


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

## Генетические методы в селекции медоносной пчелы

М.Д. Каскинова , А.М. Салихова, Л.Р. Гайфуллина, Е.С. Салтыкова

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

 kaskinovamilyausha@mail.ru

**Аннотация.** Медоносная пчела *Apis mellifera* является довольно сложным объектом для селекции в силу особенностей ее биологии. Селекционные мероприятия в пчеловодстве нацелены на получение семей пчел с высокими показателями хозяйственно полезных признаков, таких как продуктивность, устойчивость к низким температурам и заболеваниям, гигиеническое поведение, яйценоскость матки и др. На примере двух пасек, специализирующихся на разведении *A. m. mellifera* и *A. m. carnica*, рассмотрено применение генетических методов в селекции медоносной пчелы. Первым этапом работы было установление подвидовой принадлежности на основе оценки полиморфизма межгенного локуса мтДНК *tRNA<sup>leu</sup>-COII* и микросателлитных локусов ядерной ДНК Ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049 и A28. Подтверждено, что исследуемые семьи соответствуют заявленным подвидам. На пасеке с *A. m. mellifera* выявлены гибридные семьи. Метод, основанный на анализе полиморфизма локуса *tRNA<sup>leu</sup>-COII* (или *COI-COII*) и микросателлитных локусов ядерной ДНК, был разработан для идентификации темной лесной пчелы *A. m. mellifera* и не позволяет дифференцировать представителей эволюционных ветвей С (*A. m. carnica* и *A. m. ligustica*) и О (*A. m. caucasica*). На втором этапе оценивалось аллельное разнообразие гена *csd*. На пасеке, содержащей семьи *A. m. mellifera* ( $N = 15$ ), выявлено 20 аллелей *csd*, на пасеке, содержащей семьи *A. m. carnica* ( $N = 44$ ), – 41 аллель. Шесть аллелей были общими для двух пасек. ДНК-диагностика заболеваний пчелы показала, что исследуемые семьи являются здоровыми. По результатам исследований разработана схема получения первичного материала для селекции медоносной пчелы, на который впоследствии может быть наложен отбор по хозяйственно полезным признакам. Кроме того, ежегодная оценка аллельного разнообразия гена *csd* позволит пролить свет на частоту формирования новых аллельных вариантов и другие вопросы, связанные с эволюцией этого гена.


Ключевые слова: медоносная пчела; *Apis mellifera*; локус *tRNA<sup>leu</sup>-COII*; микросателлиты; ген *csd*; болезни пчел.

**Для цитирования:** Каскинова М.Д., Салихова А.М., Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е.С. Генетические методы в селекции медоносной пчелы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;27(4):366-372. DOI 10.18699/VJGB-23-44

## Genetic methods in honey bee breeding

M.D. Kaskinova , A.M. Salikhova, L.R. Gaifullina, E.S. Saltykova

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

 kaskinovamilyausha@mail.ru

**Abstract.** The honey bee *Apis mellifera* is a rather difficult object for selection due to the peculiarities of its biology. Breeding activities in beekeeping are aimed at obtaining bee colonies with high rates of economically useful traits, such as productivity, resistance to low temperatures and diseases, hygienic behavior, oviposition of the queen, etc. With two apiaries specializing in the breeding of *A. m. mellifera* and *A. m. carnica* as examples, the application of genetic methods in the selection of honey bees is considered. The first stage of the work was subspecies identification based on the analysis of the polymorphism of the intergenic mtDNA locus *tRNA<sup>leu</sup>-COII* (or *COI-COII*) and microsatellite nuclear DNA loci Ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28. This analysis confirmed that the studied colonies correspond to the declared subspecies. In the apiary with *A. m. mellifera*, hybrid colonies have been identified. A method based on the analysis of polymorphisms of the *tRNA<sup>leu</sup>-COII* locus and microsatellite nuclear DNA loci has been developed to identify the dark forest bee *A. m. mellifera* and does not allow one to differentiate subspecies from С (*A. m. carnica* and *A. m. ligustica*) and О (*A. m. caucasica*) evolutionary lineages from each other. The second stage was the assessment of the allelic diversity of the *csd* gene. In the apiary containing colonies of *A. m. mellifera* ( $N = 15$ ), 20 *csd* alleles were identified. In the apiary containing colonies of *A. m. carnica* ( $N = 44$ ), 41 alleles were identified. Six alleles are shared by both apiaries. DNA diagnostics of bee diseases showed that the studied colonies are healthy. Based on the data obtained, a scheme was developed for obtaining primary material for honey bee breeding, which can subsequently be subjected to selection according to economically useful traits. In addition, the annual assessment of the allelic diversity of the *csd* gene will shed light on the frequency of formation of new allelic variants and other issues related to the evolution of this gene.

Key words: *Apis mellifera*; *tRNA<sup>leu</sup>-COII* locus; microsatellites; *csd* gene; bee diseases.

**For citation:** Kaskinova M.D., Salikhova A.M., Gaifullina L.R., Saltykova E.S. Genetic methods in honey bee breeding. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(4):366-372. DOI 10.18699/VJGB-23-44

## Введение

В 1996 г. в лаборатории биохимии адаптивности насекомых Института биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН под руководством профессора А.Г. Николенко были инициированы исследования медоносной пчелы (Никоноров и др., 1998; Николенко, Поскрязков, 2002). Выбор объекта не случаен: в Республике Башкортостан (РБ) остался наиболее обширный ареал обитания темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera*. Этот подвид является аборигенным на территории России и принадлежит к эволюционной ветви М.

Всего на основе морфометрических (Ruttner, 1988) и генетических (De La Rúa et al., 2009; Meixner et al., 2013; Cridland et al., 2017) данных выделены четыре эволюционные ветви для медоносной пчелы: М (подвиды пчел запада Средиземноморья и Северо-Западной Европы *A. m. mellifera* и *A. m. iberiensis*), А (подвиды из Африки *A. m. scutellata*, *A. m. sahariensis* и др.), С (подвиды из Юго-Восточной Европы *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* и др.) и О (подвиды из Ближнего Востока и Западной Азии *A. m. caucasica*, *A. m. anatolica* и др.). Импорт пчелосемей других подвидов, в частности *A. m. caucasica* и *A. m. carnica*, привел к массовой гибридизации и потере местной популяции медоносных пчел на большей части России. Для сохранения оставшихся разрозненных локальных популяций *A. m. mellifera* была поставлена цель научиться различать подвиды пчел. На вооружение был принят метод, разработанный L. Garnery с коллегами (Garnery et al., 1998), который заключается в оценке гаплотипического разнообразия межгенного локуса *tRNA<sup>Leu</sup>-COII* митохондриальной ДНК. Поскольку митохондриальная ДНК наследуется только по материнской линии, с помощью данного метода невозможно оценить влияние трутневого фона и выявить гибридные семьи, поэтому работы по поиску новых информативных генетических маркеров были продолжены.

Чтобы установить уровень гибридизации семей, в лаборатории был адаптирован метод, основанный на анализе генетической структуры популяций пчел с помощью микросателлитных локусов (Solognac et al., 2003). Из 36 микросателлитных локусов были отобраны локусы, которые проявили наибольшую дифференцирующую способность для референсных выборок *A. m. mellifera*, *A. m. caucasica* и *A. m. carnica*, отобранных в ареалах их естественного обитания на территории России (Ильясов и др., 2007; Каскинова и др., 2022). Набор из девяти микросателлитных локусов позволил дифференцировать подвид *A. m. mellifera* от *A. m. caucasica* и *A. m. carnica*, но не последние два подвида друг от друга. С помощью данного метода обнаружены сохранившиеся популяции *A. m. mellifera* на территории РБ и частично в других регионах России (Ильясов и др., 2007; Каскинова и др., 2022).

Параллельно шли работы по постановке методов ДНК-диагностики заболеваний медоносной пчелы. В 2015 г. начались исследования по оценке аллельного разнообразия пол-определяющего гена *csd* (*complementary sex determiner*) медоносной пчелы (Каскинова и др., 2019). Эти исследования были инициированы в ответ на проблему пестрого расплода (неравномерное распределение ячеек с расплодом по сотам), с которым столкнулись пчеловоды-селекционеры, использующие инструментальное осе-

менение и закрытый тип разведения. Пестрый расплод может быть обусловлен заболеваниями расплода и инбридингом. Первую причину нам удалось исключить по результатам ПЦР-диагностики заболеваний. Чтобы оценить влияние инбридинга, мы провели анализ аллельного разнообразия пол-определяющего гена *csd*. Низкое аллельное разнообразие *csd* приводит к появлению большого количества диплоидных трутней, которые уничтожаются рабочими пчелами, что становится причиной такого явления, как генетический пестрый расплод (Beye et al., 2003; Zareba et al., 2017; Mroczek et al., 2022). Генетический пестрый расплод чаще встречается на пасеках с закрытым типом разведения (изолированная пасека). Мы проанализировали аллельное разнообразие гена *csd* на отцовских пасеках и установили, какие семьи лучше использовать для инструментального осеменения маток.

Все перечисленные методы нашли применение в практическом пчеловодстве и в комплексе могут быть использованы для селекции медоносной пчелы. На основе результатов более чем 20-летних исследований мы разработали схему получения первичного материала для селекции медоносной пчелы. Данная схема включает следующие пункты: 1) установление подвидовой принадлежности; 2) оценка аллельного разнообразия гена *csd*; 3) оценка состояния здоровья пчелиной семьи на основе ДНК-диагностики заболеваний пчелы. На примере двух пасек, специализирующихся на разведении *A. m. mellifera* и *A. m. carnica*, рассмотрим применение генетических методов селекции медоносной пчелы.

## Материалы и методы

**Отбор проб.** В исследовании участвовали две племенные пасеки. На первой пасеке (далее пасека 1) из Иглинского района Республики Башкортостан (РБ), специализирующейся на разведении *A. m. mellifera*, были отобраны рабочие пчелы и трутни из 15 семей. На этой пасеке используются инструментальное осеменение и отцовские семьи разного происхождения. На второй пасеке (2) из Чишминского района РБ отобраны рабочие пчелы и трутни, принадлежащие подвиду *A. m. carnica*, из 44 семей. Контроль размножения на данной пасеке отсутствует, но ежегодно ввозятся новые матки для поддержания генетического разнообразия семей. Для анализа подвидовой принадлежности использовались рабочие пчелы (три рабочие пчелы с семьи), поскольку они дают более полную информацию о генотипе семьи. Все пчелы были собраны внутри улья с расплодных рамок.

**Установление подвидовой принадлежности.** ДНК выделяли из мышц торакса рабочих пчел при помощи набора ДНК-Экстран-2 (ООО «Синтол», Москва). Для установления подвидовой принадлежности использовали анализ межгенного локуса *tRNA<sup>Leu</sup>-COII* мтДНК и девять микросателлитных локусов яДНК (Ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28). Последовательности праймеров представлены в табл. 1. Смесь ПЦР на 10 образцов общим объемом 150 мкл включала 120 мкл дистиллированной воды, 15 мкл магниевого буфера, 3 мкл смеси DNTP (концентрация 10 мкмоль каждого), по 5 мкл F- и R-праймера (концентрация 10 пмоль/мкл) и 3 мкл Taq-полимеразы (компоненты ПЦР-смеси произ-

**Таблица 1.** Последовательность праймеров для анализа подвидовой принадлежности *Apis mellifera*

№ п/п	Локус	Последовательность праймера
1	<i>tRNA<sup>Leu</sup>-COII</i>	F-GGCAGAATAAGTGCATTG R-CAATATCATTGATGACC
2	4a110	F-CGCTCGGGTGGATTTCATTT R-GGCAAAAGTGGCGGAGAAAGA
3	A43	F-CACCGAAACAAGATGCAAG R-CCGCTCATTAAGATATCCG
4	A113	F-CTCGAATCGTGGCGTCC R-CCTGTATTTTGAACCTCGC
5	A88	F-CGAATTAACCGATTTGTCTG R-GATCGCAATTATTGAAGGAG
6	Ap049	F-CCAATAGCGCGAGTGTG R-GGGCTTCGTACGTCCACC
7	A28	F-GAAGAGCGTTGGTTGCAGG R-GCCGTTTCATGTTACCACG
8	Ap243	F-AATGTCCGCGAGCATCTG R-TGTTTACGAGAATTCGACGGG
9	A24	F-CACAAGTTCCAACAATGC R-CACATTGAGGATGAGCG
10	A8	F-CGAAGGTAAGGTAATGGAAC R-GGCGGTTAAAGTTCTGG

водства ООО «Синтол»). Режим ПЦР: 3 мин при 94 °С, затем 30 циклов с денатурацией 30 с при 94 °С, отжигом 30 с при 49 °С (для локуса *tRNA<sup>Leu</sup>-COII*) и 55 °С (для микросателлитных локусов), элонгацией 60 с при 72 °С и конечной элонгацией 3 мин при 72 °С. Для визуализации продуктов амплификации использовали электрофорез в 8 % полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей детекцией в фотосистеме Gel Doc™ XR+ (BioRad, США).

В качестве референсной группы эволюционной ветви М были взяты выборки *A. m. mellifera* из Бурзянского района РБ и Пермского края ( $N = 136$ ), в качестве представителей эволюционной ветви С/О – выборки из Республики Адыгея, Краснодарского края и Узбекистана ( $N = 120$ ).

Кластерный анализ данных осуществлен в ПО Structure 2.3.4 на основе модели Admixture с Burnin Period и MCMC, равными 10000 и 100000 соответственно. Число кластеров задано от 1 до 10. Предполагаемое число кластеров рассчитывали в онлайн-сервисе Structure Harvester (Earl, von Holdt, 2012). Полученные в Structure результаты обрабатывали в CLUMPP 1.1.2 с помощью алгоритма FullSearch.

**Оценка аллельного разнообразия гена *csd*.** ДНК выделяли из мышц торакса трутней с использованием набора ДНК-Экстран-2 (ООО «Синтол», Москва). Праймеры F-GGGAGAGAAGTTGCAGTAGAG и R-TTGATGCGTAGGTTCCAAATCC были использованы для амплификации последовательностей 6–8 экзонов гена *csd* (Каскинова и др., 2019). Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) амплификатов гена *csd* выполнено в фирме ООО «Синтол» с вышеуказанными праймерами. Полученные нуклеотидные последовательности отредактированы в Chromas v. 2.22 и выровнены с помощью ClustalW в MEGA v6.0. Выравнивание производили на референсную последовательность (NCBI Reference Sequence: NC\_007072.3). Экзоны определяли при помощи BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последовательности нуклеотидов были загружены в Genbank и доступны под номерами KY502199–KY502249 и MK531891–MK531969.

**ДНК-диагностика заболеваний медоносной пчелы.** Выполнена ДНК-диагностика наиболее распространенных патогенов медоносной пчелы (табл. 2): гриба *Ascosphaera apis*, вызывающего аскофероз (AscoA); микроспоридий *Nosema/Vairimorpha apis* (NosA) и *Nosema/Vairimorpha ceranae* (NosC), вызывающих нозематоз типа А и С соответственно; бактерий *Paenibacillus larvae* (AFB) и *Melissococcus plutonius* (EFB), вызывающих гнильцовые заболевания расплода. Также была выполнена ПЦР-диагностика пчел на наличие вирусных заболеваний: вируса мешотчатого расплода (SBV), вируса черных маточников (BQCV), вируса деформации крыла (DWV), кашмирского вируса (KBV), вируса острого паралича (ABPV), вируса хронического паралича (CBPV) (список праймеров см. в табл. 2). В качестве положительного контроля использовали образцы ДНК больных пчел и синтетические фрагменты ДНК, полностью совпадающие с ожидаемым продуктом ПЦР.

Выделение ДНК проводили из среднего кишечника рабочих пчел (10 рабочих пчел с каждой семьи) с использованием набора ДНК-Экстран-2. Смесь ПЦР на 10 образцов общим объемом 150 мкл включала 120 мкл дистиллированной воды, 15 мкл магниевого буфера, смесь DNTP 10 мкмоль по 3 мкл, по 5 мкл F- и R-праймера (концентрация 10 пмоль/мкл) и 3 мкл Taq-полимеразы. Режим ПЦР: 5 мин при 94 °С, затем 30 циклов с денатурацией 30 с при 94 °С, отжигом 30 с при 50 °С, элонгацией 60 с при 72 °С и конечной элонгацией в течение 7 мин при 72 °С. Продукты амплификации визуализировали в 8 % ПААГ.

Для диагностики вирусов медоносной пчелы выделяли РНК из мышц торакса живых пчел (из одной семьи по 20 замороженных в жидком азоте пчел с учетом двух повторностей) с помощью тризола (Thermo FS). Для синтеза кДНК использовали набор для ОТ-ПЦР (ООО «Синтол»). Полученную кДНК применили для дальнейшей ПЦР.

**Результаты и обсуждение**

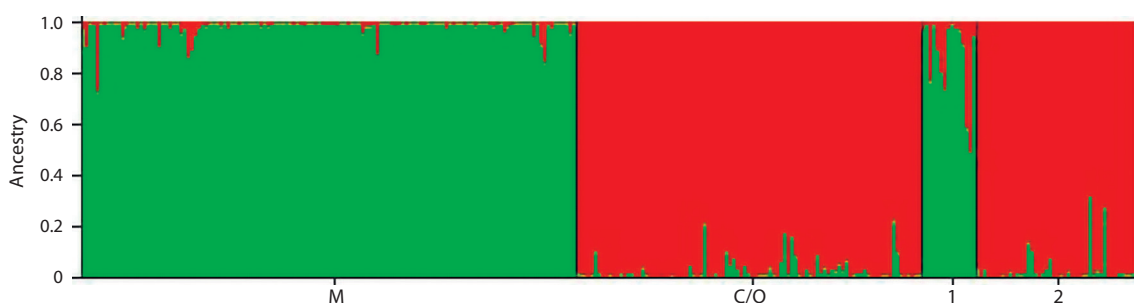
**Установление подвидовой принадлежности**

С помощью оценки полиморфизма межгенного локуса *tRNA<sup>Leu</sup>-COII* мтДНК и девяти микросателлитных локусов мы проанализировали генетическую структуру исследуемых выборок.

Межгенный локус *tRNA<sup>Leu</sup>-COII* мтДНК – один из простых и надежных маркеров для дифференциации эволюционных ветвей М и С/О. Аллельные варианты P(Q)<sub>1–n</sub> являются маркерами происхождения пчел от *A. m. mellifera*, вариант Q – от подвидов из эволюционной ветви С и О по материнской линии. P и Q представляют собой

**Таблица 2.** Праймеры для ДНК-диагностики заболеваний медоносной пчелы

Праймер	Последовательность 5'→3'	Размер фрагмента, п. н.	Литературный источник
F-AFB	GCAAGTCGAGCGACCTTGT	237	Bakonyi et al., 2003
R-AFB	GCATCGTCGCCTTGGTAAGC		
F-EFB	GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC	831	Govan et al., 1998
R-EFB	TTATCTCTAAGGCGTTCAAAGG		
F-NosA	GCATGTCTTTGACGTACTATGTA	312	Espregueira Themudo et al., 2020
R-NosA	CGTTTAAATGTGAAACAACATATG		
F-NosC	CGACGATGTGATATGAAAATATTA	218	
R-NosC	TCATTCTCAAACAAAAACCG		
F-AscoA	GCACTCCCACCTTGTCTA	550	James, Skinner, 2005
R-AscoA	CCCACTAGAAGTAAATGATGGTTA		
F-SBV	ACCAACCGATTCCCTCAGTAG	468–469	Berényi et al., 2006
R-SBV	CCTTGGAACTCTGCTGTGTA		
F-BQCV	AGTAGTTGCGATGTACTTCC	471	
R-BQCV	CTTAGTCTTACTCGCCACTT		
F-DWV	ATTGTGCAAGATTGGACTAC	433	
R-DWV	AGATGCAATGGAGGATACAG		
F-KBV	GATGAACGTGACCTATTGA	414	
R-KBV	TGTGGGTTGGCTATGAGTCA		
F-ABPV	GTGCTATCTTGAATACTAC	618	
R-ABPV	AAGGYTTAGGTTCTACTACT		
F-CBPV	TGTCGAACTGAGGATCTTAC	315	
R-CBPV	GACCTGATTAACGACGTTAG		



**Рис. 1.** Генетическая структура исследуемых выборок при K = 2.

M – референсная выборка из эволюционной ветви M; C/O – референсная выборка из эволюционной ветви C/O; 1 и 2 – выборки с пасек 1 и 2 соответственно.

условное обозначение некодирующих повторов, располагающихся между генами *tRNA<sup>Leu</sup>* и *COII*. При этом у подвидов из эволюционных ветвей С и О отсутствует повтор Р (Bertrand et al., 2015). Анализ локуса *tRNA<sup>Leu</sup>-COII* подтвердил, что исследуемые семьи соответствуют заявленным эволюционным ветвям. Четырнадцать из 15 семей на пасеке 1 имели аллельный вариант PQQ, в одной семье был выявлен вариант PQQQ. Все семьи с пасеки 2 имели аллельный вариант Q.

Результаты кластерного анализа представлены на рис. 1. Показано, что общая выборка состоит из двух основных кластеров (K = 2, deltaK = 2554.6). Первый кластер представлен темной лесной пчелой, в состав второго входят подвиды из эволюционной ветви С (*A. m. carnica*) и

О (*A. m. caucasica*). Семьи с пасеки 1 вошли в общий кластер с пчелами из референсной выборки М (т. е. подвид *A. m. mellifera* из эволюционной ветви М). При этом в двух семьях отмечается интрогрессия генофонда C/O. Семьи с пасеки 2 формируют общий кластер с референсной выборкой C/O.

Данный метод был разработан для идентификации темной лесной пчелы *A. m. mellifera* и не позволяет дифференцировать друг от друга представителей эволюционных ветвей С и О. Поэтому мы можем сказать, что семьи на пасеке 1 относятся к подвиду *A. m. mellifera*. Часть семей оказались гибридными, и было рекомендовано выполнить мероприятия по замене маток. На пасеке 2 также были выявлены гибридные семьи (доля кластера М > 15 %).

**Таблица 3.** Сводная таблица по аллелям гена *csd* в исследуемых выборках

Пасека	Число семей	Число аллелей	Число редких аллелей	Genbank ID
Пасека 1	15	20	13	KY502199–KY502248
Пасека 2	44	41	22	KY502249, MK531891–MK531969

Проблема подвидовой идентификации медоносной пчелы возникла в связи с неконтролируемой перевозкой пчелосемей и развитием пакетного пчеловодства. Если дифференциация подвидов из эволюционных ветвей М и С/О является решенным вопросом и используется для поиска аборигенных популяций (Николенко, Поскряков, 2002; Ильясов и др., 2007), то дифференциация подвидов, принадлежащих одной эволюционной ветви, остается актуальной.

### Оценка аллельного разнообразия гена *csd*

Определение аллельного разнообразия пол-определяющего гена – одна из основных задач современной селекционной программы (Nyink et al., 2013). Содержание пчел в условиях закрытого разведения чревато накоплением общих аллелей гена *csd* и, следовательно, приводит к производству большого количества диплоидных трутней, выбраковке их рабочими пчелами и к снижению силы семьи.

На пасеке 1 было выявлено 20 аллелей *csd*, описанных нами ранее (Каскинова и др., 2019), на пасеке 2 – 41 аллель. Шесть аллелей являются общими для двух пасек. Почти половина аллелей редкие, т.е. встречаются один раз (табл. 3).

На пасеке 1 общие аллели выявлены в семи семьях (семьи 2 и 7; 5 и 9; 5, 8 и 14, см. Приложение 1)<sup>1</sup>. Остальные аллели являются редкими. Чтобы избежать появления диплоидных трутней, было рекомендовано не использовать совместно сперму трутней из семей с одинаковыми аллелями гена *csd* при искусственном осеменении маток. На пасеке 2 почти половина аллелей редкие. Аллель 3 *csd* (Приложение 2) обнаружен в девяти семьях, аллель 6 – в восьми. Общие аллели выявлены у сестринских семей, происходящих от одной материнской семьи.

Таким образом, мы установили, что девять семей с пасеки 1 принадлежат к подвиду *A. m. mellifera* и имеют высокое аллельное разнообразие гена *csd*, а следовательно, рекомендуются для дальнейшего разведения в качестве отцовских (см. Приложение 1). На пасеке 2, в отличие от пасеки 1, не применяется искусственное осеменение маток. Поскольку семьи данной пасеки имеют однородную генетическую структуру, семьи с одинаковыми аллелями можно использовать в качестве воспитательниц или провести в них замену матки (см. Приложение 2). Такие семьи лучше использовать для производства медовой продукции и не допускать трутней к размножению путем установки трутневых решеток.

### Оценка здоровья пчелиных семей

ПЦР-анализ показал, что исследуемые семьи являются здоровыми. К сожалению, такие здоровые пасеки скорее исключение, чем правило. Печальной тенденцией в по-

следнее время стало большое количество пасек, страдающих от нозематоза (наши данные, не опубликовано). Медоносная пчела *A. mellifera* стала мишенью опасного инвазивного вида микроспоридии *Nosema/Vairimorpha ceranae* (Martín-Hernández et al., 2007; Tokarev et al., 2020), изначальным хозяином которого является азиатская пчела *Apis cerana*. Если раньше споры и ДНК этого патогена обнаруживали крайне редко, то теперь их находят почти на каждой второй пасеке. Болезнь не имеет ярко выраженной симптоматики, и пчеловоды обращаются за помощью только тогда, когда семьи начинают погибать или уже погибли. За все время работы лаборатории нами были выявлены семьи, пораженные нозематозом, аскосферозом, европейским гнильцом и такими вирусными заболеваниями, как вирус мешотчатого расплода (SBV), вирус деформации крыла (DWV) и вирус черных маточников (BQCV). Как правило, большинство таких семей были импортированы из других стран и принадлежат к эволюционным ветвям С или О.

### Схема получения первичного материала для селекции

Селекция медоносной пчелы направлена на получение семей пчел с высокими показателями хозяйственно полезных признаков (ХПП), таких как продуктивность, устойчивость к низким температурам и заболеваниям, гигиеническое поведение, яйценоскость матки и др. (Ruttner, 1988). Медоносная пчела – довольно сложный объект для селекции в силу особенностей ее биологии. Комплементарное определение пола, при котором пол зависит от аллельной комбинации гена *complementary sex determiner (csd)*, усиливает последствия инбридинга, а полиандрия маток усложняет подбор родительских пар и контроль размножения. Кроме того, отбор ведется не на индивидуальном уровне, а на уровне пчелиной семьи. В связи с этим возникла необходимость в разработке метода, который бы объединил оценку ХПП и генетического потенциала пчелиных семей. Оценка ХПП полностью зависит от пчеловодов, тогда как результатом нашего исследования стал метод отбора первичного материала для селекции по ХПП.

Согласно (Ruttner, 1988), основополагающим принципом селекционной работы с пчелами является так называемое чистопородное разведение. На основе этого принципа нами разработана схема получения первичного материала для селекции.

Первым этапом селекционной работы является отбор семей из исходной популяции пчел, принадлежащих одному подвиду. В гибридных семьях необходимо провести мероприятия по замене маток. Кроме того, отобранные семьи рекомендуется проверить на наличие заболеваний.

Второй этап – отбор семей по ХПП. Отобранные семьи рекомендуется разместить на пасеке, отдаленной от других семей из исходной популяции, во избежание не-

<sup>1</sup> Приложения 1 и 2 см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2023-27/appx14.pdf>

желательного скрещивания. Желательно создать несколько таких пасек для дальнейшего разведения. Этот этап необязателен, если целью является восстановление генофонда *A. m. mellifera*.

На третьем этапе производится анализ аллельного разнообразия гена *csd* в семьях, отобранных для селекции. На основе данных по аллельному составу гена *csd* формируются отцовские и материнские семьи; они должны иметь разные аллели *csd*. В качестве материнских рекомендуется использовать семьи, которые имеют часто встречающиеся аллели *csd*. Отцовские семьи лучше формировать из числа тех семей, что имеют редкие аллели.

На четвертом этапе производится оценка потомства на ХПП. Отбор по селективируемому признаку (признакам) необходимо проводить в каждом поколении.

Такая схема селекции позволит получить линии пчел с высокими показателями продуктивности (рис. 2). Кроме того, ежегодная оценка аллельного разнообразия гена *csd* на одной пасеке позволит пролить свет на частоту формирования новых аллельных вариантов и другие вопросы, связанные с эволюцией этого гена.

Анализ полиморфизма пол-определяющего гена в исследуемых выборках *A. mellifera* в целом показал, что их аллельное разнообразие соответствует ранее полученным показателям для других популяций (Hyink et al., 2013; Zareba et al., 2017). Большинство пчелиных семей, обитающих в условиях племенной пасеки, имеют много общих аллелей. Со временем это может привести к появлению диплоидных трутней. Поэтому рекомендуется проведение мероприятий, препятствующих использованию трутней с одинаковыми аллелями гена *csd*. При этом важно, чтобы аллели *csd* трутней не совпадали с аллелями матки.

## Заключение

Представлены результаты более чем 20-летних исследований, направленных на поиск и сохранение аборигенной популяции темной лесной пчелы *A. m. mellifera*. За это время были разработаны методы определения подвидовой принадлежности *A. m. mellifera*, ДНК-диагностики заболеваний и оценки аллельного разнообразия гена *csd*. Данные методы апробированы на двух пасеках, где содержатся разные подвиды пчел и используются разные методы контроля размножения. С помощью генетических методов стало возможным получить первичный материал для селекции пчел, на который впоследствии может быть наложен отбор по хозяйственно полезным признакам.

Поиск сохранившихся аборигенных (или локальных) популяций – это лишь первый шаг в их сохранении. Дальнейшие мероприятия полностью зависят от пчеловодов: будут ли они применять полученные данные на практике, или оставят всё как есть. Положительная обратная связь нами получена от пчеловодов из Янаульского, Бурзянского и Иглинского районов РБ, а также от пчеловодов Алтайского края, Белгородской области и некоторых других регионов Российской Федерации. Благодаря инициативе пчеловодов удалось улучшить ситуацию даже в умеренно-гибридной популяции *A. m. mellifera* в Иглинском районе РБ (Каскинова и др., 2022).

Без заинтересованности пчеловодов в сохранении аборигенных подвидов (будь то темная лесная *A. m. mellifera*,

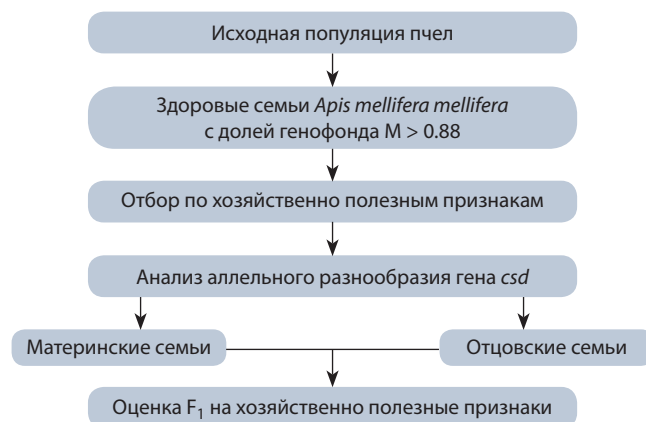


Рис. 2. Схема селекции медоносной пчелы *Apis mellifera mellifera* с применением информации о подвидовой принадлежности и аллельном разнообразии гена *csd*.

краинская *A. m. carnica*, серая горная кавказская *A. m. caucasica* или любой другой подвид) результаты мониторинга подвидовой принадлежности пчел важны только для фундаментальной науки. Так, на основе географического распределения данных мониторинга бурзянской популяции *A. m. mellifera* были выделены центральная, периферическая и гибридная зоны ареала, а также определены основные направления интрогрессии подвидов их эволюционных ветвей С/О (Николенко и др., 2010). Последующий анализ пчел по всей территории РБ показал, что подобная подразделенность популяции медоносной пчелы наблюдается и в других сохранившихся популяциях *A. m. mellifera* – татышлинской и янаульской.

Медоносная пчела – очень ценный и хрупкий объект нашей экосистемы. По всему миру наблюдается сокращение ее численности вследствие бесконтрольного применения пестицидов и инсектицидов, гибридизации, распространения болезней (Neumann, Carreck, 2010; Espregueira Themudo et al., 2020). Вмешательство человека в процесс ее естественного расселения практически свел на нет тот адаптивный потенциал, что был выработан миллионами лет эволюции. На наш взгляд, необходимо сохранить и по возможности восстановить те популяции медоносной пчелы, что еще остались.

Посвящается светлой памяти наших коллег Алексея Геннадьевича Николенко и Александра Витальевича Поскрякова.

## Список литературы / References

- Ильясов Р.А., Петухов А.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Локальные популяции *Apis mellifera mellifera* L. на Урале. *Генетика*. 2007;43(6):855-858.  
[Il'yasov R.A., Petukhov A.V., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Local honeybee (*Apis mellifera mellifera* L.) populations in the Urals. *Russ. J. Genet.* 2007;43(6):709-711. DOI 10.1134/S1022795407060166.]
- Каскинова М.Д., Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е.С., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Динамика генетической структуры популяций медоносной пчелы *Apis mellifera* на Южном Урале. *Генетика*. 2022;58(1):45-51. DOI 10.31857/S0016675822010040.  
[Kaskinova M.D., Gaifullina L.R., Saltykova E.S., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Dynamics of the genetic structure of *Apis mellifera*

- populations in the Southern Urals. *Russ. J. Genet.* 2022;58(1):36-41. DOI 10.1134/S1022795422010045.]
- Каскинова М.Д., Гатауллин А.Р., Салтыкова Е.С., Гаифуллина Л.Р., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Полиморфизм гипервариабельного участка гена *csd* в популяции *Apis mellifera* L. на Южном Урале. *Генетика.* 2019;55(2):239-242. DOI 10.1134/S0016675819020097.
- [Kaskinova M.D., Gataullin A.R., Saltykova E.S., Gaifullina L.R., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G. Polymorphism of the hypervariable region of the *csd* gene in the *Apis mellifera* L. population in Southern Urals. *Russ. J. Genet.* 2019;55(2):267-270. DOI 10.1134/S102279541902008X.]
- Николенко А.Г., Поскряков А.В. Полиморфизм локуса *COI-COII* митохондриальной ДНК медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на Южном Урале. *Генетика.* 2002;38(4):458-462.
- [Nikolenko A.G., Poskryakov A.V. Polymorphism of locus *COI-COII* of mitochondrial DNA in the honey bee *Apis mellifera* L. from the Southern Ural region. *Russ. J. Genet.* 2002;38(4):364-368. DOI 10.1023/A:1015289900666.]
- Николенко А.Г., Фахретдинова С.А., Ильясов Р.А., Поскряков А.В. Ареал бурзянской популяции темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Труды Рус. энтомол. о-ва.* 2010;81(2):202-208.
- [Nikolenko A.G., Fakhretdinova S.A., Ilyasov R.A., Poskryakov A.V. The geographic range of the Burzyan population of the European dark honeybee *Apis mellifera mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Trudy Russkogo Entomologicheskogo Obshchestva = Proceedings of the Russian Entomological Society.* 2010;81(2):202-208. (in Russian)]
- Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В., Николенко А.Г., Вахитов В.А. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала. *Генетика.* 1998;34(11):1574-1577.
- [Nikonov I.M., Ben'kovskaya G.V., Poskryakov A.V., Nikolenko A.G., Vakhitov V.A. The use of the PCR technique for control of pure-breeding of honeybee (*Apis mellifera mellifera* L.) colonies from the Southern Urals. *Russ. J. Genet.* 1998;34(11):1344-1347.]
- Bakonyi T., Derakhshifar I., Grabensteiner E., Nowotny N. Development and evaluation of PCR assays for the detection of *Paenibacillus larvae* in honey samples: comparison with isolation and biochemical characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69(3):1504-1510. DOI 10.1128/AEM.69.3.1504-1510.2003.
- Berényi O., Bakonyi T., Derakhshifar I., Köglberger H., Nowotny N. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006;72(4):2414-2420. DOI 10.1128/AEM.72.4.2414-2420.2006.
- Bertrand B., Alburaki M., Legout H., Moulin S., Mougél F., Garnery L. 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;15(3):673-683. DOI 10.1111/1755-0998.12339.
- Beye M., Hasselmann M., Fondrk M., Page R.E., Omholt S.W. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell.* 2003;114(4):419-429. DOI 10.1016/S0092-8674(03)00606-8.
- Cridland J.M., Tsutsui N.D., Ramirez S.R. The complex demographic history and evolutionary origin of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Biol. Evol.* 2017;9(2):457-472. DOI 10.1093/gbe/evx009.
- De La Rúa P., Jaffé R., Dall'olio R., Muñoz I., Serrano J. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie.* 2009;40:263-284. DOI 10.1051/apido/2009027.
- Earl D.A., von Holdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 2012;4(2):359-361. DOI 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Espregueira Themudo G., Rey-Iglesia A., Robles Tascon L., Jensen A.B., da Fonseca R.R., Campos P.F. Declining genetic diversity of European honeybees along the twentieth century. *Sci. Rep.* 2020;10(1):10520. DOI 10.1038/s41598-020-67370-2.
- Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.-M., Solignac M. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). I. Mitochondrial DNA. *Genet. Sel. Evol.* 1998;30(Suppl.1):S31. DOI 10.1186/1297-9686-30-S1-S31.
- Govan V.A., Brozel V., Allsopp M.H., Davison S. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Appl. Environ. Microb.* 1998;64(5):1983-1985. DOI 10.1128/AEM.64.5.1983-1985.1998.
- Hyink O., Laas F., Dearden P. Genetic tests for alleles of *complementary-sex-determiner* to support honeybee breeding programmes. *Apidologie.* 2013;44(3):306-313. DOI 10.1007/s13592-012-0181-6.
- James R.R., Skinner J.S. PCR diagnostic methods for *Ascospaera* infections in bees. *J. Invertebr. Pathol.* 2005;90(2):98-103. DOI 10.1016/j.jip.2005.08.004.
- Martín-Hernández R., Meana A., Prieto L., Salvador A.M., Garrido-Bailón E., Higes M. Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007;73(20):6331-6338. DOI 10.1128/AEM.00270-07.
- Meixner M.D., Pinto M.A., Bouga M., Kryger P., Ivanova E., Fuchs S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 2013;52(4):1-28. DOI 10.3896/IBRA.1.52.4.05.
- Mroczek R., Laszkiewicz A., Blazej P., Adamczyk-Weglarzy K., Niedbalska-Tarnowska J., Cebrat M. New insights into the criteria of functional heterozygosity of the *Apis mellifera* complementary sex determining gene – discovery of a functional allele pair differing by a single amino acid. *PLoS One.* 2022;17(8):e0271922. DOI 10.1371/journal.pone.0271922.
- Neumann P., Carreck N.L. Honey bee colony losses. *J. Apic. Res.* 2010;49(1):1-6. DOI 10.3896/IBRA.1.49.1.01.
- Ruttner F. Breeding Techniques and Selection for Breeding of the Honeybee: an Introduction to the Rearing of Queens, the Conduct of Selection Procedures and the Operation of Mating Stations. Condor, Derby: British Isles Bee Breeders Assoc., 1988.
- Solignac M., Vautrin D., Loiseau A., Mougél F., Baudry E., Estoup A., Garnery L., Habert M., Cornuet J.-M. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Mol. Ecol. Notes.* 2003;3(2):307-311. DOI 10.1046/j.1471-8286.2003.00436.x.
- Tokarev Y.S., Huang W.F., Solter L.F., Malys J.M., Becnel J.J., Vossbrinck C.R. A formal redefinition of the genera *Nosema* and *Vairimorpha* (Microsporidia: Nosematidae) and reassignment of species based on molecular phylogenetics. *J. Invertebr. Pathol.* 2020;169:107279. DOI 10.1016/j.jip.2019.107279.
- Zareba J., Blazej P., Laszkiewicz A., Sniezewski L., Majkowski M., Janik S., Cebrat M. Uneven distribution of complementary sex determiner (*csd*) alleles in *Apis mellifera* population. *Sci. Rep.* 2017;7:2317. DOI 10.1038/s41598-017-02629-9.

#### ORCID ID

M.D. Kaskinova orcid.org/0000-0003-4960-6559  
L.R. Gaifullina orcid.org/0000-0002-3285-118X  
E.S. Saltykova orcid.org/0000-0003-0123-7037

**Благодарности.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-00004 (<https://rscf.ru/project/22-74-00004/>) с использованием ресурсов ЦКП УФИЦ РАН.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.10.2022. После доработки 01.11.2022. Принята к публикации 01.11.2022.