



БИОМИКА/BIOMICS

<http://biomics.ru>



ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ: НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

Кучер А.Н., Островерхова Н.В., Конусова О.Л., Киреева Т.Н., Курбатский Д.В.

Национальный исследовательский Томский государственный университет (ТГУ),
634050, г. Томск, пр. Ленина, д. 36, E-mail: nvostrov@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Данные о генетическом разнообразии по маркерам ядерного и митохондриального геномов активно используются при проведении как фундаментальных, так и прикладных исследований медоносной пчелы *Apis mellifera* L. В статье приводятся результаты комплексного изучения медоносной пчелы ряда территорий Сибири (Томская область, Красноярский край): охарактеризована вариабельность локуса *COI-COI* мтДНК на уровне пчелиных семей и популяций; оценено соответствие отнесения к породе на основании данных анализа локуса *COI-COI* и морфометрических параметров (кубитальный и гантельный индексы, дискоидальное смещение), описана вариабельность ряда микросателлитных локусов (*A007*, *A008*, *Ap049*, *AC117*, *AC113*, *A024*). Показано, что в пчелиных семьях, обитающих на пасеках Томской области, в ряде случаев выявлялись два и даже три варианта локуса *COI-COI* мтДНК (различные сочетания вариантов PQQ, PQQQ (характерны для среднерусской породы) и Q (характерен для южных пород)); зарегистрировано несоответствие между породной принадлежностью, определяемой по морфометрическим данным, и вариантом локуса *COI-COI*; в гибридных пчелиных семьях, происходящих по линии матки от пород южного происхождения (вариант Q), наблюдается быстрое вытеснение «южных» генов генами среднерусской породы. Установлен специфичный характер распределения частот аллелей по ряду микросателлитных локусов в пчелиных семьях сибирского региона (Томская область, Красноярский край), различающихся по происхождению: наибольшая дифференциация показана по локусам *A008*, *A043*, *Ap049*, несколько меньше - по локусам *AC113* и *A024*. Сопоставление собственных результатов с данными по другим популяциям (башкирские популяции, различные популяции Западной Европы) позволили предположить, что локусы *A024*, *Ap049* и *A043* могут быть объектом более пристального исследования с точки зрения их информативности для разработки диагностикумов породной принадлежности; локус *A008*, возможно, маркирует различные экотипы среднерусской породы. Основываясь на результатах собственного исследования, а также данных работ других исследователей, обсуждаются некоторые проблемы, с которыми могут столкнуться исследователи при изучении генетического разнообразия медоносных пчел, а также возможные пути их решения.

Ключевые слова: медоносная пчела, генетическое разнообразие, локус *COI-COI* мтДНК, микросателлитные локусы.

ВВЕДЕНИЕ

Медоносная пчела является одним из основных видов насекомых-опылителей, которые опыляют около 85 % всей цветковой флоры, поэтому, как ресурсный вид, представляет огромный научный и практический интерес. В последние годы отмечается ряд негативных тенденций в развитии популяций медоносной пчелы. Так, во многих регионах наблюдается бессистемное, научно необоснованное и бесконтрольное воспроизведение пчелиных семей различных пород, что привело к массовой гибридизации пчел, нарушение адаптации пчелиных семей и потере чистопородности. Как следствие, снижается уровень приспособленности пчелиных семей к факторам окружающей среды, в

частности, отмечена массовая их гибель во всем мире, что, по мнению многих исследователей, может привести к катастрофическим последствиям, вплоть до исчезновения пчеловодства в ближайшее время [Кривцов, 2008, 2011; Кичигин, 2009; Кривцов и др., 2011; Причард, 2008; Mussen, 2007; Schefer et al., 2009; Van Engelsdorp, 2009; Genersch, 2010; Neumann, Carreck, 2010; Ratnieks, Carreck, 2010; Dietemann et al., 2013; Van Der Zee et al., 2014].

На территории России вследствие разнообразия природно-климатических условий к разведению рекомендованы три породы пчел: среднерусская, или темная лесная пчела (*Apis mellifera mellifera* L.) и породы южного происхождения - карпатская (*Apis*

mellifera carnica var. *ukrainica carpatica*, производная *Apis mellifera carnica* Pollm.) и серая горная кавказская (*Apis mellifera caucasica* Gorb.) [Кривцов и др., 2011]. Однако система районирования разных пород на территории России в настоящее время не работает. На пасеки Урала, Сибири, Алтая и других регионов России, где традиционно разводилась среднерусская пчела, активно завозятся породы южного происхождения, преимущественно карпатская порода, как наиболее миролюбивая. В результате наблюдается массовая межпородная гибридизация медоносных пчел, что ведет к сокращению ареала аборигенных подвидов и «ухудшению» их генетического состава. Гибридные популяции менее адаптированы к резко изменяющимся в течение года условиям окружающей среды, характеризуются повышенным уровнем заболеваемости и снижением иммунитета.

Для преодоления этих негативных проблем (коллапс пчел и пчелиных семей, массовая межпородная гибридизация пчел, потеря чистопородности пчел и др.) и научно-обоснованного управления сохранением этого важного биоресурса необходимо комплексное изучение медоносной пчелы, направленное на понимание биологии адаптации (в широком смысле), размножения и развития. Секвенирование в 2006 году генома медоносной пчелы [Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006] дало новый импульс для исследований в данном направлении: с использованием молекулярно-генетических технологий проводится поиск маркеров хозяйственно-ценных признаков [Baitala et al., 2010; Parpinelli et al., 2014], устойчивости к болезням [Tsuruda et al., 2012], адаптации к природно-климатическим условиям [Fuller et al., 2015], определяющих породную принадлежность [Зиновьева и др., 2011; Кривцов и др., 2011; Nan et al., 2012; Meixner et al., 2013] и т.д. Базисным для проведения исследований по любому из данных фундаментальных направлений (как и для работ, имеющих прикладной характер) является характеристика генетического разнообразия пчелиных семей, пород и популяций медоносной пчелы. В то же время, исследование генетического разнообразия

различных пород медоносной пчелы и геногеографические исследования для данного вида пока еще не получили широкого распространения. Даже для наиболее изучаемых микросателлитных локусов в настоящее время все еще мало информации по их варибельности у пчел разных популяций не только России, но и мира в целом [Garnery et al., 1998; Franck et al., 1998; Ильясов и др., 2015]. Ограниченный объем выполненных работ по изучению варибельности микросателлитных локусов и является причиной того, что до сих пор не разработаны референс-материалы по микросателлитным локусам [Meixner et al., 2013] и не определены оптимальные ДНК-маркеры для идентификации пород пчел.

Для характеристики генетического разнообразия любых видов, в том числе и медоносной пчелы, принципиально важным является учет как универсальных требований изучения генетической изменчивости (например, требования к объему выборки в зависимости от уровня полиморфизма изучаемых локусов), так и особенностей биологии размножения (полиандрия) и жизнедеятельности пчел как вида (в форме организованного сообщества - пчелиной семьи, смена поколений и др.), а также уровень изучения генетического разнообразия (пчелиная семья, популяция), который был выбран для исследования.

Цель настоящей публикации: на основании обобщения результатов комплексного исследования медоносной пчелы сибирских популяций рассмотреть некоторые проблемы, с которыми могут столкнуться исследователи при изучении генетического разнообразия медоносных пчел, и определить пути их преодоления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы для данного исследования получены в ходе комплексного изучения популяций медоносной пчелы Сибирского региона (обитающих на территории Томской области (рис. 1), Алтайского и Красноярского краев), проводимого на кафедре зоологии беспозвоночных Национального исследовательского Томского государственного университета.

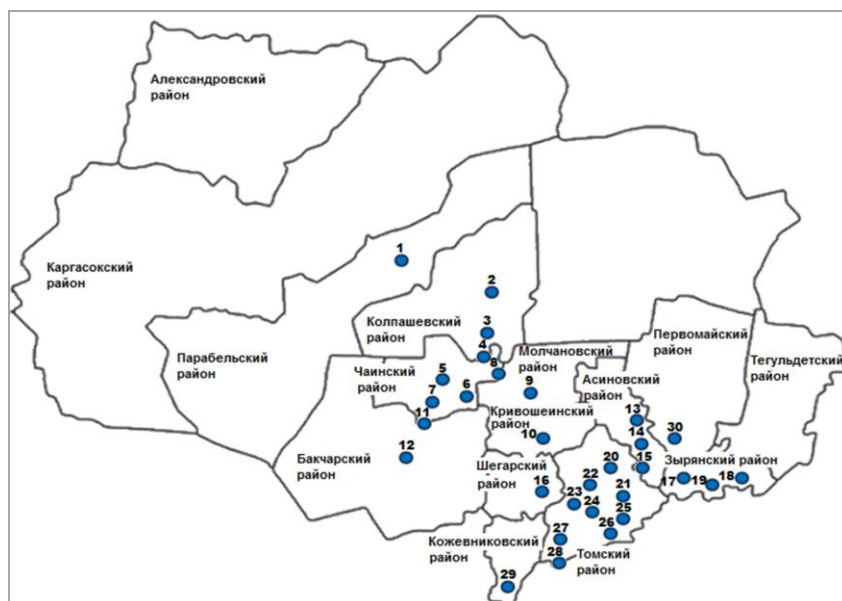


Рисунок 1. Локализация обследованных пасек Томской области.

Определение породной принадлежности проводилось с учетом изменчивости морфометрических показателей (анализировались показатели жилкования правого переднего крыла - кубитальный и гантельный индексы, дискоидальное смещение) и данных изменчивости локуса *COI-COII* митохондриальной ДНК. Показатели жилкования крыла, определенные согласно принятым методикам [Бородачев и др., 2002; Конусова и др., 2010], сравнивали со стандартами значений, принятых для рабочих особей разных пород пчел [Кривцов, 2011; Полищук и др., 1990; Cauia, et al., 2008].

Выделение ДНК проводили стандартным методом. Для амплификации локуса *COI-COII* мтДНК использованы следующие праймеры: 3' CACATTTAGAAATTCATTA, 5' АТАААТАТГААТСАТГТГГА [Никоноров и др., 1998]; продукты амплификации фракционировали в 1.5 % агарозном геле, результаты документировали с использованием системы Gel-Doc XR+.

При изучении микросателлитных локусов ПЦР проводили согласно описанной методике с использованием специфических праймеров [Solignac et al., 2003]; генотипирование выполняли на базе Центра коллективного пользования ФГБНУ «НИИ медицинской генетики» (г. Томск) на генетическом анализаторе ABI Prism 3730 с применением стандартов длины молекул ДНК GeneScan500-ROX в условиях, рекомендуемых производителем. Анализ размера фрагментов осуществляли с помощью программного обеспечения GeneMapper Software. Различия по комплексу экстерьерных признаков между группами особей с разными вариантами локуса мтДНК (как и пчелиными семьями) оценивались с помощью непараметрического дискриминантного анализа (DFA). Наличие различий между пчелиными семьями по отдельным признакам устанавливалось с использованием *post hoc* теста множественных сравнений Тьюки (Tukey's HSD test). Для оценки различий между семьями по экстерьерным признакам использовалась дистанция Махаланобиса (MD^2). Генетические дистанции между популяциями рассчитывали по методу Nei (1972).

Подготовительная обработка данных проводилась в приложении Microsoft Office Excel 2003, статистические расчеты выполнены в приложении STATISTICA 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация породной принадлежности медоносных пчел

Первоочередной задачей при изучении генетического разнообразия медоносных пчел является определение их породного состава - это важно учитывать, как при выполнении геногеографических исследований, оценки селективной и адаптивной значимости генетических маркеров, так и при планировании и проведении работ, имеющих прикладной характер.

На смену используемых на протяжении

длительного времени для идентификации породной принадлежности медоносных пчел экстерьерных признаков пришли молекулярно-генетические методы, и, в частности, анализ межгенного региона *COI-COII* (последовательность между генами цитохромоксидазы I и цитохромоксидазы II) мтДНК. Локус *COI-COII* состоит из двух нуклеотидных последовательностей - P (может быть представлен несколькими вариантами - P0, P1 и P2) и Q [Cornuet et al., 1991]. Эволюционные линии медоносной пчелы различаются по числу копий последовательностей P (1 или 0) и Q (от 1 до 5) [Cornuet et al., 1991; Rortais et al., 2011]. Например, восточно-европейская линия С обладает самой короткой последовательностью этого межгенного региона (имеет 1 копию Q элемента, P последовательность отсутствует); подвиды пчел линий М, А, Z и Y характеризуются более длинной последовательностью, так как наряду с P элементом содержат от 1 до 5 элементов Q (т. е. имеют варианты PQ, PQQ, PQQQ, PQQQQ и PQQQQQ). На основании анализа структуры локуса *COI-COII* мтДНК были внесены некоторые корректировки в эволюционную классификацию многочисленных подвидов и экотипов медоносной пчелы [Franck et al., 2000; Garnery et al., 1992; Meixner et al., 2013]. Однако не следует забывать, что специфичность пород медоносной пчелы по структуре локуса *COI-COII* мтДНК позволяет установить происхождение медоносной пчелы по линии матки, а в условиях массовой гибридизации, наблюдаемой во многих регионах мира (в том числе и России), использование для определения породной принадлежности только данных по структуре локуса *COI-COII* мтДНК не всегда может дать корректную оценку породного состава медоносных пчел.

Для пород медоносной пчелы южного происхождения (серая горная кавказская, карпатская), культивируемых в России, установлена структура локуса, представленная только последовательностью Q, а у среднерусской породы регистрируются несколько вариантов локуса - PQQ, PQQQ, PQQQQ. В то же время, при исследовании медоносных пчел одной из гибридных пасек Томского района [Островерхова и др., 2013] было зарегистрировано несоответствие между породной принадлежностью, определяемой по морфометрическим данным, и вариантом локуса *COI-COII* мтДНК (табл. 1): только у 5.6 % особей, имеющих PQQ-аллель, одновременно зарегистрированы все три морфометрических признака, характерные для среднерусской породы медоносной пчелы, и не обнаружено ни одной особи, имеющей полное соответствие южной породе, как по генетическому маркеру, так и по морфометрическим показателям. В условиях массовой гибридизации медоносных пчел можно ожидать широкого распространения подобного рода несоответствий отнесения к породе на основании экстерьерных признаков и данных изменчивости локуса *COI-COII* мтДНК.

Соотношение морфометрических показателей и генетических данных пчел [Островерхова и др., 2013]

Пчелы		Аллель PQQ		Аллель Q	
Количество (%)		24 (44.44)		30 (55.56)	
признаки		среднерусская	южная	среднерусская	южная
	3 признака $x^1 / x^2 / x^3$	3 (5.6)	4 (7.4)	4 (7.4)	0
	2 признака x^1 / x^2	10 (18.5)	7 (13)	18 (33.3)	8 (14.8)
	x^1 / x^3	1 (1.9)	1 (1.9)	1 (1.9)	6 (11.1)
	x^2 / x^3	2 (3.7)	6 (11.1)	0	2 (3.7)
1 признак x^2 / x^3	7 (13)	0	17 (31.5)	0	
	$x^1 / x^2 / x^3$	7 (13)	10 (18.5)	8 (14.8)	18 (33.3)

Примечание: x^1 , x^2 , x^3 - показатели кубитального индекса, гантельного индекса и дискоидального смещения, соответственно

Подтверждением данного положения являются результаты оценки различий между пчелиными семьями с разными вариантами локуса мтДНК по кубитальному и гантельному индексам, полученные на основании непараметрического дискриминантного анализа 11 пчелиных семей, отобранных с пасек Томской области (2 пчелиной семьи с вариантом PQQ локуса COI-COII мтДНК с пасеки северного района области; 2 пчелиной семьи с вариантом PQQQ, 1 пчелиная семья с вариантом PQQ и 3 - с вариантом Q с пасек южных районов области), Красноярского (1 пчелиная семья с вариантом PQQ) и Алтайского краев (1 пчелиная семья с вариантом PQQ и 1 пчелиная семья с вариантом PQQQ) (рис. 2). В результате проведенного анализа выделено семь классов,

из которых четыре условно отнесены к среднерусской породе и три - к породам южного происхождения (рис. 2). В первой группе были выделены следующие классы: «среднерусская енисейская» (1 семья), «среднерусская» (5 семей); «среднерусская гибрид 1» (1 семья); «среднерусская гибрид 2» (1 семья). Классы второй группы (по одной семье в каждой): «карпатская чистая»; «карпатская гибрид» и «южная гибрид». Положение указанных групп пчелиных семей в пространстве дискриминантных канонических функций подтверждает наличие двух обособленных групп, соответствующих карпатской и среднерусской породам; гибридные формы разного происхождения объединяются в близкие друг к другу группы (рис. 2, табл. 2).

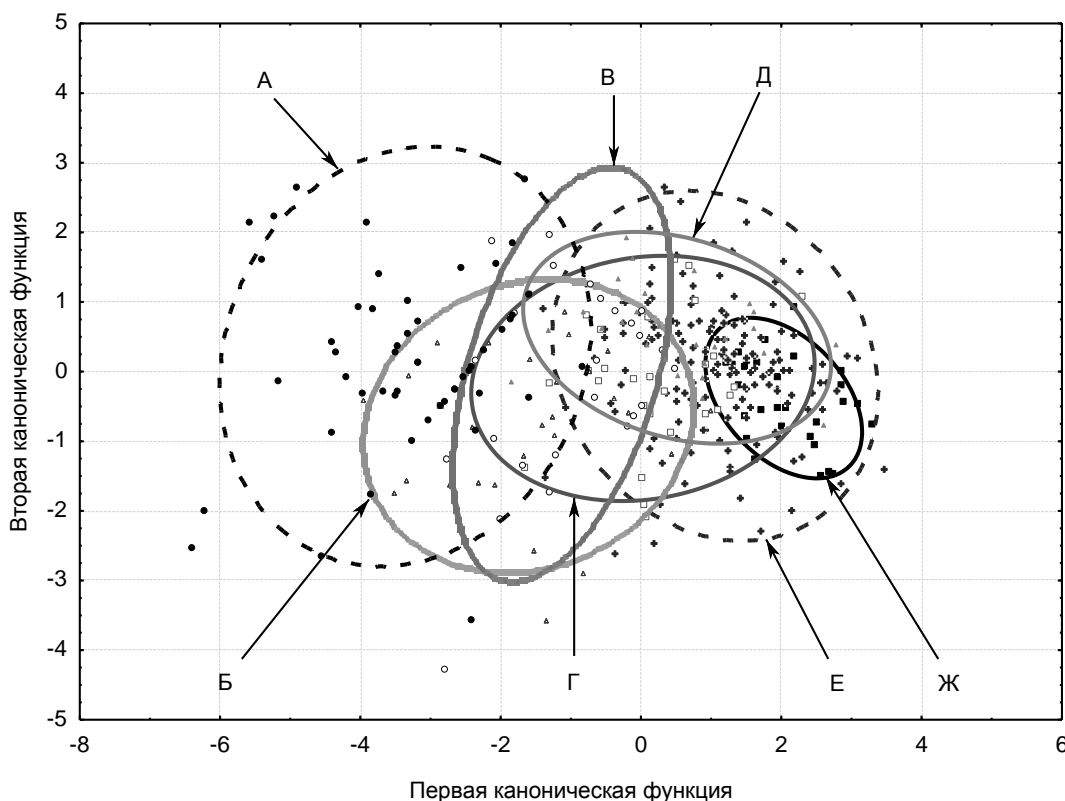


Рисунок 2. Положение групп пчелиных семей, различающихся по вариантам локуса COI-COII мтДНК в пространстве двух дискриминантных канонических функций, оцененных на основании морфометрических показателей (кубитального и гантельного индексов): 95%-е доверительные эллипсоиды. Обозначение групп пчелиных семей: А - «карпатская чистая», Б - «карпатская гибрид», В - «среднерусская гибрид 1», Г - «среднерусская гибрид 2», Д - «южная гибрид», Е - «среднерусская», Ж - «среднерусская енисейская».

В целом, около трети исследованных пчелиных семей демонстрируют дисбаланс между генетическими и морфометрическими параметрами, причем в одном случае - полное их несоответствие (табл. 2). Семья 4 (вариант PQQQ мтДНК) по морфометрическим признакам близка к семье 5 (вариант Q мтДНК), то есть к гибриду, сформировавшемуся на основе карпатской породы. Семья 3 (вариант Q мтДНК) по всем статистическим критериям и тестам относится к «среднерусской». Выявлено, что группа пчелиных семей «среднерусские» статистически значимо отделяется от пчелиной семьи «карпатская чистая», MD^2 более 10.0 (рис. 2, табл. 2). Значение квадрата дистанции Махаланобиса максимально между пчелиными семьями «чистая карпатская» и «енисейская среднерусская». Последняя по совокупности признаков близка к «среднерусской» группе; отдаленность этой семьи от «гибридных» подтверждает ее принадлежность к одной из наиболее чистых линий *Apis m. mellifera*. Очень невелико расстояние между «среднерусской гибридной 1» и

«карпатской гибридной» группами (т.е. семьями 4 и 5), и особенно, между «южной гибридной» (семья 3) и «среднерусской».

Присутствие на территории, где изучается генетическое разнообразие гибридных форм создает, с одной стороны, неблагоприятный фон для сохранения генофондов среднерусской и карпатской пород, с другой - затрудняет поиск адаптивно-значимых и хозяйственно-ценных признаков (возможно искажение результатов и их интерпретации). Следовательно, это следует учитывать при проведении подобного рода исследований. Приведенные выше данные также указывают на то, что для определения породной принадлежности только экстерьерных или только генетических признаков может быть недостаточно, и лишь при одновременном рассмотрении морфометрических параметров и данных по изменчивости локуса *COI-COII* мтДНК возможно объективно оценить породную принадлежность и случаи гибридизации.

Таблица 2

Значения квадратов дистанций Махаланобиса (MD^2) и результаты post hoc теста Тьюки различий между пчелиными семьями по значениям кубитального (к) и гантельного (г) индексов

Пчелиная семья, вариант мтДНК	Пчелиная семья										
	Томская область, Заречный	Томская область, Семилужки	Томская область, Курлек	Томская область, Курлек	Томская область, Синий Утес	Томская область, Дубровка	Томская область, Могочино	Томская область, Могочино	Алтайский край	Алтайский край	Красноярский край
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 PQQQ		21.79	0.82	5.94	9.21		1.62		0.51		0.74
2 Q*	к г		15.20	5.03	4.05	18.49	11.65	20.92	20.63	16.91	29.66
3 Q	г	к г		3.04	6.25		0.60	0.99	0.44	0.45	3.10
4 PQQQ	к г	к г	к г		0.80	4.34	1.37	5.43	5.80	3.50	10.25
5 Q	к г	г	к г	к		7.52	3.22	8.17	9.98	5.96	13.62
6 PQQ		к г		к г	к г		0.90				1.59
7 PQQ	к г	к г		г	к г	к		1.35	1.93	0.49	4.13
8 PQQ*		к г	г	к г	к г		г		0.95		0.76
9 PQQ*		к г		к г	к г		к			0.93	2.05
10 PQQQ		к г		к г	к г				к		1.79
11 PQQ*	г	к г	г	к г	к г	г	к г	г	г	г	

Примечание: Над диагональю приведены значения квадратов дистанций Махаланобиса (MD^2) между пчелиными семьями (дискриминантный анализ); полужирным выделены значения >10.0 , курсивом - значения ≤ 1.0 ; значения с $p \geq 0.050$ в таблице не представлены. Под диагональю буквами обозначены статистически значимые ($p < 0.050$) различия между соответствующими семьями по к - кубитальному и г - гантельному индексам; серым цветом выделены ячейки сравнения пород, имеющих южное происхождение по материнской линии. * - отмечены семьи, наиболее соответствующие по экстерьерным признакам соответствующим породам.

Генетическое разнообразие пчелиных семей по микросателлитным локусам.

В условиях повсеместной гибридизации пчел необходимо также совершенствовать генетические методы контроля чистоты пчелиных семей. Исследования в этом направлении проводятся и зарубежными, и отечественными исследователями [Ильясов и др., 2015; Островерхова и др., 2015(а, б); Muñoz et al., 2015]. Так, на основании широкомасштабных исследований, выполненных на территории Восточной Европы (поиск информативных маркеров был проведен из числа более 1000 SNP с применением 5 различных аналитических методов), было разработано 5 панелей, состоящих из 48, 96, 144, 192 и 284 маркеров, информативных для определения предкового происхождения особей, которые авторы предлагают использовать для идентификации и оценки примеси С-линий (в частности, *Apis m. ligustica* и *Apis m. carnica*) в М-линию *Apis m. mellifera* [Muñoz et al., 2015]. Отечественными исследователями такие работы только начаты, но уже полученные на данном этапе результаты свидетельствуют о том, что популяции медоносной пчелы, обитающие на территории России, характеризуются широкой генетической изменчивостью, и вряд ли представляется возможным разработать единую для всей территории России панель маркеров, дифференцирующих различные породы пчел.

Анализ изменчивости ряда микросателлитных локусов на уровне пчелиных семей, обитающих в Сибирском регионе, показал, что по некоторым локусам наблюдается специфичный характер распределения генотипов и аллелей в пчелиных семьях, различающихся по происхождению (табл. 3). Так, согласно полученным результатам, можно заключить, что среди

проанализированных микросателлитных локусов для оценки дифференциации различных пород представляют интерес локусы *A008*, *A043*, *Ar049*, *A113* и *A024*.

Обращает на себя внимание то, что по локусам, для которых установлены различия по частотам аллелей между пчелиными семьями среднерусской и южной пород, гибриды на основе обеих этих пород по спектру зарегистрированных аллелей и их частотам более близки к среднерусской породе (табл. 3). Ранее при сравнении генетической структуры по микросателлитным локусам выборки пчел, различающихся по происхождению (среднерусская, «южная» породы и гибриды на основе этих пород), была отмечена выраженная дифференциация пчел карпатской породы от среднерусской (генетические дистанции - 0.7208), тогда как гибриды на основе как среднерусской, так и карпатской пород были более близки к среднерусской породе (дистанции 0.0209 и 0.0584, соответственно), чем к карпатской породе (0.8200 и 0.5712, соответственно; между гибридами - 0.0282) [Киреева и др., 2015]. Также было установлено, что на гибридных пасеках процесс «вытеснения генов» у пчел среднерусской породы менее масштабный, поскольку среди особей, обладающих характерным для данной породы локусом *COI-COII*, зарегистрирован меньший процент пчел с морфометрическими признаками, характерными для пород южного происхождения, по сравнению с аналогичными данными, показанными для пчел с локусом *Q* [Островерхова и др., 2013], что свидетельствует о том, что при гибридизации пчел в Сибирском регионе происходит быстрое «вытеснение» аллелей карпатской породы аллелями среднерусской породы.

Таблица 3

Характеристика аллельного спектра микросателлитных локусов у медоносных пчел разного происхождения, обитающих на территории Сибирского региона

Аллель	Томская область						Красноярский край					Томская область			
	<i>A. m. mellifera L.</i>						<i>A. m. mellifera L.</i>					<i>A. m. carpatica</i>		Гибриды на основе породы	
														среднерусской южной	
	с. Могочино		п. Заречный		с. Семилужки		с. Остяцкое		с. Колмогорово			д. Степановка	д. Цветковка	п. Курлек	
	Семья, №														
	I		II		III		I	II	III	I	II	I	II	I	II
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Локус A007															
103	0.222	0.056	0.152	0.033	0.133	0.025	0.083	0.259	0.292	0.071				НД.	
	0.2	-	0.2	-	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1					
107	0.519	0.889	0.522	0.950	0.667	0.5	0.917	0.741	0.625	0.910	0.121	0.517		0.875	
	0.5	1.000	0.5	1.0	0.7	0.4	0.9	0.8	0.8	0.9	0.1	0.6		0.7	
111				0.17		0.075					0.741	0.367		0.125	
				-		0.2					0.7	0.4		0.3	
113	0.259	0.056	0.326		0.200	0.400			0.083	0.018	0.121	0.117			
	0.3	-	0.3		0.2	0.3			0.1	-	-	-			
117											0.017				

											0.2			
Δ		-2		-2							-1	-1	-1	
Лocus A008														
152						0.038							0.040	
						-							0.1	
162	0.889	0.983	1.000	0.714	1.000	0.865	1.000	1.000	1.000	1.000	0.063		0.920	0.833
	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0	0.6	1.0	1.0	1.0	1.0	0.1		0.9	0.6
166	0.019													
	-													
168	0.093													
	0.1													
170				0.018		0.038						0.188		
				-		0.2						0.4		
172	0.017												0.040	0.167
	-												-	0.4
174				0.268							0.609	0.581		
				0.1							0.4	0.5		
176											0.047	0.419		
											-	0.5		
178											0.047			
											-			
180											0.047			
											0.1			
Δ	-1	-1		-1		-1					-2		-1	
Лocus Ap049														
117								0.019						
								-						
121								0.019					0.048	
								-					-	
127	0.733	0.917	0.862	0.879	0.617	0.229	0.500	0.962	0.880	0.907			0.880	0.913
	0.8	0.9	0.9	1.0	0.6	0.4	0.6	1.0	0.9	0.8			0.8	0.9
130	0.266		0.052	0.121	0.383	0.771	0.296	0.039	0.120	0.093	0.080	0.290	0.060	
	0.2		0.1	-	0.4	0.6	0.3	-	0.1	0.2	-	0.3	0.2	
139		0.083	0.086					0.056			0.740	0.661	0.060	0.087
		0.1	-					-			0.9	0.7	-	0.1
152								0.111			0.180			
								0.1			0.1			
Δ			-1	-1			-3	-1			-1	-1	-1	
Лocus AC117														
176	0.166	0.074	0.052	0.204	0.300		0.100	0.263	0.093		0.032			
	0.2	-	0.1	0.2	0.2		0.2	0.3	0.1		-			
180	0.277				0.033	0.143				0.267	0.048		0.140	0.042
	0.5				-	0.1				0.4	-		0.3	-
184	0.555	0.926	0.948	0.796	0.667	0.857	0.900	0.737	0.907	0.733	0.919	1.000	0.860	0.958
	0.3	1.0	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8	0.7	0.9	0.6	1.0	1.0	0.7	1.0
Δ		-1			-1						-2			-1
Лocus A113														
208											0.063			
											0.1			
210				0.054						0.086				0.056
				-						-				-
212	0.138	0.150	0.148	0.607							0.938	1.000	0.350	0.333
	-	0.2	0.3	0.7							0.9	1.0	0.2	0.3
214				0.036										
				-										
218	0.810	0.817	0.667	0.250	0.397	0.340	0.933	0.950	0.845	0.867			0.650	0.611
	1.0	0.8	0.7	0.2	0.5	0.3	0.9	1.0	0.7	1.0			0.8	0.7
220	0.017	0.33	0.185	0.054	0.500	0.320	0.067	0.050	0.069	0.133				
	-	-	-	0.1	0.5	0.4	0.1	-	0.3	-				
226	0.035					0.240								

	-					0.2								
228					0.103	0.100								
					-	0.1								
Δ	-3	-1	-1	-1	-1				-1	-1	-1			-1
Локус A024														
94	0.917	0.817	0.883	0.463	0.603	0.600	0.396	0.240		0.160		0.050	Н.Д.	0.111
	0.7	0.1	1.0	0.6	0.6	0.7	0.5	0.3		0.2		0.1		0.4
96								0.320	0.714	0.500				0.500
								0.3	0.5	0.8				0.3
98								0.500						
								0.5						
100						0.120	0.104							
						-	-							
102	0.083	0.150	0.117	0.537	0.397	0.240		0.100			0.354	0.483		0.278
	0.3	0.8	-	0.4	0.4	0.3		0.1			0.2	0.7		0.2
104		0.033				0.040		0.340	0.214	0.340	0.646	0.467		0.111
		0.1				-		0.3	0.4	-	0.8	0.2		0.1
106									0.071					
									0.1					
Δ			-1			-2	-1			-1				
Локус A043														
126	0.673	0.828	1.000	0.900	1.000	0.773	1.000	1.000	1.000	1.000	0.077	0.056	Н.Д.	0.269
	0.8	0.4	1.0	0.7	1.0	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	-	0.2		0.6
138	0.192	0.172		0.067		0.227					0.462	0.204		0.135
	0.2	0.6		0.3		0.1					0.5	-		0.1
140	0.134										0.288	0.740		0.038
	-										0.4	0.8		0.3
142				0.033										0.057
				-										-
Δ	-1			-1							-1	-1		-1

Примечание: Жирным шрифтом приведены реальные данные, полученные при исследовании выборок численностью не менее 20 особей, простым шрифтом - данные по «смоделированным» выборкам численностью 5 особей. Δ - уменьшение числа выявленных аллелей при анализе «смоделированных» выборок и реально полученных данных. Н.Д. - нет данных.

В качестве причин такой ситуации могут выступать различная представленность в ареале обитания пчел трутней разных пород, ассортативность скрещивания, эффекты отбора на любом из этапов жизнедеятельности пчелиной семьи - и каждая из них требует дальнейшего изучения. Но уже сейчас можно заключить, что на территориях, где обитают пчелы разных пород, определение их принадлежности к той или иной породе только по данным ядерного генома может быть бесперспективным. Это наблюдение также необходимо принимать во внимание при разработке диагностикумов породной принадлежности.

Сопоставление данных по изменчивости ряда микросателлитных локусов, охарактеризованных для пчелиных семей среднерусской породы, обитающих в разных регионах Сибири и Урала, а также двух «ожных» пород, различающихся как по происхождению, так и по географии локализации (табл. 4), позволит сделать некоторые корректировки в отношении информативности локусов для включения их в диагностикумы определения пород.

По локусу A008 регистрируются отличия по спектру наиболее распространенных аллелей как между пчелиными семьями среднерусской породы, обитающих в различных географических регионах (Республика Башкортостан - Сибирский регион (Томская область, Красноярский край)), так и между двумя породами южного происхождения (табл. 4). Причем, в пчелиных семьях среднерусской породы и Томской области, и Красноярского края с высокой частотой регистрируется более длинный аллель (162 п.н.), тогда как в башкирской популяции преобладает аллель размером 154 п.н. Интересно, что в восточно-европейских популяциях *A. m. mellifera* также преобладают более короткие аллели [Garner et al., 1998; Franck et al., 1998], что позволяет предположить возможное участие этого локуса в определении различных экотипов темной лесной пчелы.

По локусу A113 нет четких различий по длине наиболее часто регистрируемых аллелей, как между пчелиными семьями среднерусской породы, так и между пчелиными семьями, относящимися к разным породам, т.е. по-видимому, данный локус не

может рассматриваться как информативный для определения породной принадлежности.

Что касается локусов *A024*, *Ap049* и *A043*, то они в дальнейшем заслуживают более пристального изучения как кандидаты на включение в диагностические панели, дифференцирующие породы. Так, в целом по данным локусам большинство обследованных пчелиных семей среднерусской породы, вне зависимости от их ареала обитания, характеризуется более короткой длиной аллелей. В

то же время, отмечена регистрация единичных семей в Республике Башкортостан с вариантами, характерными для пород южного происхождения по локусам *A043* и *A024*, а также одной семьи с аллелем 102 п.н. локуса *A024*, что может указывать как на следы гибридизации в данных семьях, так и на то, что географическая вариабельность данного локуса в пределах одной и той же породы более выражена. И первое, и второе предположения требуют дальнейшего изучения.

Таблица 4

Сравнительный анализ частоты регистрации наиболее распространенных аллелей* по микросателлитным локусам у медоносных пчел, различающихся происхождением по материнской линии и ареалом обитания

	Географический регион	Вариант локуса <i>COI-COII</i> мтДНК (порода)	Наиболее распространенный аллель	Число семей (выборка) с преобладанием данного аллеля	Частота регистрации аллеля
Локус <i>A008</i>	Томская область	PQQ/PQQQ	162	6	0.71-1.00
	Красноярский край	PQQ	162	4	1.00
	Республика Башкортостан ¹	PQQ	154	12	0.63-1.00
	Томская область ²	Q	174	2	0.58-0.61
	Сочинский район ³	Q	158	3	0.88-1.00
Локус <i>A113</i>	Томская область	PQQ/PQQQ	218 212 220	3 1 1	0.67-0.82 0.61 0.50
	Красноярский край	PQQ	218	4	0.85-0.95
	Республика Башкортостан ¹	PQQ	218 220	12 1	0.50-1.00 0.50
	Томская область ²	Q	212	2	0.94-1.00
	Сочинский район ³	Q	222	1	0.50
Локус <i>A024</i>	Томская область	PQQ/PQQQ	94 102	5 1	0.60-0.92 0.54
	Красноярский край	PQQ	98 96	1 2	0.50 0.50-0.71
	Республика Башкортостан ¹	PQQ	98 106	6 2	0.50-1.00 0.50
	Томская область ²	Q	104	1	0.65
	Сочинский район ³	Q	106	3	0.88-1.00
Локус <i>A043</i>	Томская область	PQQ/PQQQ	126	6	0.67-1.00
	Красноярский край	PQQ	126	4	1.00
	Республика Башкортостан ¹	PQQ	128 142	12 1	0.5-1.00 0.50
	Томская область ²	Q	140	1	0.74
	Сочинский район ³	Q	134	3	1.00
Локус <i>AP049</i>	Томская область	PQQ/PQQQ	127 130	5 1	0.62-0.92 0.77
	Красноярский край	PQQ	127	4	0.50-0.96
	Республика Башкортостан ¹	PQQ	129 130	12 1	0.50-1.00 1.00
	Томская область ²	Q	139	2	0.66-0.74
	Сочинский район ³	Q	139	3	1.00

Примечание: * - приведены данные по аллелям, частота которых = или >0.5. ¹ - данные по Республике Башкортостан из работы [Ильясов и др., 2015]; ² - данные для пчелиных семей карпатской породы, завезенных на территорию Томской области из питомника карпатской породы (д. Мукачево, Украина); ³ - данные о горной кавказской пчеле, обитающей в Сочинском районе из работы [Ильясов и др., 2015].

Требования к формированию выборок при изучении генетического разнообразия медоносных пчел по полиморфным вариантам митохондриального и ядерного геномов

В отличие от предыдущих этапов изучения генетического разнообразия различных видов, современный прогресс в области молекулярно-генетических технологий, доступных для привлечения к изучению генетического разнообразия популяций, ставит перед исследователями выбор, связанный с ограниченностью трудовых ресурсов, временных затрат и финансирования: исследовать большие массивы выборок (пчелиных семей, популяций, пород) по небольшому числу маркеров или провести изучение большого числа генетических маркеров (вплоть до полногеномного анализа) на небольшом числе объектов. Любой из этих подходов имеет свои преимущества и недостатки, и результаты каждого из них в дальнейшем потребуют последующей верификации либо на других популяциях, либо с привлечением других маркеров. В то же время, при изучении генетического разнообразия, в том числе и пород, и различных популяций медоносной пчелы, важно учитывать некоторые моменты.

Прежде всего, это касается размеров выборок, необходимых для корректного описания генетического разнообразия, используемого в дальнейшем как для научных целей, так и, особенно, для разработки прикладных технологий (протоколов, диагностикумов) и т.д.

Изучение полиморфизма мтДНК.

С учетом особенностей организации пчелиных семей и наследования митохондриальной ДНК по материнской линии считается, что для изучения полиморфизма мтДНК можно исследовать одну особь от семьи [Evans et al., 2013], при условии однозначного исключения возможной миграции между колониями (например, исследовать личинки, нелетных пчел). В реальных ситуациях, как правило, при изучении генетического разнообразия используют рабочих пчел, в результате может быть допущена ошибка в определении генетического варианта пчелиной семьи.

Так, при изучении вариантов локуса *COI*-

COII мтДНК в пчелиных семьях, обитающих на пасеках Томской области (анализировалось от 2 до 5 особей на семью), была установлена значительная доля семей с двумя и более вариантами данного локуса [Островерхова и др., 2015(а)]: в общем по области такая ситуация регистрировалась в каждой 10-ой пчелосемье, а в южных районах, где отрасль пчеловодства более развита, в каждой 5-ой семье регистрировалось несколько вариантов линий мтДНК, причем в более 50 % таких семей были выявлены варианты, характерные как для среднерусской, так и для южной пород (табл. 5). При анализе изменчивости аутосомных микросателлитных локусов в пчелиных семьях Томской области также было показано наличие особей, не соответствующих изучаемой пчелосемье согласно выявленным частотам генотипов: при анализе только трех локусов в некоторых семьях доля таких особей достигала 8 % [Островерхова и др., 2015(б), 2016]. В данном случае не так важна причина такой ситуации (объединение пчелиных семей, блуждание и «впращивание» рабочих пчел) - эти наблюдения свидетельствуют о важности учета возможности таких ситуаций при изучении генетического разнообразия пчелиных семей, пород и популяций медоносной пчелы.

Регистрация в пчелиных семьях «чужих» особей, а также характерное для пчел явление полиандрии ставят и некоторые другие вопросы относительно формирования выборок для изучения генетического разнообразия. В данном случае следует также принимать во внимание изменчивость анализируемых генетических маркеров (спектр и частоты регистрации аллельных вариантов), что особенно актуально при изучении генетического разнообразия медоносных пчел в силу их слабой изученности. Необходимый объем выборки также будет зависеть от уровня полиморфизма изучаемого локуса (например, при частоте аллеля 0.5 число обследованных особей для выявления всех аллелей с 95 %-ной вероятностью должно быть не менее 6, а при минимальной частоте аллеля 0.1 потребуются уже не менее 51 особи) [Айала, Кайгер, 2012; Животовский, 1991].

Таблица 5

Регистрируемые в пчелиных семьях варианты локуса *COI-COII* мтДНК

Варианты локуса <i>COI-COII</i> мтДНК	Районы Томской области				Всего	
	Северные		Южные			
	п	%	п	%	п	%
PQQ	121	67.6	53	38.7	174	55.1
PQQQ	-	-	19	13.9	19	6.0
Q	50	27.9	39	28.5	89	28.2
PQQ и PQQQ	-	-	9	6.6	9	2.8
PQQ и Q	8	4.5	14	10.2	22	7.0
PQQQ и Q	-	-	2	1.5	2	0.6
PQQ, PQQQ и Q	-	-	1	0.7	1	0.3
Всего семей с несколькими вариантами мтДНК	8	4.5	26	19.0	34	10.8
Суммарно	179		137		316	

Примечание: п и % - число и частота пчелиных семей с соответствующим вариантом локуса *COI-COII* мтДНК

Мы «смоделировали» ситуацию, когда для анализа генетического разнообразия были «сформированы» выборки по 5 особей от семьи (5 первых записей из имеющихся в базе данных по каждой семье), провели расчет частот аллелей и сопоставили полученные результаты с реальными данными (табл. 3). Оказалось, что для 48 % случаев происходила «потеря» аллельных вариантов (снижение их числа от 1 до 3; при расчете не учитывались локусы и семьи, где в реальных экспериментальных исследованиях был выявлен только 1 аллельный вариант). Например, по локусу *A043* для 5 из 7 «информативных» семей было зарегистрировано на 1 аллель меньше. Что касается частоты регистрации, то для почти 25 % анализируемых локусов в семьях менялась частота аллелей в 1.5 и более раза, а для аллелей, регистрируемых с низкой частотой, в ряде случаев - на порядок. Иногда частоты аллелей менялись на диаметрально противоположные, как это, например, наблюдалось для семьи П с. Могочино по локусу *A024* (табл. 3).

Приведенные выше данные позволяют заключить, что при описании генетической структуры, как пчелиных семей, так и популяций, и пород (а также при определении чистопородности и в дальнейшем для целей мониторинга) по вариантам мтДНК необходимо исследовать несколько особей (3-5), а при изучении аутосомных локусов (с учетом уровня их полиморфизма) - не менее нескольких десятков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение генетического разнообразия медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.), как экологически и экономически значимого вида - одно из важнейших направлений исследований в мире [Причард, 2008; Кривцов, 2008, 2011], имеющее как фундаментальное, так и прикладное значение. Накопленные к настоящему времени немногочисленные данные по изучению генетического разнообразия медоносной пчелы позволяют обозначить не только приоритетные задачи таких исследований, но и некоторые сложности, возникающие при изучении структуры генофондов данного вида.

При определении породного состава пчел (особенно в регионах с разведением различных пород, где потенциально возможно распространение гибридизации) необходимо учитывать, как данные по варибельности экстерьерных признаков (гантельный и кубитальный индексы, дискоидальное смещение), так и сведения о структуре локуса *COI-COII* мтДНК. С осторожностью на данном этапе следует относиться к привлечению к определению породной принадлежности аутосомных локусов, так как гибриды с неместными породами в ряде случаев по генетическим особенностям приближаются к аборигенным популяциям (по крайней мере, не целесообразно использовать только аутосомные локусы для данной цели, даже если они рассматриваются как породо-определяющие).

Основываясь на положениях классической популяционной генетики, и принимая во внимание особенности биологии размножения пчел, а также результаты изучения пчелиных семей (пород, популяций), следует заключить, что для корректного описания генетического разнообразия медоносных пчел на разных уровнях их структурной организации необходимо при привлечении к анализу аутосомных локусов формировать выборки не менее нескольких десятков особей (в дальнейшем - с учетом уровня полиморфизма по данным ранее выполненных исследований). При определении генетических вариантов митохондриального генома, в том числе и локуса *COI-COII*, обследование одной особи в семье может привести к некорректному заключению (желательно исследовать 3-5 особей).

Анализ варибельности микросателлитных локусов в пчелиных семьях различного происхождения, обитающих в Сибирском регионе, позволил отнести к категории информативных для разработки диагностикомов локусы *A008*, *A043*, *Ap049*, *A113* и *A024*. Однако, привлечение для сравнения данных по пчелиным семьям среднерусской породы иной географической локализации, а также других пород южного происхождения (серая горная кавказская) [Ильясов и др., 2015], позволило заключить, что лишь локусы *A024*, *Ap049* и *A043* могут быть объектом более пристального исследования с точки зрения их информативности для разработки диагностикомов. Следует, однако, отметить, что приведенные в цитируемой работе данные основываются на изучении небольшого числа особей (4 особи). По локусу *A008* выявлены различия по наиболее распространенным аллелям между пчелиными семьями, обитающими в Сибирском регионе и в Республике Башкортостан. Не исключено, что данный локус маркирует определенные экотипы пчелиных семей.

Только накопление данных о варибельности микросателлитных локусов у представителей разных пород медоносных пчел, обитающих в различных географических (экологических) регионах, позволит в дальнейшем выделить общепородные генетические черты и генетические маркеры, ответственные за формирование определенных экотипов породы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Данное научное исследование (№ проекта 8.1.66.2015) выполнено при поддержке Программы «Научный фонд ТГУ им. Д.И. Менделеева» в 2015 г. и гранта РФФИ 13-04-98116-р-сибирь-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Книга по Требованию, 2012. 332 с.
2. Бородачев А.В., Бурмистров А.Н., Касьянов А.И. и др. Методы проведения научно-исследовательских работ в пчеловодстве.

- Рыбное: НИИП, 2002. 154 с.
3. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 271 с.
 4. Зиновьева Н.А., Кривцов Н.И., Форнара М.С. и др. Микросателлиты как инструмент для оценки динамики аллелофонда при создании приокского типа среднерусской породы медоносной пчелы *Apis mellifera* L. // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 6. С. 75-79.
 5. Ильясов Р.А., Косарев М.Н., Поскряков А.В., Шарипов А.Я., Николенко А.Г. Новый подход к оценке генетического потенциала семей темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* на основе полиморфизма микросателлитных локусов // Биомика. 2015. Т. 7. № 2. С. 138-152.
 6. Киреева Т.Н., Островерхова Н.В., Конусова О.Л., Кучер А.Н., Шарахов И.В. Морфометрический и молекулярно-генетический анализ медоносных пчел (*Apis mellifera* L.) на пасеках Томской области // Сборник мат-лов IV Международной конференции «Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных», г. Томск, 26-28 октября, 2015. С. 258-264.
 7. Кичигин Е.К. Коллапс пчелиных семей: возможная причина // Пчеловодство. 2009. № 6. С. 22-25.
 8. Конусова О.Л., Погорелов Ю.Л., Островерхова Н.В. и др. Биологическая и хозяйственная оценка семей медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) в некоторых районах Томской области // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2010. № 1 (9). С. 29-41.
 9. Кривцов Н.И. Генофонд пчел *Apis mellifera mellifera* в России // Материалы Международной конференции "Пчеловодство - XXI век. Темная пчела (*Apis mellifera* L.) в России" / Международная промышленная академия, 19-22 мая 2008 г. М.: Пищепромиздат, 2008. С. 22-27.
 10. Кривцов Н.И. Порода для северных областей России // Пути развития пчеловодства в России через успешный опыт регионов России, стран СНГ и дальнего зарубежья. Материалы международной научно-практической конференции. г. Ярославль, 6-11 октября, 2011. С. 30-32.
 11. Кривцов Н.И., Зиновьева Н.А., Бородачев А.В. и др. Дифференциация основных пород пчел с использованием микросателлитов // Вестник Рязанского государственного аграрного университета. ун-та им. П.П. Костычева. 2011. № 4 (12). С. 23-27.
 12. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В. и др. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелиных семей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала // Генетика. 1998. Т. 34. № 11. С. 1574-1577.
 13. Островерхова Н.В., Конусова О.Л., Кучер А.Н. и др. Популяционно-генетическая структура медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) в районе д. Леботер Чаинского района Томской области // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 1 (21). С. 161-172.
 14. Островерхова Н.В., Конусова О.Л., Кучер А.Н. и др. Генетическое разнообразие локуса *COI-COII* мтДНК медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в Томской области // Генетика. 2015(a). № 1. С. 89-100.
 15. Островерхова Н.В., Конусова О.Л., Кучер А.Н. и др. Характеристика генетического разнообразия медоносных пчел (*Apis mellifera* L.) Томской популяции по комплексу ДНК-маркеров // Чтения памяти А.И. Куренцова. 2015(б). Вып. XXVI. С. 227-240.
 16. Островерхова Н.В., Конусова О.Л., Кучер А.Н., Киреева Т.Н. Исследование полиандрии у медоносной пчелы (*Apis mellifera*) с использованием микросателлитных локусов // Зоологический журнал. 2016. Т. 95. № 3.
 17. Полищук В.П., Пилипенко В.П. Пчеловодство. Справочное пособие. Киев: Выща школа, 1990. 312 с.
 18. Причард Д. Исследования видовой структуры *Apis mellifera* на основе ДНК-маркеров // Пчеловодство. 2008. № 9. С. 58-60.
 19. Baitala T.V., Faquinello P., Toledo V.A.A. et al. Potential use of major royal jelly proteins (MRJPs) as molecular markers for royal jelly production in Africanized honeybee colonies // Apidologie. 2010. V. 41. P. 160-168.
 20. Cauia E., Usurelu D., Magdalena L.M. et al. Preliminary researches regarding the genetic and morphometric characterization of honeybee (*A. mellifera* L.) from Romania // Zootehnie și Biotehnologii. 2008. V. 41. № 2. P. 2783-286.
 21. Cornuet J.M., Garnery L., Solignac M. Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA // Genetics. 1991. V. 128. № 2. P. 393-403.
 22. Dietemann V., Ellis J.D., Neumann P. Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research // Journal of Apicultural Research. 2013. V. 52(1).
 23. Evans J.D., Chen Y.P., Cornman R.S. et al. Standard methodologies for molecular research in *Apis mellifera* // In The COLOSS BEEBOOK by Eds Dietemann V., Ellis J.D., Neumann P., Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research // Journal of Apicultural Research. 2013. V. 52. № 4. P. 1-53.
 24. Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.M. The origin of west European subspecies of honey bees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data // Evolution. 1998. V. 52. № 4. P. 1119-1134.
 25. Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet

- J.M. Molecular confirmation of a fourth lineage in honey bees from the Near East // *Apidologie*. 2000. № 31. P. 167-180.
26. Fuller Z.L., Niño E.L., Patch H.M. et al. Genome-wide analysis of signatures of selection in populations of African honey bees (*Apis mellifera*) using new web-based tools // *BMC Genomics*. 2015. V. 16. P. 518.
27. Garnery L., Cornuet J.M., Solignac M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis // *Molecular Ecology*. 1992. № 1. P. 145-154.
28. Garnery L., Franck P., Baudry E. et al. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellite loci // *Genetics Selection and Evolution*. 1998. 30 (Suppl. 1). P. 49-74.
29. Gensersch E. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping? // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010. V. 7. P. 87-97.
30. Han F., Wallberg A., Webster M.T. From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? // *Ecology and evolution*. 2012. V. 2. № 8. P. 1949-1957.
31. Honey Bee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honey bee *Apis mellifera* // *Nature*. 2006. V. 443. P. 931-949.
32. Meixner M.D., Pinto M.A., Bouga M. et al. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera* // In *The COLOSS BEEBOOK* by Eds Dietemann V., Ellis J.D., Neumann P., Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research // *Journal of Apicultural Research*. 2013. V. 52. № 4. P. 1-27.
33. Muñoz I., Henriques D., Johnston J.S. et al. Reduced SNP Panels for Genetic Identification and Introgression Analysis in the Dark Honey Bee (*Apis mellifera mellifera*) // *PLOS ONE*. 2015. Apr 13;10(4):e0124365. doi:10.1371/journal.pone.01245 eCollection 2015.
34. Mussen E. Colony Collapse Disorder // *The American Bee Journal*. 2007. V. 7. P. 593-594.
35. Nei M. Genetic distance between populations // *American Natural*. 1972. V. 106. № 949. P. 283-292.
36. Neumann P., Carreck N.L. Honey bee colony losses // *Journal of Apicultural Research*. 2010. V. 49. P. 1-6.
37. Parpinelli R.S., Ruvolo-Takasusuki M.C.C., Toledo V.A.A. MRJP microsatellite markers in Africanized *Apis mellifera* colonies selected on the basis of royal jelly production // *Genetics and molecular research*. 2014. V. 13. № 3. P. 6724-6733.
38. Ratnieks F., Carreck N. Clarity on honey bee collapse? // *Science*. 2010. V. 327. P. 152-153.
39. Rortais A., Arnold G., Alburaki M. et al. Review of the DraI *COI-COII* test for the conservation of the black honey bee (*Apis mellifera mellifera*) // *Conservation Genetics Resources*. 2011. V. 3. P. 383-391.
40. Shafer A.B., Williams G.R., Shutler D. et al. Cophylogeny of *Nosema* (Microsporidia: *Nosematidae*) and bees (Hymenoptera: Apidae) suggests both cospeciation and a host-switch // *J. Parasitol*. 2009. V. 95. P. 198-203.
41. Solignac M., Vautrin D., Loiseau A. et al. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) genome // *Molecular Ecology Notes*. 2003. V. 3. P. 307-311.
42. Tsuruda J.M., Harris J.W., Bourgeois L. et al. High-Resolution Linkage Analyses to Identify Genes That Influence *Varroa* Sensitive Hygiene Behavior in Honey Bees // *PLoS ONE*. 2012. V 7(11): e48276. doi: 10.1371/journal.pone.0048276
43. Van der Zee R., Gómez-Moracho T., Pisa L. et al. Virulence and polar tube protein genetic diversity of *Nosema ceranae* (Microsporidia) field isolates from Northern and Southern Europe in honeybees (*Apis mellifera iberiensis*) // *Environ. Microbiol. Rep*. 2014. V. 6(4). P. 401-413. DOI: 10.1111/1758-2229.12133. Epub 2014 Jan 13.
44. Van Engelsdorp D., Evans J.D., Saegerman C. et al. Colony Collapse Disorder: a descriptive study // *PloS ONE*. 2009. № 4. e6481.

STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF HONEYBEES: SOME PROBLEMS AND SOLUTIONS

Kucher A.N., Ostroverkhova N.V., Konusova O.L., Kireeva T.N., Kurbatsky D.V.

Tomsk State University, 634050, Tomsk, prospect Lenina, 36,
E-Mail: nvostrov@mail.ru

ABSTRACT

The study of the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) is one of the most important areas of research of bees in the world, and has both fundamental and practical significance. In the article the results of a comprehensive study of honeybee of some territories of Siberia (Tomsk region, Krasnoyarsk Krai) are given: variability of the locus *COI-COII* mtDNA on the level of bee colonies and populations has been described; accordance of data of variability of the locus *COI-COII* and morphometric parameters (cubital

and hantel index, discoidal shift) when identifying the breed has been evaluated; variability of some microsatellite loci (*A007*, *A008*, *AR049*, *AS117*, *AS113*, *A024*) has been studied. Two or even three variants of the locus *COI-COII* mtDNA in different combinations (PQQ and PQQQ variants characteristic for Middle Russian race and Q, specific for the southern species) was identified in some bee colonies from Tomsk region; a mismatch of morphometric data and results of the mtDNA analysis was registered. In hybrid bee colonies, originating from the southern races on maternal line (variant Q of the locus *COI-COII*), there is rapid replacement of "southern" genes by genes of Middle Russian race. The specific character of the distribution of allele frequencies of microsatellite loci has been detected for bee colonies from Siberia (Tomsk region, Krasnoyarsk Krai), differing in origin: the greatest differentiation was registered for loci *A008*, *A043* and *Ap049*, somewhat less - for loci *AC113* and *A024*. Comparison of own results with those of other populations (Bashkir population, European populations) allow to suggest that the loci of *A024*, *Ap049* and *A043* may be of interest as perspective DNA markers for the development of diagnostic kits for the determination of bee subspecies; locus *A008* is probably a marker of different ecotypes of Middle Russian race. Problems that may arise in the study of genetic diversity of honeybees, as well as possible solutions are discussed.

Keywords: honeybee, genetic diversity, the locus *COI-COII* mtDNA microsatellite loci.