samples from Volchikhinskiy district ChR – samples from the Charyshsky district, BA – samples from Barnaul, ShR – samples from Shipunovsky district

Кластерный анализ показал наличие двух предполагаемых групп как при заданном числе кластеров от 1 до 10, так и от 1 до 5. Первая группа была образована выборками темной лесной пчелы из РБ и Пермского края. В состав второй группы вошли пчелы из эволюционной линии С. Уровень интрогрессии генофонда линии С в алтайской популяции (рис. 2) составил в среднем 0.28, тогда как в выборках *A.m.mellifera* из РБ и Пермского края он был лишь на уровне 0.013 и 0.003 соответственно.

Среди выборок, собранных в 2017 году, уровень интрогрессии чужеродного генофонда был приблизительно на одном уровне, как в лесостепной зоне (Волчихинский район – 0.32, Третьяковский – 0.27), так и горнолесной (Чарышский район – 0.30). В выборке из Барнаула интрогрессия составила 0.24, в Шипуновском районе – 0.37 (рис.1). Для сравнения в Польше, на территориях, где разрешается разводить разные породы пчел, уровень интрогрессии составляет 0.32, а на территориях где разрешено содержать только темную лесную пчелу он варьирует

от 0.08 до 0.11 [Oleksa et al., 2011]. Среди резерватов тёмной лесной пчелы Западной Европы максимальный уровень интрогрессии наблюдался в датском заказнике – 0.12 [Jensen et al., 2005].

При анализе генетического разнообразия был выявлен дефицит гетерозигот ( $p = 0.0006$ ). Значение  $F_{is}$  варьировало от  $-0.219$  (Барнаул) до  $+0.317$  (Шипуновский район). Уровень дивергенции  $F_{st}$

(таб.1) между выборками из районов Алтайского края варьировал от 0.0287 между Чарышским и Третьяковским районами до 0.4387 между Барнаулом и Шипуновским районом, что в большей степени отражает географическую удалённость, чем расположение в разных растительных зонах, и также, как и уровень интрогрессии, не подтверждает наличие двух разных популяций.

Таблица 1.

Попарные расстояния  $F_{st}$  между выборками *Apis mellifera* L., где \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$   
Table 1. Pairwise distances of  $F_{st}$  between samples of *Apis mellifera*, where \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$

	TR	VR	ChR	BA	ShR
TR	0.0000	0.0518**	0.0287*	0.1017**	0.2151**
VR		0.0000	0.0301**	0.1988**	0.1713**
ChR			0.0000	0.1382*	0.2489**
BA				0.0000	0.4387**
ShR					0.0000

Интересно, что при явной гибридизации алтайской выборки, значения гетерозиготности для неё были относительно невелики: наблюдаемая ( $H_o$ ) – 0.326, ожидаемая ( $H_e$ ) – 0.373. В случае межподвидовой гибридизации гетерозиготность существенно возрастает, в то время как в генетически чистых, естественных популяциях медоносных пчел значения гетерозиготности не превышают 0.3, как, например, в бурзянской ( $H_o=0.28$ ;  $H_e=0.25$ ) и вишерской ( $H_o=0.18$ ;  $H_e=0.15$ ) популяциях [Ильясов и др., 2016]. Близкий уровень гетерозиготности в алтайской выборке оставляет надежду на относительно хорошую сохранность генофонда за счёт более жёсткой селекции.

Таким образом, несмотря на преобладание гаплотипа RQQ мтДНК, соответствующего эволюционной линии M, выборка из Алтайского края показала значительный уровень интрогрессии генофонда линии C (обозначено светло-серым на круговой диаграмме, рис. 1), т.е. исследуемая выборка пчел из алтайской популяции представлена в основном гибридами. Не выявлено различий между выборками из лесостепной и горнолесной зон. В тоже время, относительно невысокий уровень гетерозиготности позволяет надеяться на восстановление генофонда алтайской популяции *A.m.mellifera* при проведении необходимых мероприятий.

Горно-таежная зона Алтайского края представляет собой перспективную территорию для разведения темной лесной пчелы. Природный комплекс из долин и окружающих их гор позволит содержать пасеки на обширных территориях, не

опасаясь гибридизации с нежелательными подвидами. В любом случае требуется детальная ревизия пчелиных семей региона на породную принадлежность в сочетании с селекцией по хозяйственно-полезным признакам и мероприятиями по восстановлению генофонда.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 17-44-020648 р\_поволжье\_a с использованием ресурсов ЦКП УФИЦ РАН и ЦКП "Коллекция насекомых ИБГ УФИЦ РАН".

#### Литература

1. Билаш Г.Д., Кривцов Н.И. Селекция пчёл. Москва: Агропромиздат, 1991. 304 с.
2. Ильясов Р. А., Поскряков А. В., Петухов А. В., Николенко А. Г. Молекулярно-генетический анализ пяти сохранившихся резерватов темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* Урала и Поволжья // Генетика. 2016. Т. 52. № 8. С. 931–942.
3. Костенков П.П. Сибирскому пчеловоду. Барнаул: Веди, 1992. 80 с.
4. Миньков С. Г. Из истории пчеловодства на Алтае // Пчеловодство. 1954. № 3. С. 62–64.
5. Чернышов С.Е. Эколого-морфологические особенности и хозяйственная ценность медоносных пчел (На примере Алтайского края): Автореф. дис. ... канд. сельскохоз. наук. – Москва, 1982. 20 с.
6. Шунк А.А. Ройливость местных пчел Алтая // Пчеловодство. 2008. №4. С.35–37.
7. 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.
8. Oleksa A., Chybicki I., Tofilski A., Burczyk J. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland // *J. Apicult. Res.* 2011. V. 50(2). P. 116-129.
- References**
1. Bilash G.D., Krivtsov N.I. Seleksiya pchyel. Moscow. Agropromizdat, 1991. 304 p. [Bee Breeding – In Russian]
  2. Chernyshov S.E. Ekologo-morfologicheskie osobennosti i hozjajstvennaja cennost' medonosnyh pchyel (Na primere Altajskogo kraja): Avtoref. dis. ... kand. sel'skhoz. nauk. – Moskva, 1982. 20 s. [Ecological and morphological features and economic value of honey bees (on the example of Altai Krai): author. dis. ... kand. agricultural. sciences. - Moscow, 1982. 20 P. – In Russian]
  3. Ilyasov R.A., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G., Petukhov A.V. Molecular genetic analysis of five extant reserves of black honeybee *Apis mellifera mellifera* in the Urals and the Volga region. *Russ. J. Genet.* 2016. V.52(8). P.828-839. DOI: 10.1134/S1022795416060053
  4. 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.
  5. Kostenkov P.P. Sibirskomu pchelovodu. Barnaul: Vedi, 1992. 80 s. [For Siberian beekeeper - In Russian]
  6. Min'kov S. G. Iz istorii pchelovodstva na Altae. *Pchelovodstvo.* 1954. № 3. S. 62–64. [From the history of beekeeping in Altai – In Russian]
  7. Oleksa A., Chybicki I., Tofilski A., Burczyk J. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland. *J. Apicult. Res.* 2011. V. 50(2). P. 116-129.
  8. Shunk A.A. Roylivost' mestnykh pchyel Altaya. *Pchelovodstvo.* 2008. No4. S.35–37. [Swarming of local bees of Altai - In Russian]