

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ *Apis mellifera* L. АЛТАЙСКОГО КРАЯ

© 2022 г. М. Д. Каскинова¹*, Л. Р. Гайфуллина¹, А. К. Кинзикеев¹, А. Н. Гладких¹,
М. П. Соколянская¹, Е. С. Салтыкова¹

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2021 г.

После доработки 01.02.2022 г.

Принята к публикации 08.02.2022 г.

В данной работе представлены результаты анализа подвидовой принадлежности медоносной пчелы из Алтайского края при помощи микросателлитных локусов *Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28* и локуса *COI–COII* мтДНК. Установлено, что в исследуемой выборке из Алтайского края преобладает аллельный вариант RQQ *COI–COII* мтДНК, характерный для эволюционной ветви М. Анализ показал, что четверть семей имеют гибридное происхождение. Несмотря на то, что мы охватили лишь небольшую часть популяции, полученные результаты свидетельствуют о том, что в Алтайском крае сохранилась темная лесная пчела (было проанализировано 212 семей, из которых 159 группируются в общий кластер с *A. m. mellifera*).

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

DOI: 10.31857/S0016675822070098

На территории Европы возникли 10 из 30 известных подвидов медоносной пчелы [1–3]. Эти десять подвидов входят в состав двух эволюционных ветвей – западноевропейскую М и восточно-европейскую С [1–3]. К последней относятся два наиболее распространенных в коммерческом пчеловодстве подвида – итальянская медоносная пчела *A. m. ligustica* и краинская *A. m. carnica*. В настоящее время происходит как естественная гибридизация в пограничных зонах распространения подвидов из ветвей М и С, так и антропогенная, вызванная импортом пчелиных пакетов и маток [4, 7, 13].

Для пчеловодства России (как и Северной Европы) наиболее значимым с точки зрения устойчивости является подвид *Apis mellifera mellifera* (темная лесная или среднерусская пчела) [4–7]. Большой интерес представляет алтайская популяция медоносной пчелы, которая наряду с башкирской и орловской (полесской) считалась наиболее известной и стабильной [8]. Вопрос подвидовой принадлежности данной популяции остается нерешенным. Впервые пчелы были завезены в Алтайский край в 1776 г. из Башкирии, но зимой 1778 г. пчелы погибли [9]. В 1786 г. пчелы были завезены повторно из Полесья Киевской губернии [10]. С тех пор в Алтайский край завозились раз-

ные подвиды пчел и предполагается, что современная популяция медоносных пчел Алтайского края представлена гибридами, о чем свидетельствуют их морфологические и поведенческие признаки [11].

Ранее [12] на основе анализа 74 семей из пяти районов Алтайского края нами уже было показано, что в данной выборке преобладает аллельный вариант RQQ, однако на уровне ядерной ДНК в некоторых семьях наблюдалась умеренная гибридизация. Опираясь на полученные нами данные, часть пчеловодов провели мероприятия по замене маток в гибридных семьях. В настоящей работе мы провели повторный анализ подвидовой принадлежности алтайской популяции медоносной пчелы, расширив ареал исследования.

В исследовании были использованы рабочие пчелы из Алтайского края, отобранные в период с 2017 по 2021 гг. из семи районов: Третьяковского (одна пасека, $N = 62$ семьи), Волчихинского (одна пасека, $N = 29$), Чарышского (три пасеки, $N = 61$), Змеиногорского (одна пасека, $N = 18$), Рубцовского (одна пасека, $N = 22$), Красногорского (одна пасека, $N = 4$) и г. Барнаул (две пасеки, $N = 20$). В качестве референсной группы эволюционной ветви М были использованы выборки *A. m. mellifera* из Бурзянского р-она Башкирии и Пермского

Таблица 1. Генетическая структура исследуемых семей из Алтайского края

Район	N	Доля М	Доля С	Число семей с долей М > 0.88	Аллельный вариант RQQ	Аллельный вариант Q
Третьяковский	62	0.840	0.160	42	54	8
Змеиногорский	18	0.970	0.030	16	18	0
Рубцовский	22	0.950	0.050	21	22	0
Чарышский	61	0.870	0.130	45	61	0
Волчихинский	29	0.880	0.120	21	29	0
Красногорский	4	0.100	0.900	0	0	4
г. Барнаул	16	0.890	0.110	14	16	0
Итого	212	0.786	0.214	159	200	12

края ($N = 136$). Выборки из Республики Адыгея и Закарпатской обл. Украины ($N = 120$) были использованы в качестве представителей эволюционной ветви С.

Выделение ДНК проводили набором реактивов ДНК-ЭКСТРАН-2 (Синтол, Москва). Исследование включало ПЦР-анализ локуса *COI-COII* мтДНК и микросателлитных локусов *Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28*. Смесь ПЦР включала 17 мкл дистиллированной воды, 2 мкл магниевого буфера, 0.4 мкл dNTP (10 мкМ), 0.6 мкл F- и R-праймера (2 ОЕ) и 0.3 мкл Taq-полимеразы. Режим ПЦР: 5 мин 94°C, затем 30 циклов с денатурацией 30 с при 94°C, отжигом 30 с при 54.5°C, элонгацией 60 с при 72°C и конечной элонгацией 7 мин при 72°C (термоциклер T100, Bio-Rad Laboratories). Для визуализации продуктов амплификации использовали электрофорез в 8%-ном полиакриламидном геле с последующей детекцией в фотосистеме Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories).

Для определения генетической структуры популяций медоносной пчелы была использована программа Structure 2.3.4 с заданным числом кластеров от 1 до 10. Количество предполагаемых групп (**K**) рассчитывали в Structure Harvester. Анализ был выполнен при помощи модели Admixture с указанием информации о географической локализации выборок (LocPrior) и с Burnin Period и MCMC равных 10000 и 100000 повторов соответственно. Результаты анализа обрабатывали в CLUMPP 1.1.2 с помощью алгоритма FullSearch.

В результате анализа локуса *COI-COII* мтДНК было показано, что аллельный вариант RQQ является преобладающим для алтайской популяции. Аллельный вариант Q был выявлен в Третьяковском и Красногорском р-нах, в семьях *A. m. carnica* (согласно данным пчеловодов), табл. 1. Аллельные варианты $R(Q)_{1-n}$ являются маркерами происхождения пчел от *A. m. mellifera*, вариант Q — от подвидов из эволюционной ветви С по материнской линии [13].

Согласно данным кластерного анализа во всех районах, за исключением Красногорского, преобладает генофонд *A. m. mellifera*. Уровень интрогрессии генофонда эволюционной ветви С в этих выборках варьируют от 5 до 16%. В Красногорском р-не исследуемые семьи принадлежат к эволюционной ветви С.

Уровень интрогрессии генофонда ветви С в алтайской популяции (рис. 1) составил в среднем 0.214. 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 [14]. Среди выборок темной лесной пчелы Западной Европы максимальный уровень интрогрессии наблюдался в датском заказнике — 0.12 [4]. Учитывая эти данные, полученные на основе анализа микросателлитных локусов, уровень интрогрессии генофонда эволюционной ветви С равный 0.12 принят нами как максимальный уровень, при котором семью можно считать принадлежащей к подвиду *A. m. mellifera* (т. е. доля М должна быть больше 0.88).

Таким образом, в исследуемых выборках из Алтайского края преобладает аллельный вариант RQQ локуса *COI-COII* мтДНК, соответствующего эволюционной ветви М. Выборки из Змеиногорского, Рубцовского, Волчихинского районов и г. Барнаула принадлежат к подвиду *A. m. mellifera* (доля М на основе анализа полиморфизма девяти микросателлитных локусов >0.88). Незначительный уровень интрогрессии генофонда ветви С, по сравнению с Красногорским р-ном, выявлен в Третьяковском и Чарышском р-нах.

Подробное исследование популяции пчел Алтайского края было проведено в 80-е годы С.Е. Чернышовым [15]. На основе анализа 34 пасек в различных природно-климатических зонах он установил, что на территории края существуют две популяции алтайских пчел: горно-таежная и лесостепная, которые различаются между собой по экстрактерным признакам [15]. На основе оценки мор-

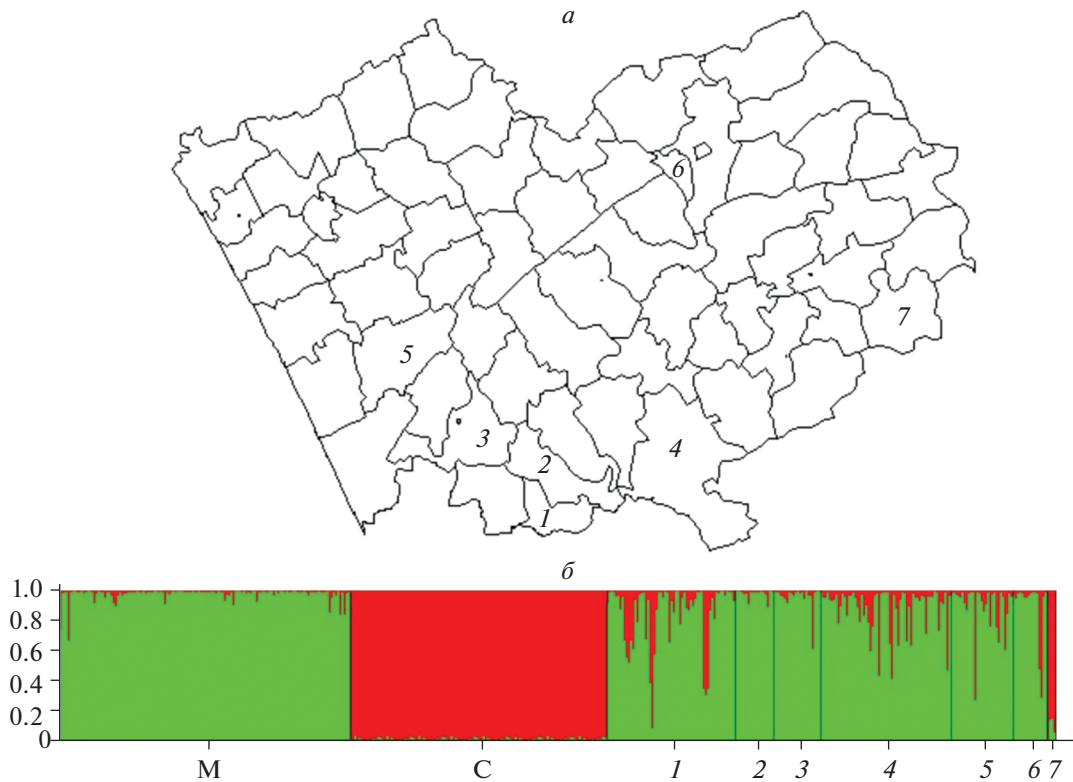


Рис. 1. *a* – географическое расположение исследуемых выборок. *б* – генетическая структура популяции исследуемых выборок при $K = 2$, где М – референсная выборка эволюционной ветви М из Бурзянского р-она Башкирии и Пермского края, С – референсная выборка эволюционной ветви С из Республики Адыгея и Закарпатской обл. Украины; 1 – Третьяковский, 2 – Змеиногорский, 3 – Рубцовский, 4 – Чарышский, 5 – Волчихинский районы, 6 – г. Барнаул, 7 – Красногорский р-он. Зеленым цветом обозначена доля эволюционной ветви М, красным – ветви С.

фометрических показателей, Чернышев предположил, что лесостепные пчелы являются гибридами, тогда как горно-таежные скорее всего относятся к группе “северных лесных пчел”. Современные исследования медоносных пчел в Алтайском крае ограничены анализом морфометрических показателей отдельных семей или 1–2 пасек [16, 17].

На основе анализа генетической структуры популяции Алтайского края мы установили, что в исследуемой выборке из семи районов преобладает аллельный вариант PQQ *COI*–*COII* мтДНК, и при этом четверть семей имеют гибридное происхождение. По сравнению с данными за 2017 г., где доля гибридизации в некоторых семьях варьировала от 24 до 37%, в выборках за 2020 г. максимальная доля гибридизации в семьях, принадлежащих к эволюционной ветви М, составила 16% (данные для Красногорского р-на не учитываются, поскольку семьи из данного района принадлежат к эволюционной ветви С). Таким образом, результаты исследования обнадеживают и дают основания полагать, что в Алтайском крае есть перспектива для сохранения темной лесной пчелы.

Авторы выражают благодарность А.А. Шунку, И.Н. Чубарову, В.Р. Тягунову, Д.В. Настенко,

А.В. Жабину, А.С. Малик, Д.В. Осинovu за предоставленный материал и сотрудничество.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 19-54-70002, а также Госзадания АААА-А21-121011990120-7 с использованием оборудования ЦКП “Агидель” и УНУ “Кодинк” УФИЦ РАН.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ruttner F.* Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. 288 p.
2. *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. 6(10). P. 1081–1088.
3. *Momeni J., Parejo M., Nielsen R.O. et al.* Authoritative subspecies diagnosis tool for European honey bees based on ancestry informative SNPs // *BMC Genomics.* 2021. V. 22. P. 101. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07379-7>

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. Ruottinen L., Berg P., Kantanen J. et al. Status and Conservation of the Nordic Brown Bee: Final Report. NordGen, 2014. 42 p.
6. Thompson C. The Health and Status of the Feral Honeybee (*Apis mellifera* sp.) and *Apis mellifera mellifera* Population of the UK: PhD thesis. Leeds, 2010. 173 p.
7. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николаенко 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.
8. Билаш Г.Д., Кривцов Н.И. Селекция пчел. Москва: Агропромиздат, 1991. 304 с.
9. Миньков С.Г. Из истории пчеловодства на Алтае // Пчеловодство. 1954. № 3. С. 62–64.
10. Костенков П.П. Сибирскому пчеловоду. Барнаул: Веди, 1992. 80 с.
11. Шунк А.А. Ройливость местных пчел Алтая // Пчеловодство. 2008. № 4. С. 35–37.
12. Каскинова М.Д., Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р. и др. Генетическое состояние алтайской популяции темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. // Биомика. 2018. Т. 10(3). С. 281–285. <https://doi.org/10.31301/2221-6197.bmcs.2018-37>
13. Bertrand B., Alburaki M., Legout H. et al. MtDNA *COI-COII* marker and drone congregation area: An efficient method to establish and monitor honeybee (*Apis mellifera* L.) conservation centers // Mol. Ecol. Resour. 2015. V. 15. P. 673–683. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12339>
14. 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.
15. Чернышов С.Е. Эколого-морфологические особенности и хозяйственная ценность медоносных пчел (на примере Алтайского края): Автореф. дис. ... канд. сельскохозяйств. наук. М.: Московская Ордена Ленина и Ордена Трудового Красного Знамени с.-хоз. академия им. К.А. Тимирязева, 1982. 129 с.
16. Попеляев А.С., Мещерякова Л.А. Биологические особенности пчел и пыльцевой состав меда Змеиногогорского района Алтайского края // Сб. матер. XIV Междунар. научно-практической конф. “Аграрная наука – сельскому хозяйству”. 2019. С. 199–200.
17. Мещерякова Л.А. Породные особенности пчел и флористический состав меда пасеки Калманского района Алтайского края // Вестник Алтайского гос. аграр. ун-та. 2018. № 6(164). С. 150–155.

Genetic Structure of the *Apis mellifera* L. Population from Altay Krai

M. D. Kaskinova^{a, *}, L. R. Gaifullina^a, A. K. Kinzikeev^a,
A. N. Gladkih^a, M. P. Sokolyanskaya^a, and E. S. Saltykova^a

^aInstitute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

*e-mail: kaskinovamilyausha@mail.ru

This study presents the results of the analysis of subspecies of honeybee from Altai Krai using SSR loci *Ap243*, *4a110*, *A24*, *A8*, *A43*, *A113*, *A88*, *Ap049*, *A28*, and the mtDNA *COI-COII* locus. It was found that the allelic variant PQQ *COI-COII* of mtDNA, characteristic of the evolutionary lineage M, prevails in the studied sample of seven districts of the Altai Krai. Analysis of microsatellite loci showed that a quarter of colonies are of hybrid origin. Despite the fact that we covered only a small part of the population, the results obtained indicate that the dark forest bee has survived in the Altai Krai.

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