



СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ СЕМЕЙ ПЧЕЛ

© Р.А. Ильясов, А.В. Поскряков, А.Г. Николенко

ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН, Уфа

Для цитирования: Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Современные методы оценки таксономической принадлежности семей пчел // Экологическая генетика. — 2017. — Т. 15. — № 4. — С. 41–51. doi: 10.17816/ecogen15441-51.

Поступила в редакцию: 09.06.2017

Принята к печати: 21.11.2017

✿ В ходе эволюции аллопатрически формировалось 30 подвидов медоносной пчелы *Apis mellifera* L., которые распространены по всей территории Африки, Европы и Западной Азии. Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* — единственный и наиболее ценный подвид для стран Северной и Западной Европы, приспособленный к продуктивной жизнедеятельности в резко континентальном климате Евразии. В последние 100 лет естественная географическая изоляция подвидов была нарушена в результате деятельности человека. Массовые перемещения семей пчел за пределы границ их ареалов создали угрозу потери чистопородности аборигенных генофондов подвидов в результате гибридизации. Сохранение генофонда подвидов возможно лишь при контроле транспортировок семей пчел с использованием методов идентификации таксономической принадлежности. На данный момент разработаны десятки методов идентификации таксономической принадлежности семей пчел, которые основываются на вариабельности частей тела, аллозимных локусов, митохондриальной ДНК, микросателлитных локусов ядерной ДНК, сайтов однонуклеотидных замен (SNP). Вариабельность микросателлитных локусов и полиморфизм сайтов однонуклеотидных замен показали наибольшую информативность при идентификации таксономической принадлежности семей пчел.

✿ **Ключевые слова:** аллозимные маркеры; *Apis mellifera*; генофонд; медоносная пчела; гибридизация; микросателлитные маркеры; митохондриальные маркеры; морфометрия; SNPs; подвиды.

MODERN METHODS OF ASSESSING THE TAXONOMIC AFFILIATION OF HONEYBEE COLONIES

© R.A. Ilyasov, A.V. Poskryakov, A.G. Nikolenko

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Russia

For citation: Ilyasov RA, Poskryakov AV, Nikolenko AG. Modern methods of assessing the taxonomic affiliation of honeybee colonies. *Ecological genetics*. 2017;15(4):41-51. doi: 10.17816/ecogen15441-51.

Received: 09.06.2017

Accepted: 21.11.2017

✿ At least 30 subspecies of the honeybee *Apis mellifera* L. were formed allopatrically during the evolution, which spreaded throughout all Africa, Europe and West Asia. The dark forest bee *Apis mellifera mellifera* is the only and most valuable subspecies for the Northern and Western Europe countries, adapted to productive living in the hard-continental climate of Eurasia. In the past 100 years, natural geographical isolation of subspecies has been disrupted as a result of a human activities. Mass transportations of honeybee colonies beyond the boundaries of their area have been threatened of loss the identity of gene pool of subspecies as a result of hybridization. Preservation of the gene pool of subspecies is possible only when controlling the transportation of honeybee colonies using the methods of identification of taxonomic affiliation of honeybee colonies. Now, dozens of methods have been developed to identify the taxonomic affiliation of honeybee's colony, which are based on the variability of body parts, allozyme loci, mitochondrial DNA loci, microsatellite nuclear loci, sites of single nucleotide polymorphism (SNP). The variability of microsatellite loci and the single nucleotide polymorphism sites have shown the greatest informativeness in identification of the taxonomic affiliation of honeybee's colony.

✿ **Keywords:** allozyme markers; *Apis mellifera*; gene pool; honeybee; hybridization; microsatellite markers; mitochondrial markers; morphometry; SNPs; subspecies.

ВВЕДЕНИЕ

Медоносная пчела *Apis mellifera* по современной классификации подразделяется на 30 подвидов, которые относятся к 6 эволюционным ветвям: А (Африка),

М (Западная и Северная Европа), С (Восточная Европа и Средиземноморье), О (Ближний Восток), Z (Сирия), Y (Йемен). Эволюционная ветвь М включает два подвида: *A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*. Эволюционная ветвь С — 9 подвидов: *A. m. ligustica*, *A. m. carnica*,

A. m. carpathica, *A. m. macedonica*, *A. m. cecropia*, *A. m. sicula*, *A. m. pomonella*, *A. m. ruttneri*, *A. m. caucasica*. Эволюционная ветвь O — 6 подвидов: *A. m. remipes*, *A. m. armeniaca*, *A. m. adami*, *A. m. meda*, *A. m. cypria*, *A. m. anatoliaca*. Эволюционная ветвь Z — 1 подвид: *A. m. syriaca*. Эволюционная ветвь A — 11 подвидов: *A. m. sahariensis*, *A. m. intermissa*, *A. m. lamarckii*, *A. m. litorea*, *A. m. scutellata*, *A. m. monticola*, *A. m. adansonii*, *A. m. unicolor*, *A. m. capensis*, *A. m. simensis*, *A. m. nubica*. Эволюционная ветвь Y — 1 подвид: *A. m. jemenitica*.

Темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* — единственный из 30 известных подвидов медоносной пчелы, идеально приспособленный к жизни в экстремально холодном климате Северной Европы. Предполагается, что темная лесная пчела, по сравнению с подвидами южных регионов, отличается меньшей медовой продуктивностью и большей агрессивностью. В связи с этим у многих пчеловодов сформировалась идея создания миролюбивой высокопродуктивной «суперпороды» пчел, идеально адаптированной к климату с продолжительными морозными зимами. Наиболее распространенным и простым методом создания новых пород в животноводстве считается метод скрещивания подвидов и пород. Однако в пчеловодстве данный метод оказался неподходящим, поскольку скрещивание у пчел происходит немного сложнее: матка скрещивается только один раз в жизни с 10–12 трутнями одновременно, так что генотип потомства сложно контролировать. Также отмечают, что семьи темной лесной пчелы второго и третьего поколений после гибридизации начинают значительно уступать чистопородным по основным хозяйственно полезным признакам [1].

Вследствие неограниченного потока генов между природными и коммерческими популяциями пчел генофонд *A. m. mellifera* оказался утраченным во многих странах Европы [2]. Так, в Германии и Великобритании уже в XIX в. произошла гибридизация и замещение местного подвида *A. m. mellifera* интродуцированными подвидами *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* соответственно [3]. В России подвид *A. m. mellifera* в границах естественного ареала частично гибридизован с интродуцированными из южных регионов подвидами *A. m. caucasica* и *A. m. carpathica* [4].

Современный ареал темной лесной пчелы *A. m. mellifera* уменьшается под влиянием:

- 1) сокращения общей площади лесов, пригодных для обитания пчел в диком виде;
- 2) использования новых высокотоксичных пестицидов класса неоникотиноидов в сельском хозяйстве;
- 3) экспансии патогенов пчел — нозематоза типов А и С, варроатоза, аскосфероза и шести штаммов вирусов: вирус деформации крыла (*DWV*), вирус острого паралича (*ABPV*), вирус хронического паралича (*CBPV*), кашмирский вирус пчел (*KBV*), вирус мешотчатого расплода (*SBV*), вирус черных маточников (*BQCV*).

Аборигенный генофонд *A. m. mellifera* в ближайшем будущем может пережить резкое снижение эффективной численности популяции. Сохранение и восстановление чистопородного генофонда темной лесной пчелы *A. m. mellifera* может быть обеспечено мероприятиями, основанными на методах точной идентификации таксономической принадлежности семей пчел [5].

Существует несколько методов идентификации подвидов пчел: морфометрические (морфометрия частей тела, классическая морфометрия крыла, дискриминантный анализ DAWINO, геометрический анализ формы крыла), биохимические (аллозимный полиморфизм), генетические (полиморфизм локусов мтДНК и яДНК, вариабельность микросателлитных локусов и полиморфизм сайтов однонуклеотидных замен SNP (single nucleotide polymorphism)).

Для идентификации подвидов пчел первоначально во всем мире использовали только морфометрические методы исследования. Однако морфометрические признаки не всегда информативны при идентификации подвидов, поскольку под воздействием условий среды обитания подвержены изменчивости [6].

В дальнейшем получили развитие биохимические методы идентификации подвидов пчел на основе полиморфизма аллозимных локусов. Аллозимный полиморфизм стали применять в популяционно-генетических исследованиях пчел во всем мире. Существенным недостатком аллозимных локусов оказался низкий уровень полиморфизма у всех представителей общественных перепончатокрылых, в том числе и пчел. Возможно, что это является следствием гаплодиплоидной организации семей пчел.

Одновременно разрабатывались методы идентификации подвидов пчел на основе полиморфизма локусов митохондриальной ДНК (мтДНК). Данный полиморфизм успешно применялся в филогенетических и филогеографических исследованиях медоносной пчелы [7, 8]. Недостатком маркеров мтДНК является исключительно материнский тип наследования.

В то же время развивались методы идентификации подвидов пчел на основе полиморфизма локусов ядерной ДНК (яДНК). Наиболее удобными ядерными маркерами в исследованиях пчел были микросателлитные локусы, которые равномерно распределены по всему геному, характеризуются нейтральностью по отношению к естественному отбору и наследованием по обоим родительским линиям. Вариабельность микросателлитных маркеров может быть успешно использована как в популяционных исследованиях, так и при составлении генетических карт сцепления.

В последнее время получили развитие методы идентификации подвидов пчел на основе анализа SNP. Данные маркеры получили широкое распространение в популяционных, эволюционных и филогенетических исследованиях пчел благодаря развитию методов секвенирования следующего поколения NGS (next-generation

sequencing) Illumina. SNP-маркеры характеризуются высоким разрешением в силу их количеству и стабильной наследуемости в ряду поколений. Маркеры однонуклеотидного полиморфизма могут быть успешно использованы в генетическом картировании, популяционных и эволюционных исследованиях, селекции линий по хозяйственно полезным признакам и устойчивости к заболеваниям, идентификации таксономической принадлежности семей пчел [9–11].

В статье описаны методы идентификации таксономической принадлежности семей пчел, основанные на полиморфизме морфологических параметров, аллозимных локусов, генов мтДНК, микросателлитных локусов яДНК и сайтов SNP.

ОЦЕНКА ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ СЕМЕЙ ПЧЕЛ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ

Основы современного классического морфологического анализа пчел в России заложил В.В. Алпатов (1948). Для дифференциации подвидов *A. mellifera* было предложено измерять ширину и длину 3-го тергита, правого переднего крыла, кубитальный индекс, дискоидальное смещение, длину хоботка, что в целом отражает специфику развития хозяйственно полезных признаков пчел. Метод анализа вариации частей тела между разными подвидами медоносной пчелы подразделяется на четыре группы: характеристика размеров тела, окраска, характеристика жилкования крыльев и характеристика волосков [12].

В дальнейшем морфометрический метод на основе 36 признаков был усовершенствован многомерным статистическим анализом [3]. Сейчас в морфометрических исследованиях пчел в связи с массовой гибридизацией подвидов принято использование не менее 25 характеристик частей тела: волосков, хоботка, задней ножки, тергита, стернита, тела и крыльев. Недостатком данно-

го метода является зависимость размеров частей тела от природно-климатических факторов, которая перебивает морфометрические показатели у разных подвигов пчел [12].

Несмотря на указанные недостатки, морфометрический анализ активно используется для идентификации подвидов пчел в России в связи с относительной простотой и низкой стоимостью. На основе морфометрических исследований вариации частей тела выявлена чистопородность популяции темной лесной пчелы в Пермском крае [13], в Республике Татарстан [14], в Республике Башкортостан [15], в Республике Удмуртия [16].

Для дифференциации подвидов пчел по жилкованию крыльев используют следующие подходы: классическую морфометрию крыла, дискриминантный анализ DAWINO (discriminant analysis with numerical output), который проводится по 19 углам между соединениями жилок, 7 линейным измерениям и 5 индексам (www.beedol.cz), а также геометрический анализ формы крыла [17]. I. Kandemir et al. (2011) согласовали результаты исследований классической морфометрии крыла медоносной пчелы с дискриминантным анализом крыла методом DAWINO [18] (рис. 1).

Высокая степень корреляции генетических расстояний между подвидами пчел эволюционных ветвей А, М и С, полученных на основе дискриминантного анализа крыльев, была продемонстрирована на выборке из 663 семей пчел из 6 популяций Европы и Африки [19].

Таким образом, морфометрические методы исследования, несмотря на невысокую точность, позволяют сделать быструю и недорогую предварительную оценку таксономической принадлежности семей пчел. Дополнительные оценки биологических и этологических признаков семей пчел позволяют повысить точность идентификации их таксономической принадлежности. Эти факты делают морфометрические методы исследования пчел распространенными в практической деятельности пчеловодов на сегодняшний день.

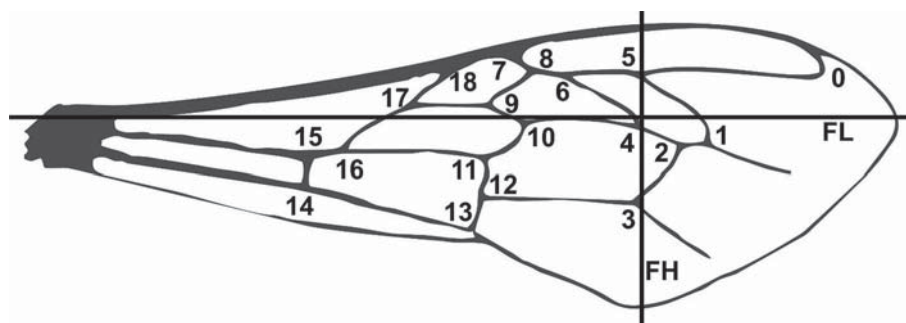


Рис. 1. Дифференциация подвидов пчел по жилкованию крыльев методом дискриминантного анализа DAWINO. Точки соединения прожилок пронумерованы. FH — ширина крыла, FL — длина крыла

Fig. 1. Differentiation of honeybee subspecies on wing venation pattern by the method of discriminant analysis DAWINO. The points of connection of veins are numbered. FH — wing width, FL — wing length

ОЦЕНКА ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ СЕМЕЙ ПЧЕЛ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ ИЗМЕНЧИВОСТИ АЛЛОЗИМНЫХ ЛОКУСОВ

Аллозимы — уникальные переменные изоферменты, находящиеся под контролем одного гена. Исследования аллозимного полиморфизма пчел начались в 50-е гг. и стали популярными в 80-е гг. XX в. [20].

Анализ аллозимной изменчивости пчел дает возможность изучить структуру популяции и поток генов, определить процессы гибридизации и величину генетического разнообразия в популяции, провести идентификацию подвидов пчел и оценить их приспособленность к условиям среды обитания (рис. 2) [21].

Каждый аллозимный локус характеризуется определенным количеством аллелей. Отдельные популяции пчел характеризуются встречаемостью разных аллелей аллозимных локусов [23]. В популяциях медоносной пчелы переменными являются следующие аллозимные локусы:

- малатдегидрогеназа *MDH1* (EC1.1.1.37) (7 аллелей: *MDH65*, *MDH80*, *MDH87*, *MDH100*, *MDH116*, *MDH125*, *MDH133*) [22];
- малик-энзим *ME* (EC1.1.1.40) (4 аллеля: *ME70*, *ME100*, *ME106*, *ME117*) [23];
- эстераза *EST-3* (EC3.1.1) (8 аллелей: *EST70*, *EST80*, *EST88*, *EST94*, *EST100*, *EST105*, *EST118*, *EST130*) [24];
- щелочная фосфатаза *ALP* (EC3.1.3.1) (3 аллеля: *ALP80*, *ALP90*, *ALP100*) [24];
- фосфоглюкомутаза *PGM* (EC5.4.2.2) (5 аллелей: *PGM75*, *PGM80*, *PGM100*, *PGM114*, *PGM120*) [24];
- гексокиназа *HK* (EC2.7.1.1) (5 аллелей: *HK77*, *HK87*, *HK100*, *HK110*, *HK120*) [25].

Аллозимный локус малатдегидрогеназы *MDH1*, несмотря на то что не характеризуется абсолютной нейтральностью к естественному отбору, активно используется во всем мире для дифференциации африканизированных и европейских популяций пчел [26]. Исследования переменности аллозимных локусов в популяции пчел *A. m. ligustica* показали, что завоз пчел из других популяций приводит к росту переменности *MDH1* [26].

В популяции пчел из Норвегии переменными являлись два локуса — *MDH1* и *ME* [23]; в популяциях пчел Южной Америки и Австралии — только 1 локус *EST* [18]; в популяциях пчел Бразилии и Уругвая — два локуса: *EST* и *PGM* [17]; в популяциях пчел Африки — 5 локусов: *MDH*, *ME*, *PGM*, *EST* и *HK* [12].

На основе сравнительного анализа частот аллелей аллозимных локусов можно изучить процесс внутривидовой гибридизации. Так, на основе переменности аллозимного локуса *EST* была показана гибридизация между пчелами подвидов *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* в Восточной Европе [19].

Использование аллозимной переменности в исследованиях пчел на данный момент не получило широкого распространения в связи с некоторыми недостатками аллозимных маркеров. Специфической особенностью медоносной пчелы является очень низкий уровень переменности аллозимных локусов. По данным маркерам нет фиксированных различий между подвидами, а популяции различаются лишь по частотам аллелей, вследствие чего аллозимные локусы становятся недостаточно информативными для популяционных исследований [23]. Известно, что в популяции пчел подвида *A. m. ligustica* (США) средняя гетерозиготность по 39 аллозимным локусам составляла около 1 % [29]. Причиной такого низкого уровня переменности алло-

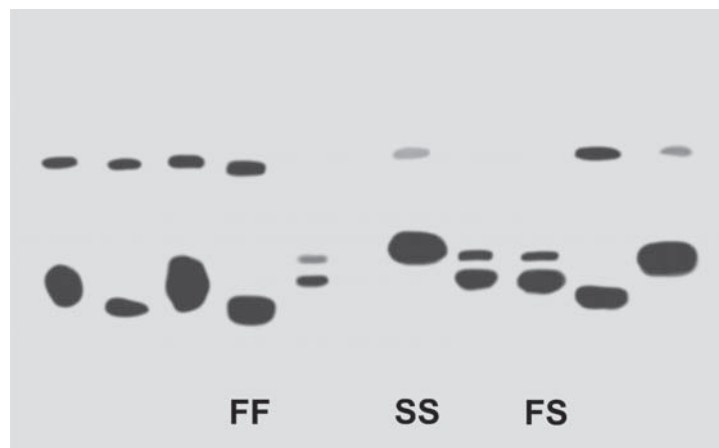


Рис. 2. Электрофоретический паттерн полиморфного аллозимного локуса малатдегидрогеназы (MDH) пчел. FF, SS и FS — генотипы, состоящие из быстрых (F) и медленных (S) аллелей [22]

Fig. 2. Electrophoretic pattern of polymorphic allozyme locus of Malate dehydrogenase MDH in honeybees. FF, SS and FS — genotypes are composed of fast F and slow S alleles

зимных локусов пчел, возможно, является гаплодиплоидная система размножения.

Следовательно, для исследования пчел и идентификации подвидов аллозимные маркеры недостаточно информативны, и сейчас их использование в научном мире очень ограничено.

ОЦЕНКА ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ СЕМЕЙ ПЧЕЛ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Исследования полиморфизма локусов митохондриальной ДНК (мтДНК) медоносной пчелы начались с 80-х гг. и стали популярными в 90-х гг. XX в. Митохондриальная ДНК медоносной пчелы — это небольшая кольцевая молекула размером около 16,3 тыс. п. н. с материнским типом наследования [7].

При изучении полиморфизма мтДНК медоносной пчелы наиболее распространены методы, основанные на определении нуклеотидной последовательности и анализе фрагментов рестрикции эндонуклеазами (ПДРФ) [8]. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *COI* мтДНК используется для определения филогенетических взаимоотношений видов рода *Apis* и подвидов *Apis mellifera*, а также проведения генетического штрихкодирования [30]. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *ND2* мтДНК применяется для определения внутривидовых филогенетических взаимоотношений медоносной пчелы и позволяет дифференцировать подвиды пчел на четыре эволюционные ветви А, М, С и О [31].

Для идентификации таксономической принадлежности семей пчел по материнской линии наиболее активно используют анализ полиморфизма межгенного локуса *COI–COII* мтДНК, характеризующегося вариабельностью длины от 500 до 1500 п. н. [32]. В России

анализ полиморфизма межгенного локуса *COI–COII* мтДНК использовался для дифференциации пчел подвида *A. m. mellifera* эволюционной ветви М от подвидов *A. m. caucasica* и *A. m. carnica* эволюционной ветви С [4, 33].

Межгенный локус *COI–COII* мтДНК состоит из двух типов нуклеотидных последовательностей, обозначаемых Р и Q, где Р может иметь варианты Р0, Р1 и Р2, отличающиеся небольшими делециями и инсерциями. Пчелы разных эволюционных ветвей характеризуются разными комбинациями элементов Р и Q. Наиболее коротким фрагментом локуса *COI–COII* мтДНК, содержащим единственный элемент Q, характеризуются подвиды пчел эволюционной ветви С из Юго-Восточной Европы [32]. Подвиды пчел, относящиеся к эволюционным ветвям А, М, О, Y и Z, характеризуются более длинным фрагментом локуса *COI–COII* мтДНК и содержат разные варианты элемента Р и от 1 до 5 копий элемента Q [29]. Вариабельность длины межгенного локуса *COI–COII* мтДНК легко обнаруживается обыкновенной полимеразной цепной реакцией (ПЦР) (рис. 3).

Дополнительный полиморфизм обнаруживается при ПДРФ-анализе эндонуклеазами всей митохондриальной ДНК и составляющих ее генов. Для рестрикции митохондриальной ДНК медоносной пчелы применяются 13 эндонуклеаз *HinfI*, *AccI*, *AvaI*, *BclI*, *BglII*, *EcoRI*, *HincII*, *HindII*, *HindIII*, *NdeI*, *PstI*, *PvuII*, *XbaI* [8]. На основе ПДРФ-анализа мтДНК 10 эндонуклеазами была подтверждена дифференциация подвидов пчел на четыре эволюционные ветви А, М, С, О [3] и выявлены подвидоспецифичные гаплотипы [8].

На основе ПЦР-ПДРФ-анализа генов *COI* и *Nd5* мтДНК эндонуклеазами *NcoI*, *StyI* и *AluI* у пчел подвида *A. m. macedonica* из Македонии [34], эндонуклеазами *SspI*, *HincII* и *FokI* пчел подвидов *A. m. rodopica* из Болгарии и *A. m. macedonica* из Греции [24] разработаны диагностические маркеры подвидов. ПЦР-ПДРФ-ана-

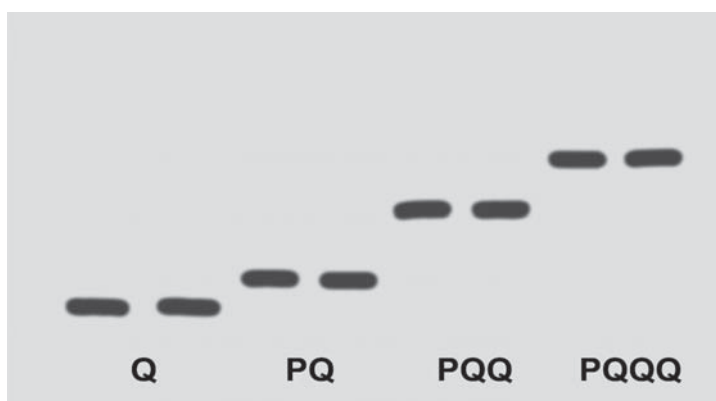


Рис. 3. Полиморфизм длин фрагментов амплификации локуса *COI–COII* мтДНК. Q, PQ, PQQ, PQQQ — варианты последовательностей ДНК, содержащие разное число фрагментов Р и Q

Fig. 3. Amplified fragments lengths polymorphism of the locus *COI–COII* mtDNA. Q, PQ, PQQ, PQQQ — variants of DNA sequences, containing a different number of fragments P and Q

лиз гена *COI* мтДНК эндонуклеазами *HincII* и *XbaI* использовался для дифференциации подвидов эволюционных ветвей М (*A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*) и С (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasica*) [35], эндонуклеазой *HinfI* — для идентификации подвида пчел *A. m. lamarkii* [36], эндонуклеазами *NcoI* и *StyI* — для различения подвида *A. m. macedonica* от подвидов *A. m. adami*, *A. m. cecropia*, *A. m. cypria* [34]. ПЦР-ПДРФ-анализ гена *CYT B* мтДНК эндонуклеазой *BglII* позволил дифференцировать европейские семьи пчел (эволюционные ветви М и С) от африканских (эволюционная ветвь А) [37], тогда как рестрикционный анализ гена *Ls rRNA* мтДНК эндонуклеазой *HincII* давал возможность дифференцировать семьи пчел, относящихся к эволюционным ветвям М и С [35].

Наиболее популярен среди исследователей пчел рестрикционный полиморфизм межгенного локуса *COI-COI* мтДНК эндонуклеазой *DraI*, называемый кратко *DraI*-тест [36]. *DraI*-тест широко использовался в анализе генетической структуры зон гибридизации подвидов [38], изучении уровня интрогрессии генов «южных» подвидов [2], мониторинге изменений генофонда по материнской линии в африканизированных популяциях пчел Северной и Южной Америки [39]. *DraI*-тест позволяет дифференцировать свыше 100 гаплотипов медоносной пчелы [40]. Несмотря на высокий уровень полиморфизма *DraI*, тест не всегда позволяет четко дифференцировать подвиды пчел. Так, гаплотип С1 представлен как у *A. m. carnica*, так и у *A. m. ligustica*, хотя и с разными частотами [41], гаплотип А1 — у *A. m. iberiensis*, *A. m. adansonii* и других африканских подвидов, гаплотип М4 — у *A. m. iberiensis* и *A. m. mellifera* [38].

Таким образом, материнский тип наследования митохондриальной ДНК создает некоторые ограничения для молекулярно-филогенетических исследований пчел. В связи с этим сейчас изучение полиморфизма

генов мтДНК для идентификации таксономической принадлежности семей пчел в научном мире становится более ограниченным.

ОЦЕНКА ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ СЕМЕЙ ПЧЕЛ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ ВАРИАбельНОСТИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

С 90-х гг. XX в. генетические исследования пчел и других перепончатокрылых насекомых стали проводиться на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов. Микросателлитные локусы представляют собой короткие (от 2 до 6 п. н.) tandemно повторяющиеся фрагменты ДНК, разбросанные в разных частях генома. Медоносная пчела представляет собой один из первых видов общественных насекомых, у которого изучено большинство микросателлитных локусов [42]. В геноме медоносной пчелы обнаружено и описано свыше 500 микросателлитных локусов, варибельность которых может быть использована для идентификации таксономической принадлежности семей пчел, анализа генетической структуры популяций, оценки степени инбридинга, уровня гетерозиготности, генетических расстояний между популяциями и подвидами пчел, а также для расчета коэффициента генетического родства и уровня интрогрессии чужеродных генов в популяции [43]. Для достоверной оценки структуры популяции и идентификации подвидов медоносной пчелы в большинстве случаев достаточно проанализировать варибельность 10 микросателлитных локусов из выборки 40 семей пчел [26].

Варибельность микросателлитных локусов пчел можно оценивать по электрофореграммам в полиакриламидных гелях (ПААГ), а также в автоматическом режиме на многоканальных капиллярных секвенаторах в режиме фрагментного анализа с мечеными праймерами и маркерной лестницей (рис. 4).



Рис. 4. Электрофоретический паттерн варибельного микросателлитного локуса A113 медоносной пчелы. 12, 13, 14, 23, 24 — генотипы, состоящие из аллелей 1, 2, 3, 4

Fig. 4. Electrophoretic pattern of variable microsatellite locus A113 in honeybees. 12, 13, 14, 23, 24 — genotypes are composed of 1, 2, 3, 4 alleles

Вариабельность микросателлитных локусов нашла широкое применение в генетических исследованиях и идентификации подвидов пчел во всем мире. На основе анализа вариабельности микросателлитных локусов были изучены таксономическая принадлежность семей и генетическая структура популяций *A. m. mellifera* Томской [44] и Новосибирской областей [45], Пермского края, Республики Башкортостан [46], Красноярского края, Республики Татарстан, Архангельской и Владимирской областей [47]; популяций *A. m. carpathica* Республики Адыгея и Закарпатской области Украины [47]; популяций *A. m. caucasica* Краснодарского края и Орловской области [48].

На основе изучения вариабельности 7 микросателлитных локусов определена зона интрогрессии между пчелами подвидов *A. m. mellifera* и *A. m. ligustica* на Альпах на границе между Францией и Италией [43], в Швейцарии, Норвегии, Франции [49], Польше [50], а также в популяции африканизированных пчел между пчелами подвидов *A. m. intermissa* и *A. m. ligustica* на полуострове Юкатан [39]. Анализ вариабельности 6 микросателлитных локусов позволил выяснить относительную чистоту линий иберийской популяции пчел подвида *A. m. iberiensis* в Испании и доказать генетическую изоляцию от популяции пчел подвида *A. m. intermissa* из Северной Африки и Португалии [51].

Высокая частота мутаций микросателлитных локусов иногда может привести к возникновению гомоплазии и нулевого аллеля, где в случае гомоплазии некоторые аллели могут характеризоваться сходными размерами при амплификации, а в случае нулевого аллеля амплификация может произойти без синтеза целевого продукта [42]. Однако такие явления достаточно редки, что практически не оказывает никакого влияния на конечный результат популяционно-генетических исследований.

Следовательно, микросателлитные маркеры достаточно информативны и сейчас активно используются в генетических исследованиях пчел. Изучение таксономической принадлежности пчел на основе вариабельности микросателлитных локусов может быть проведено только в лабораторных условиях, поскольку требует использования специальных реактивов и оборудования.

ОЦЕНКА ТАКСОНОМИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ СЕМЕЙ ПЧЕЛ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ДНК

Первые исследования генетической вариабельности подвидов медоносной пчелы, основанные на однонуклеотидном полиморфизме SNP, начались в 2000-х гг. В настоящее время исследования на основе SNP стали самыми распространенными и востребованными во всем мире [52]. SNP представляет собой однонуклеотидные позиции в геномной ДНК, в которых самая редкая

замена может встречаться с частотой не менее 1 %. SNP обычно возникают в результате точечных мутаций и замен (транзиций и трансверсий) со средней скоростью 10^{-8} – 10^{-9} замен на нуклеотид на поколение [53].

В генетических исследованиях пчел наибольшую ценность представляют SNP локусов ДНК, которые не кодируют белок и не вовлечены в процесс естественного отбора. Благодаря большому количеству и стабильной наследуемости в ряду поколений, SNP становятся эффективными маркерами для эволюционных реконструкций филогенетических взаимосвязей подвидов пчел и генетического картирования локусов количественных признаков [54].

Анализ SNP может быть проведен:

- 1) методами гибридизации (гибридизация аллель-специфическая и на микрочипах);
- 2) ферментативными методами (ПЦР-ПДРФ, ПЦР, метод удлинения праймеров, TaqMan-пробы, лигирование олигонуклеотидов, капиллярный электрофорез);
- 3) методами изучения конформационного полиморфизма ДНК (одноцепочечный конформационный полиморфизм (SSCP), электрофорез по градиенту температур (TGGE), жидкостная хроматография в денатурирующих условиях, масс-спектрометрия);
- 4) методами секвенирования ДНК (секвенирование по Сэнгеру, пиросеквенирование, ионное полупроводниковое секвенирование, секвенирование следующего поколения Illumina) [54].

Анализ SNP позволяет проводить оценку таксономической принадлежности семей пчел, выявить величину интрогрессии генов из других популяций, провести реконструкцию эволюции медоносной пчелы. Так, на основе анализа 1136 SNP 14 подвидов медоносной пчелы было подтверждено подразделение подвидов пчел на четыре эволюционные ветви А, М, С, О и показано, что медоносная пчела зародилась в Африке и далее распространилась в Евразию, как минимум три раза в Восточную и Западную Европу, и на Ближний Восток. В дальнейшем под воздействием последнего плейстоценового оледенения все рефугии пчел обособились в отдельные подвиды, близкие географически, но отдаленные генетически [9].

Исследования других авторов на основе анализа 8,3 млн SNP-маркеров 9 подвидов пчел также подтвердили дифференциацию подвидов на четыре эволюционные ветви — А, М, С, О, но не подтвердили африканского происхождения медоносной пчелы. По их данным, медоносная пчела возникла в Юго-Восточной Азии, как и все другие виды рода *Apis* [10].

Исследования на основе анализа 144 SNP-маркеров у 857 образцов пчел из Северной и Южной Америки, а также Африки подтвердили дифференциацию подвидов на четыре эволюционные ветви — А, М, С, О [11] и показали, что пчелы эволюционных ветвей А, М и С дивергировали 300 тыс. лет назад, а С и О дивергировали

ли 165 тыс. лет назад. Дифференциация пчел на подвиды внутри каждой из четырех эволюционных ветвей произошла предположительно от 13 до 38 тыс. лет назад [10].

Для идентификации европейских подвидов пчел был разработан набор из 1183 SNP. Из этого большого числа SNP был отобран набор сначала из 384, а позже из 96 SNP, использование которого на 92 % дешевле, а по информативности не уступает анализу с использованием полного набора из 1183 SNP. Далее авторами на основе полного набора из 1536 SNP были разработаны сокращенные наборы из 192, 144, 96 и 48 информативных SNP для идентификации таксономической принадлежности семей и оценки уровня интрогрессии «южных» подвидов пчел в странах Западной Европы [41].

На основе анализа 1536 SNP проведена идентификация семей темной лесной пчелы *A. m. mellifera* и определены уровни интрогрессии «южных» генов в популяциях стран Западной Европы, которые в обычных неохраняемых популяциях оказались равными 30 %, а в охраняемых заповедных — 8 %. [55]. В России, на Урале и в Поволжье, была проведена оценка таксономической принадлежности семей пчел и идентификация темной лесной пчелы (ветвь М) путем анализа 66 SNP локуса *ND2*, 36 SNP локуса *COI–COII* мтДНК и 26 SNP локуса *VG* яДНК [5, 56, 57].

Таким образом, SNP-маркеры могут служить инструментом для идентификации, контроля интродукции и селекции чистопородных семей пчел *A. m. mellifera*. Методы, основанные на анализе SNP, высокоинформативны при исследовании пчел, а их стоимость на сегодняшний день в мире постепенно снижается благодаря разработке минимальных высокоинформативных наборов SNP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В России распространены преимущественно три подвида пчел, из которых два южные (*A. m. caucasica* и *A. m. carpathica*) и один северный (*A. m. mellifera*). Поскольку Россия является северной страной с резко континентальным климатом, темная лесная пчела *A. m. mellifera* представляет большую ценность как уникальный подвид, способный к обитанию в условиях с продолжительными морозными зимами. Генофонд темной лесной пчелы в России подвержен угрозе исчезновения в результате гибридизации с интродуцированными южными подвидами. Точная идентификация таксономической принадлежности семей пчел дает возможность контролировать межрегиональные перемещения семей пчел, выявлять и сохранять резерваты чистопородного генофонда темной лесной пчелы. Существуют несколько методов идентификации подвидов пчел, которые можно подразделить на морфометрические, биохимические и генетические. Наиболее доступными являются морфометрические методы, а наиболее точными — генетические. Из генетических методов наибольшим потенци-

алом характеризуются подходы, основанные на анализе вариабельности микросателлитных локусов и сайтов одонуклеотидных замен. На данный момент анализ вариабельности микросателлитных локусов служит наиболее доступным и распространенным методом идентификации подвидов пчел в России. Методы идентификации подвидов пчел, основанные на анализе SNP, требуют использования более дорогостоящих реактивов и оборудования и на сегодняшний день в России пока не получили достаточно широкого распространения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бородачев А.В., Бородачева В.Т. Хозяйственная ценность межпородных помесей // Пчеловодство. — 1982. — № 9. — С. 13–15. [Borodachev AV, Borodacheva VT. Economic value of honeybee crossbreeds. *Russian Journal of Beekeeping "Pchelovodstvo"*. 1982;(9):13-15. (In Russ.)]
2. Jensen AB, Palmer KA, Boomsma JJ, Pedersen BV. Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology*. 2005;14(1):93-106. doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02399.x.
3. Ruttner F. Biogeography and Taxonomy of Honey bees. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 1988.
4. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Локальные популяции *Apis mellifera mellifera* L. на Урале // Генетика. — 2007. — Т. 43. — № 6. — С. 855–858. [Ilyasov RA, Petukhov AV, Poskryakov AV, Nikolenko AG. Local honeybee (*Apis mellifera mellifera* L.) populations in the Urals. *Russian Journal of Genetics*. 2007;43(6):709-711. (In Russ.)]. doi: 10.1134/S1022795407060166.
5. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Петухов А.В., Николенко А.Г. Новый подход к классификации митотипов темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* и иберийской пчелы *Apis mellifera iberiensis* // Генетика. — 2016. — Т. 52. — № 3. — С. 320–331. doi: 10.7868/S0016675816020053. [Ilyasov RA, Poskryakov AV, Petukhov AV, Nikolenko AG. New approach to the mitotype classification in black honeybee *Apis mellifera mellifera* and Iberian honeybee *Apis mellifera iberiensis*. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(3):281-291. (In Russ.)]. doi: 10.1134/S1022795416020058.
6. Franck P, Garnery L, Celebrano G, et al. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular Ecology*. 2000;9(7):907-21. doi: 10.1046/j.1365-294X.2000.00945.x.
7. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Митохондриальная ДНК в изучении популяций пчел на Урале // Материалы межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока. — Новосибирск, 2006. — С. 72–74. [Ilyasov R, Poskryakov A,

- Nikolenko AG. Mitochondrial DNA in the study of bee populations in the Urals. In Materials of interregional meeting of entomologists of Siberia and the Far East (conference proceedings). Novosibirsk; 2006. P. 72-74. (In Russ.)]
8. Smith DR. Mitochondrial DNA and honeybee biogeography. In: Smith DR, editor. Diversity in the genus *Apis*. Boulder, CO: Westview Press; 1991. P. 131-176.
 9. Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, et al. Thrice out of Africa: Ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*. 2006;314(5799):642-5. doi: 10.1126/science.1132772.
 10. Wallberg A, Han F, Wellhagen G. A worldwide survey of genome sequence variation provides insight into the evolutionary history of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature Genetics*. 2014;46:1081-1088.
 11. Harpur B, Chapman N, Krimus L, et al. Assessing patterns of admixture and ancestry in Canadian honey bees. *Insectes Sociaux*. 2015;62(4):479-489. doi: 10.1007/s00040-015-0427-1.
 12. Алпатов В.В. Породы медоносной пчелы и их использование в сельском хозяйстве. — М.: Московское общество испытателей природы, 1948. — 183 с. [Alpatov VV. Honeybee species and their use in agriculture. Moscow: Moscow Society of Naturalists; 1948. (In Russ.)]
 13. Бояршинов Б.Д., Коробов Н.В., Шураков А.И., и др. В Камском Приуралье // Пчеловодство. — 2001. — № 5. — С. 16–18. [Boyarshinov BD, Korobov NV, Shurakov AI, et al. In the Kama Pre-Urals. *Russian Journal of Beekeeping "Pchelovodstvo"*. 2001;(5):16-18. (In Russ.)]
 14. Сафиуллин Р.Р. Племенные ресурсы среднерусских пчел Республики Татарстан // Пчеловодство. — 2013. — № 3. — С. 8–9. [Safiullin RR. Tribal resources of the Dark forest bees of the Republic of Tatarstan. *Russian Journal of Beekeeping "Pchelovodstvo"*. 2013;(3):8-9. (In Russ.)]
 15. Саттаров В.Н., Туктаров В.Р., Борисов И.М., и др. Некоторые аспекты оценки морфометрических признаков медоносной пчелы // Пчеловодство. — 2010. — № 7. — С. 10–11. [Sattarov VN, Tuktarov VR, Borisov IM, et al. Some aspects of assessing the morphometric features of a honey bee. *Russian Journal of Beekeeping "Pchelovodstvo"*. 2010;(7):10-11. (In Russ.)]
 16. Колбина Л.М., Непейвода С.Н., Ильясов Р.А., и др. Использование морфологических и молекулярно-генетических методов для исследования *Apis mellifera* // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. — 2007. — Т. 2. — № 10. — С. 57–58. [Kolbina LM, Nepeivoda SN, Ilyasov RA, et al. The morphological and molecular genetic methods applied in the researching of *Apis mellifera*. *Agricultural Science of the Euro-North-East*. 2007;2(10):57-58. (In Russ.)]
 17. Bookstein FL. Morphometric Tools for Landmark Data, Geometry and Biology. NY, USA: Cambridge University Press; 1991.
 18. Kandemir I, Ozkan A, Fuchs S. Reevaluation of honeybee (*Apis mellifera*) microtaxonomy: A geometric morphometric approach. *Apidologie*. 2011;42(5):618-627. doi: 10.1007/s13592-011-0063-3.
 19. Miguel I, Baylac M, Iriando M, et al. Both geometric morphometric and microsatellite data consistently support the differentiation of the *Apis mellifera* M evolutionary branch. *Apidologie*. 2011;42(2):150-161. doi: 10.1051/apido/2010048.
 20. Янбаев Ю.А., Косарев М.Н., Бахтиярова Р.М., Николенько А.Г. Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия. — Уфа: БГУ, 2000. — 108 с. [Yanbaev YA, Kosarev MN, Bakhtiyarova RM, Nikolenko AG. Genetic aspects of conservation of biological diversity. Ufa: BSU; 2000. (In Russ.)]
 21. Талипов А.Н., Янбаев Ю.А., Юмагузин Ф.Г. Морфологическая и генетическая изменчивость пчелы медоносной (*Apis mellifera mellifera* L.) в Башкирском Зауралье. — Уфа: РИО Башкирского государственного университета, 2007. — 110 с. [Talipov AN, Yanbaev YA, Yumaguzhin FG. Morphological and genetic variability of the honey bee (*Apis mellifera mellifera* L.) in the Bashkir Post-Urals. Ufa: RIO of Bashkir State University; 2007. (In Russ.)]
 22. Smith DR, Glenn TC. Allozyme polymorphisms in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*. 1995;86(1):12-16.
 23. Sheppard WS, Berlocher SH. New allozyme variability in Italian honey bees. *Journal of Heredity*. 1985;76:45-8.
 24. Ivanova E, Staykova T, Petrov P. Allozyme variability in populations of local Bulgarian honey bee. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2010;24(2):371-4.
 25. Del Lama MA, Lobo JA, Soares AEE, Del Lama SN. Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized honey bee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie*. 1990;21:271-280.
 26. Cornuet JM, Piry S, Luikart G, et al. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*. 1999;153:1989-2000.
 27. Gartside DF. Similar allozyme polymorphism in honeybees (*Apis mellifera*) from different continents. *Experientia*. 1980;36:649-650.
 28. Lobo JA, Del Lama MA, Mestriner MA. Population differentiation and racial admixture in the Africanized honey bee (*Apis mellifera* L.). *Evolution*. 1989;43:794-802.
 29. Sylvester HA. Biochemical genetics. In: Rinderer T, editor. Bee genetics and breeding; Orlando, Florida: Academic Press.; 1986. P. 177-203.
 30. Ashokan KV. Molecular phylogenetic study on *Apis mellifera* subspecies inferred from cytochrome oxidase I. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 2011;1(4):193-202.

31. Arias MC, Sheppard WS. Phylogenetic relationships of honey bees (Hymenoptera: Apinae: Apini) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2005;37(1):25-35. doi: 10.1016/j.ympev.2005.02.017.
32. Garnery L, Franck P, Baudry E, et al. Genetic biodiversity of the West European honeybee (*Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera iberica*). II. Mitochondrial DNA. *Genetics, Selection and Evolution*. 1998;30:31-47.
33. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В., и др. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала // Генетика. — 1998. — Т. 34. — № 11. — С. 1574–1577. [Nikonorov IM, Ben'kovskaya GV, Poskryakov AV, et al. Use of a PCR method for controlling pure-breeding of honeybees *Apis mellifera mellifera* L. in the southern Urals. *Russian Journal of Genetics*. 1998;34(11):1574-1577. (In Russ.)]
34. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Radakovic M, Kovacevic SR. Biogeographic Study of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia Based on Mitochondrial DNA Analyses. *Russian Journal of Genetics*. 2010;46(5):603-9. doi: 10.1134/S1022795410050145.
35. Hall HG, Smith DR. Distinguishing African and European honey bee matrilineages using amplified mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88:4548-4552.
36. Nielsen DJ, Ebert PR, Page RE, et al. Improved polymerase chain reaction-based mitochondrial genotype assay for identification of the Africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Annals of Entomological Society of America*. 2000;93:1-6.
37. Crozier YC, Koulianos S, Crozier RH. An improved test for Africanized honeybee mitochondrial DNA. *Experientia*. 1991;47(9):968-969. doi: 10.1007/BF01929894.
38. Cánovas F, De la Rúa P, Serrano J, Galián J. Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2008;46(1):24-30. doi: 10.1111/j.1439-0469.2007.00435.x.
39. Clarke KE, Rinderer TE, Franck P, et al. The Africanization of honey bees (*Apis mellifera* L.) of the Yucatan: a study of a massive hybridization event across time. *Evolution*. 2002;56(7):1462-1474.
40. Collet T, Ferreira KM, Arias MC, et al. Genetic structure of Africanized honey bee populations (*Apis mellifera* L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI-COII patterns. *Heredity*. 2006;97:329-335. doi: 10.1038/sj.hdy.6800875.
41. Munoz I, Henriques D, Johnston JS, et al. Reduced SNP panels for genetic identification and introgression analysis in the dark honey bee (*Apis mellifera mellifera*). *PLoS ONE*. 2015;10(4): e0124365. doi: 10.1371/journal.pone.0124365.
42. Estoup A, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM. Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*. 1995;140:679-695.
43. Solignac M, Vautrin D, Pizzo A, et al. Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives. *Molecular Ecology Notes*. 2003;3(4):556-559. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00510.x.
44. 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. — Т. 51. — № 1. — С. 89–100. [Ostroverkhova NV, Konusova OL, Kucher AN, et al. Genetic diversity of the locus *COI-COII* of mitochondrial DNA in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) from the Tomsk region. *Russian Journal of Genetics*. 2015;51(1):80-90. (In Russ.)]. doi: 10.7868/S0016675815010105.
45. Форнара М.С. Характеристика аллелофонда и дифференциация пород и популяций медоносной пчелы с использованием микросателлитов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Дубровицы, 2012. — С. 19. [Fornara MS. Characteristics of allelefund and differentiation of breeds and populations of honey bees using microsatellites. [dissertation] Dubrovitsy: State University of the Russian Academy of Agricultural Sciences; 2012. P. 19. (In Russ.)]
46. Каскинова М.Д., Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенько А.Г. Анализ генетической структуры популяций медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) // Генетика. — 2015. — Т. 51. — № 10. — С. 1199–1202. [Kaskinova MD, Ilyasov RA, Poskryakov AV, Nikolenko AG. Analysis of the genetic structure of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations. *Russian Journal of Genetics*. 2015;51(10):1033-1035. (In Russ.)]. doi: 10.1134/S1022795415100075.
47. Зиновьева Н.А., Кривцов Н.И., Форнара М.С. Микросателлиты как инструмент для оценки динамики аллелофонда при создании приокского типа средне-русской породы медоносной пчелы *Apis mellifera* L. // Сельскохозяйственная биология. — 2011. — № 6. — С. 75–79. [Zinovieva NA, Krivtsov NI, Fornara MS. Microsatellites as a tool for assessing the dynamics of the allele fund when creating the Prioksky type of the Central Russian breed of honey bee *Apis mellifera* L. *Agricultural Biology*. 2011;(6):75-79. (In Russ.)]
48. Калашников А.Е. Изучение дифференциации отечественных популяций медоносной пчелы *Apis mellifera* и их инфицированности РНК-содержащими вирусами с помощью молекулярно-генетических методов: Ав-

- торейф. дис. ... канд. биол. наук. — Дубровицы, 2013. — С. 21. [Kalashnikov AE. Study of the differentiation of domestic populations of honey bee *Apis mellifera* and their infection with RNA-containing viruses using molecular genetic methods. [dissertation] Dubrovitsy: State University of the Russian Academy of Agricultural Sciences; 2013. P. 21. (In Russ.)]
49. Soland-Reckeweg G, Heckel G, Neumann P, et al. Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Conservation*. 2009;13:317-28. doi: 10.1007/s10841-008-9175-0.
50. Oleksa A, Chybicki I, Tofilski A, Burczyk J. Nuclear and mitochondrial patterns of introgression into native dark bees (*Apis mellifera mellifera*) in Poland. *Journal of Apicultural Research*. 2011;50(2):116-129. doi: 10.3896/IBRA.1.50.2.03.
51. De la Rúa P, Galián J, Pedersen BV, Serrano J. Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores. *Apidologie*. 2006;37:699-708.
52. Evans JD, Schwarz RS, Chen YP, et al. Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 2013;52(4):1-56. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.11.
53. Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology and Evolution*. 2003;18:249-256.
54. Sobrino B, Brion M, Carracedo A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*. 2005;154(2-3):181-194.
55. Pinto MA, Henriques D, Ch'avez-Galarza J, et al. Genetic integrity of the Dark European honey bee (*Apis mellifera mellifera*) from protected populations: a genome-wide assessment using SNPs and mtDNA sequence data. *Journal of Apicultural Research*. 2014;53(2):269-278. doi: 10.3896/IBRA.1.53.2.08.
56. Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Новые SNP маркеры в гене вителлогенина *VG* медоносной пчелы для идентификации *Apis mellifera mellifera* L. // Генетика. — 2015. — Т. 51. — № 2. — С. 194–199. doi: 10.7868/S0016675815020083. [Ilyasov RA, Poskryakov AV, Nikolenko AG. New SNP markers of the honeybee vitellogenin gene (*VG*) used for identification of subspecies *Apis mellifera mellifera* L. *Russian Journal of Genetics*. 2015;51(2):163-168. (In Russ.)]. doi: 10.1134/S1022795415020088.
57. Ильясов, Р. А. Поскряков А.В., Николенко А.Г. Семь генов митохондриального генома, позволяющие дифференцировать подвиды медоносной пчелы *Apis mellifera* // Генетика. — 2016. — Т. 52. — № 9. — С. 1–9. doi: 10.7868/S001667581609006X. [Ilyasov RA, Poskryakov AV, Nikolenko AG. Seven genes of mitochondrial genome enabling differentiation of honeybee subspecies *Apis mellifera*. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(10):1062-1070. (In Russ.)]. doi: 10.1134/S1022795416090064.

✿ Информация об авторах

Рустем Абузарович Ильясов — д-р биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии адаптивности насекомых. ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН, Уфа. E-mail: apismell@hotmail.com.

Александр Витальевич Поскряков — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии адаптивности насекомых. ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН, Уфа. E-mail: possash@yandex.ru.

Алексей Геннадьевич Николенко — д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией биохимии адаптивности насекомых. ФГБУН «Институт биохимии и генетики» Уфимского научного центра РАН, Уфа. E-mail: a-nikolenko@yandex.ru.

✿ Information about the authors

Rustem A. Ilyasov — Senior researcher, Laboratory of Insects' Biochemistry and Adaptiveness. Institute of Biochemistry and Genetics (IBG). Ufa, Russia. E-mail: apismell@hotmail.com.

Aleksandr V. Poskryakov — Senior researcher, Laboratory of Insects' Biochemistry and Adaptiveness. Institute of Biochemistry and Genetics (IBG). Ufa, Russia. E-mail: possash@yandex.ru.

Aleksei G. Nikolenko — Head of the laboratory, Laboratory of Insects' Biochemistry and Adaptiveness. Institute of Biochemistry and Genetics (IBG). Ufa, Russia. E-mail: a-nikolenko@yandex.ru.