

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра Российской академии наук
(ИБГ УФИЦ РАН)

На правах рукописи

Каскинова Миляуша Дамировна

**СОХРАНЕНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ГЕНОФОНДА ПОПУЛЯЦИЙ *APIS*
MELLIFERA L. НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА SSR
ЛОКУСОВ И ПОЛ-ОПРЕДЕЛЯЮЩЕГО ГЕНА *CSD***

03.02.07 – генетика

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа 2019

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики - обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Научный руководитель: – **Николенко Алексей Геннадьевич**
доктор биологических наук, профессор

Рецензенты:

- **Хидиятова Ирина Михайловна**
доктор биологических наук, профессор,
заведующая лабораторией молекулярной
генетики человека Института биохимии и
генетики УФИЦ РАН;
- **Калашников Александр Евгеньевич**
кандидат биологических наук, старший
научный сотрудник лаборатории
иммуногенетики Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения «Всероссийский научно-
исследовательский институт племенного
дела».

.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Медоносная пчела *Apis mellifera* L. является важным звеном в экологической цепи и имеет особое значение в хозяйственно-экономической деятельности человека. Кроме того, медоносная пчела стала одним из модельных организмов, несмотря на ее сложную биологическую организацию (Page et al., 2002; Cridge et al. 2017). В 2006 году была опубликована полная геномная последовательность медоносной пчелы (Weinstock et al., 2006). С этого момента началось накопление полногеномных данных для разных популяций пчел. Большинство из этих исследований были направлены на поиск генетических маркеров, ассоциированных с устойчивостью к заболеваниям и адаптивностью (Liu et al., 2016; Spötter et al., 2016; Chen et al. 2016), а также маркеров, позволяющих дифференцировать подвиды медоносной пчелы (Henriques et al., 2018a, 2018b). Последние стали необходимы в связи с возросшей угрозой потери генофонда аборигенных популяций, которые представляют главный материал для селекции пчел в каждом конкретном географическом регионе (Руттнер, 2006).

Медоносная пчела представляет собой довольно сложный объект для селекции. При ее селекции необходимо учитывать такие особенности биологии как эусоциальность, гаплодиплоидность и полиандрия. Медоносные пчелы являются гаплодиплоидными организмами – самки развиваются из оплодотворенных яиц, самцы же появляются из неоплодотворенных яиц и имеют гаплоидный набор хромосом, полученный от матери (партеногенез). Исследования последних лет показали, что определение пола у медоносной пчелы имеет более сложную организацию и регуляцию (Beye et al., 2013; Zareba et al., 2017). Гетерозиготное состояние одного гена, названного *complementary sex determiner (csd)*, приводит к развитию особей женского пола, тогда как гомозиготность вызывает формирование диплоидных трутней, которые уничтожаются рабочими пчелами. Нормальные трутни развиваются при гемизиготном состоянии гена *csd*. При низком аллельном разнообразии гена пола в семье появляется большая доля диплоидных трутней (явление генетического пестрого расплода), что приводит к снижению силы семьи. В связи с этим в генетике перепончатокрылых насекомых было введено такое понятие, как производство диплоидных самцов (diploid male production, DMP) (Zayed et al., 2005; Vollet–Neto et al., 2017). Одним из механизмов, препятствующих DMP, является брачное поведение матки. Как известно, в размножении колонии принимает участие только матка (эусоциальность), спаривающаяся с

несколькими трутнями в зоне конгрегации трутней (полиандрия). Такое поведение позволяет повысить вероятность скрещивания с трутнями, имеющими отличные от матки аллели гена пола.

Таким образом, для успешной селекции пчел необходимо разработать комплекс методов для отбора желаемых признаков с сохранением генетического разнообразия по гену пола. При этом материалом для селекции должна служить аборигенная чистопородная популяция пчел, у которой уже сформирован генетический комплекс, обеспечивающий ее выживание и дающий ей преимущество перед интродуцированными подвидами.

Цель работы Разработка методов оценки, сохранения и оптимизации генетического разнообразия популяций медоносной пчелы на основе полиморфизма SSR локусов и пол-определяющего гена *csd*.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие **задачи**:

1) Провести анализ генетической структуры и динамики генофонда бурзянской популяции *A. m. mellifera* для оценки её состояния.

2) Разработать на основе полиморфизма SSR локусов метод идентификации и дифференциации основных распространённых в России подвидов медоносной пчелы (*A. m. mellifera*, *A. m. carpatica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica*).

3) Провести контроль подвидовой принадлежности рабочих пчёл в бурзянской естественной популяции *A. m. mellifera* и в племенных хозяйствах в Иглинском и Чишминском районах РБ с использованием SSR локусов и межгенного локуса *COI-COII* мтДНК.

4) Проанализировать полиморфизм и эволюцию аллелей гена *csd* в исследуемых пасаках Бурзянского, Иглинского и Чишминского районов, а также установить минимальные эффективные различия в аллельных парах гена *csd*.

5) Выполнить сравнительный анализ аллелей гена *csd* разных видов рода *Apis*, доступных в Genbank, для проверки наличия трансвидового полиморфизма.

6) Разработать методы оценки и оптимизации генетического разнообразия популяций *A. mellifera* L. на основе данных SSR анализа и аллельного состава гена *csd*.

Научная новизна и практическая значимость. На основе анализа подвидовой принадлежности и аллельного разнообразия гена *csd* разработаны практические рекомендации по сохранению чистопородности и оптимизации числа семей для каждой отдельной популяции. Усовершенствована схема селекции медоносной пчелы благодаря использованию данных анализа чистопородности и аллельного состава гена

csd. Данная схема селекции позволит получать линии пчел с высокими показателями продуктивности.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы были доложены на научных конференциях: Научно–практическая конференция «Современное пчеловодство. Проблемы разведения и селекции» 17–18 сентября 2015 года, Рыбное; Международная научная конференция «ЭкоБиотех–2015» 13–16 октября 2015 года, Уфа; IV Международная конференция «Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных» 26–28 октября 2015 года, Томск; IV международная научно–практическая конференция «Роль биоразнообразия пчелиных в поддержании гомеостаза экосистем», 2017 года, Ялта; Международная научная конференция, посвященная 80–летию со дня рождения акад. Ю.П. Алтухова. 17-21 апреля 2017 года, Москва; XV Съезд Русского энтомологического общества. 31 июля–7 августа 2017 года, Новосибирск; XXII Международный Конгресс Апиславия. 09-13 сентября 2018 года, Москва.

Публикации. По материалам ВКР опубликовано 22 печатных работ, из них 8 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад автора Автором выполнен сбор исследуемого материала и последующее выделение ДНК. Автор подготовил образцы для секвенирования и проводил анализ полиморфизма SSR локусов и аллельного разнообразия гена *csd*. Автором также были проведены все статистические анализы.

Структура и объем НКР. НКР состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, заключения и выводов, библиографического списка и приложений. Работа изложена на 135 страницах и содержит 25 таблиц, 21 рисунок и 5 приложений. Список литературы включает 200 источников, среди них 33 – отечественных, 164 – зарубежных и 3 ссылки на интернет источники.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Генетическая структура и динамика генофонда бурзянской популяции *A. m. mellifera*

Анализ микросателлитных локусов ядерной ДНК показал усиление процесса гибридизации. Если раньше факты интрогрессии генофонда линии С в охраняемых территориях Бурзянского района регистрировалась единично, то в 2017-2018 гг. более 30% семей имеют гибридное происхождение. Для анализа географического распределения чистопородных и гибридных семей *A. m. mellifera* был использован пакет программ Surfer 8 (рис. 1). Чистопородные семьи образуют ядро популяции, а на периферии располагаются гибридные семьи. Такое распределение свидетельствует о наличии естественных механизмов, сдерживающих гибридизацию. Селекционная работа, направленная на замену маток в гибридных семьях, позволит увеличить ареал распространения темной лесной пчелы. Чем раньше это будет сделано, тем больше шансов сохранить данную популяцию.

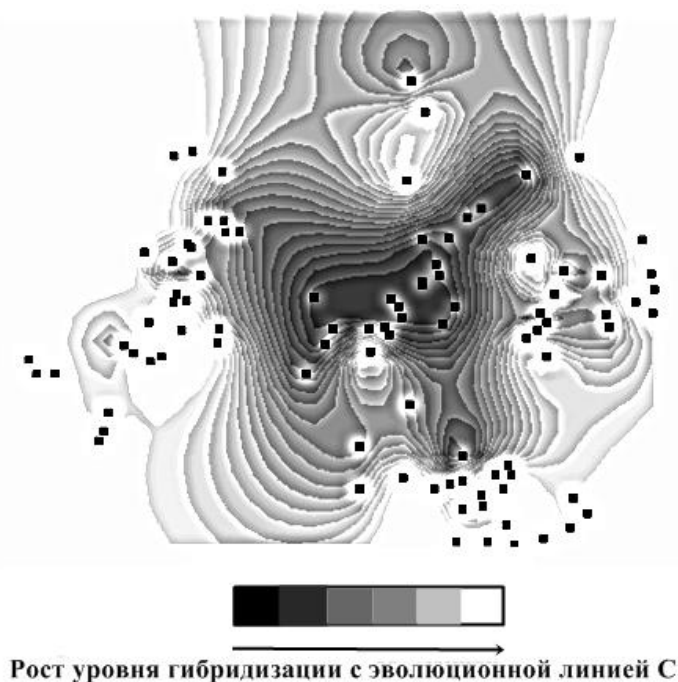


Рисунок 1.
Картирование индекса
породности
бурзянской
популяции.

2. SSR-метод идентификации и дифференциации основных подвидов медоносной пчелы, распространённых в России

Проблема подвидовой идентификации медоносной пчелы возникла в связи с неконтролируемой перевозкой пчелосемей и развитием пакетного пчеловодства. Если дифференциация подвидов из эволюционных линий М и С является решенным вопросом и используется для сохранения генофонда аборигенных популяций (Николенко и др., 2002, Ильясов и др., 2007, 2016),

то дифференциация подвидов, принадлежащих одной эволюционной ветви, остается актуальной.

На основе полиморфизма 12 SSR локусов яДНК (Ap243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28, Ab124, Ap256 и A079) был разработан метод дифференциации четырех подвидов медоносной пчелы *A. m. mellifera*, *A. m. carpatica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica*. Подвид *A. m. mellifera* представлен выборкой из бурзянской популяции темной лесной пчелы (N=27), породная принадлежность которой была установлена ранее при помощи 9 SSR локусов и локуса *COI-COII* мтДНК. В качестве подвида *A. m. carpatica* использованы четыре рабочие пчелы из Закарпатской области Украины и 17 рабочих пчел из Узбекистана (породные типы Говерла, Вучковский и Синевир). Рабочие пчелы *A. m. carnica* (N=15) собраны в Республике Адыгея, *A. m. caucasica* (N=24) – в Сочинском районе Краснодарского Края.

Для кластеризации особей в предполагаемые популяции (К) и определения генетической структуры исследуемой выборки был использован Байесовский подход, реализуемый ПО Structure 2.3.4. Анализ выходных данных в Structure-harvester показал наличие двух пиков delta K. При K=2 (delta K= 503.2) общая исследуемая выборка разделяется на два кластера – первый кластер формируется темной лесной пчелой, а в состав второго входят подвиды из эволюционной линии С. При K=4 (delta K= 60.2) наблюдается дифференциация четырех исследуемых подвидов (рис. 2А). Для проверки информативности локусов Ab124, Ap256 и A079 был проведен повторный анализ генетической структуры пасек, но уже без использования этих локусов (рис. 2Б). В результате разделение на кластеры было не четким. Таким образом, анализ новых SSR локусов показал, что локусы Ab124, Ap256 и A079 вносят вклад в дифференциацию подвидов из эволюционной линии С, представленных на территории России.

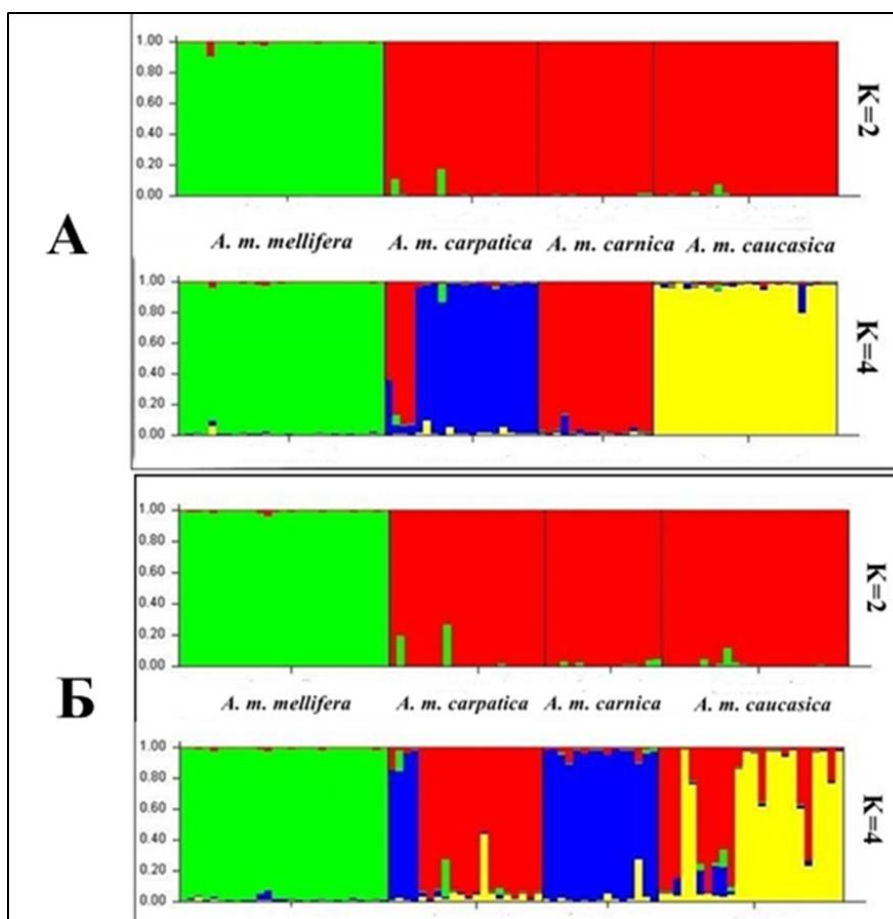


Рисунок 2. Генетическая структура исследуемых выборок при $K=2$ и $K=4$ с использованием полиморфизма 12 (А) и 9 (Б) SSR локусов.

3. Контроль подвидовой принадлежности семей из бурзянской естественной популяции *A. m. mellifera* и пасек племенных хозяйств Иглинского и Чишминского районов РБ

Для контроля подвидовой принадлежности пчел из пасек Иглинского, Бурзянского и Чишминского районов использовались рабочие пчелы, собранные с тех же семей, что и трутни (рис. 3). Было установлено, что семьи из пасек Бурзянского и Иглинского районов соответствуют заявленному подвиду *A. m. mellifera*, но имеют разный уровень гибридизации с подвидами из линии С. Средний уровень гибридизации семей из Иглинского района составил 23%, а в бурзянской выборке – 14%. Семьи из пасеки Чишминского района, позиционируемые как подвиды *A. m. carpatica* и *A. m. carnica*, входят в общий кластер с референсной выборкой *A. m. carnica* из Республики Адыгея. Поэтому в последующем анализе аллельного разнообразия гена *csd* данные семьи из чишминской пасеки рассматриваются как одна выборка. Подробные данные представлены в таблицах 2-4.

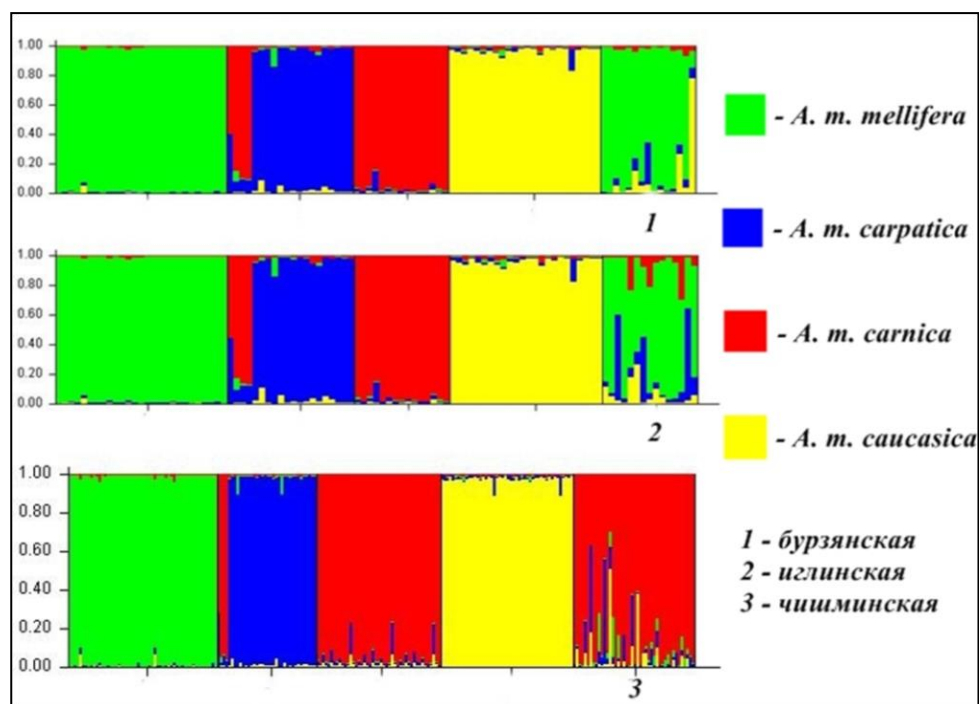


Рисунок 3. Генетическая структура пчел из Бурзянского, Иглинского и Чишминского районов.

4. Аллельное разнообразие гена *csd* в исследуемых выборках *A. mellifera*

Ген *csd* состоит из девяти экзонов и условно разделяется на три участка. Полиморфизм в гипервариабельном участке *csd*, входящего в состав третьего участка (region 3) вместе с аргинин-сериновым и пролин-обогащенным доменами, рассматривается как главный фактор, ответственный за генерацию новых аллельных вариантов (Hasselmann et al., 2008; Lechner, 2014; Beye et al., 2013; Zareba et al., 2017). Поэтому для исследования аллельного разнообразия гена *csd* нами был выбран третий участок пол-определяющего гена.

Среди 148 последовательностей гена *csd* было выявлено 70 аллелей. В таблице 1 приведены суммарные данные по выявленным аллелям. Число редких аллелей (встречающихся один раз) рассчитано относительно исследуемой выборки. Последовательности нуклеотидов были загружены в Genbank и доступны под номерами KY502199–KY502249 и MK531891–MK531990.

Сводная таблица по аллелям гена *csd*

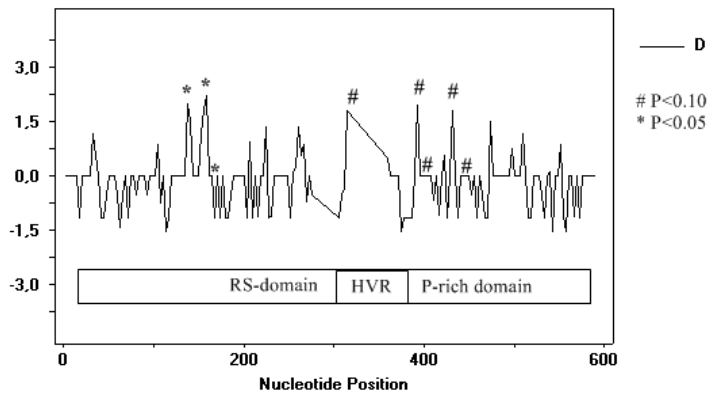
Пасека	Число семей	Число трутней	Число аллелей	Число редких аллелей
Бурзянская	20	27	21	12
Иглинская	15	42	20	13
Чишминская	44	79	41	22
Итого:	79	148	70	47

Большое число редких аллелей подтверждает тот факт, что гипервариабельный участок является мутационной горячей точкой и новые аллельные варианты формируются быстрее, чем предполагалось Lechner et al. (2014). Анализ перекрытия аллелей показал небольшое число общих аллелей в исследуемых выборках (рис. 4).

Рисунок 4. Перекрытие аллелей гена *csd* в исследуемых пасеках.

Сравнение аллелей гена *csd* из исследуемых пасек с 492 аллелями из базы данных GenBank, принадлежащими пяти видам (*A. mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata*, *A. florea* и *A. laboriosa*), показало наличие 16 новых аллелей. Из них 6 принадлежат пасеке из Чишминского района, 5 – из Бурзянского и 5 – из Иглинского.

Результаты теста Таджимы (рис. 5), выполненного методом скользящего окна, подтвердили действие балансирующего отбора на гипервариабельный участок *csd*. Балансирующий отбор благоприятствует редким аллелям и генерирует высокий полиморфизм, при этом аллели предкового вида могли сохраниться в популяции. Поэтому для гена *csd* было предположено наличие трансвидового полиморфизма – т.е. наличие одинаковых аллелей у представителей разных видов.



**Рисунок 5. Тест
Таджимы
методом
скользящего окна
с шагом в 3 п.н.**

Cho et al., (2006) выявили трансвидовой полиморфизм в первом участке (region 1) гена *csd* для двух видов: *A. dorsata* и *A. cerana*. Накопление последовательностей гена пола для разных видов позволило нам провести дополнительный анализ, в результате которого был выявлен трансвидовой полиморфизм в третьем участке (region 3) гена *csd*. Всего было проанализировано 492 аллеля, принадлежащих пяти видам, из них 15 являются трансвидовыми. Общие аллели обнаружены у видов: *A. dorsata* и *A. cerana* – 5 аллелей, *A. florea* и *A. mellifera* – 3, у *A. cerana* и *A. mellifera* – 2, *A. dorsata* и *A. florea* – 1, *A. cerana* и *A. florea* – 1. У *A. dorsata*, *A. cerana*, *A. florea* выявлено 4 общих аллеля.

Существует три механизма, объясняющие наличие трансвидового полиморфизма: первый – трансвидовые аллели сохранились в популяциях с момента их дивергенции, второй – одинаковые аллели сформировались в результате конвергентной эволюции и третий – интрогрессия аллелей при скрещивании видов. Для разных видов *Apis* были обнаружены репродуктивные барьеры в виде разного времени облета, различий в строении копулятивных органов и размера тела. Неполный репродуктивный барьер обнаружен у *A. mellifera* и *A. cerana*, тем не менее, были выявлены общие аллели с предковым видом *A. florea*. Поэтому остается два механизма, объясняющие наличие трансвидовых аллелей у пчел – это конвергентная эволюция и сохранение предковых аллелей у современных видов.

Для 49 семей были получены оба аллельных варианта *csd*. Был проведен сравнительный анализ этих пар аллелей для выявления минимальных различий, необходимых для формирования функционального белка *csd*. Ранее Вейе и др. (2013) установили, что 5 АК замен в последовательности, кодируемой гипервариабельным участком, определяет развитие женской особи. Также ими было показано, что различие в 3 АК замены способно определять развитие женской особи, хотя и с неполной пенетрантностью. Часть особей при этом развиваются в самок, часть – в диплоидных трутней, а для части потомства такой генотип оказывается

летальным. Lechner и др. (2014) на основе сравнения 77 пар аллелей выяснили, что для формирования функционального белка необходимо от 6 АК замен. В нашем исследовании минимальное число АК замен между парой аллелей также составило 5 АК. Различия в длине аллелей не определяют их функциональность.

5. Сохранение и оптимизация генофонда популяций *A. mellifera* L. на основе данных SSR анализа и аллельного состава гена *csd*

Был проведен анализ породной принадлежности на основе SSR локусов и аллельного разнообразия гена *csd* в семьях темной лесной пчелы из бурзянской популяции и двух пасек из племенных хозяйств Иглинского и Чишминского районов РБ. Из естественной популяции *A. m. mellifera* были отобраны 27 трутней из 20 семей. Для 15 семей были получены данные для оценки подвидовой принадлежности (таб. 2). В целом в выборке обнаружено 21 аллелей. Большая часть семей, за исключением семей Борть АС и кв.86, соответствуют подвиду *A. m. mellifera*. Было рекомендовано изъять данные семьи из дальнейшего разведения.

Таблица 2

Генетическая структура и аллели *csd* в бурзянской выборке

№ семьи	Аллель <i>COI-COII</i>	Доля С	Доля М	Аллели <i>csd</i>
КМН-2	PQQ	0.02	0.98	h1
38-1К	PQQ	0.03	0.97	h10, h11
ТЯ-31	PQQ	0.07	0.93	h12
ТЯ-47	PQQ	0.08	0.92	h13
ТЯ-19	PQQ	0.05	0.95	h14
ГУ-1	PQQ	0.12	0.88	h15
ТЯ-55	PQQ	0.07	0.93	h16
АРК-2	PQQ	0.14	0.86	h17, h18
ТЯ-14	PQQ	0.03	0.97	h8
ГР-1	PQQ	0.13	0.87	h2, h10
КА-29	PQQ	0.06	0.94	h3, h4
КА-19	PQQ	0.10	0.90	h5
Борть АС	PQQ	0.35	0.65	h6, h7
кв.60 борть	PQQ	0.07	0.93	h8
кв.86	Q	0.73	0.27	h9

В 15 семьях из Иглинского района было обнаружено 20 аллелей (таб. 3). Общие аллели найдены в семьях, происходящих от одной линии. Для избежания появления диплоидных трутней было рекомендовано не использовать совместно сперму трутней из семей с одинаковыми аллелями гена пола при искусственном осеменении маток. В шести семьях зафиксирован значительный уровень гибридизации (от 27 до 88%). Семьи № 1, 13, 27, 61, 63, 79, 82, 96 и 141 имеют большой генетический потенциал и рекомендуются для дальнейшего разведения.

Таблица 3

Генетическая структура и аллели *csd* в иглинской пасеке

№ семьи	Аллель <i>COI-COII</i>	Доля С	Доля М	Аллели <i>csd</i>
1	PQQ	0.16	0.84	h55
13	PQQ	0.02	0.98	h20, h57
26	PQQ	0.49	0.51	h60
27	PQQ	0.01	0.99	h42, h61
43	PQQ	0.37	0.63	h29, h46
45	PQQ	0.27	0.73	h62, h63
52	PQQQ	0.36	0.64	h20
61	PQQ	0.08	0.92	h46, h64
63	PQQ	0.01	0.99	h29, h65
79	PQQ	0.01	0.99	h2, h66
82	PQQ	0.08	0.92	h12, h67
96	PQQ	0.07	0.98	h68
108	PQQ	0.53	0.47	h56
136	PQQ	0.88	0.12	h46, h58
141	PQQ	0.11	0.89	h59

В пасеке Чишминского района из 44 семей выявлен 41 аллель, среди них 29 редких (таб. 4). У всех семей выявлен аллель Q локуса *COI-COII* мтДНК. На данной пасеке не используется искусственное осеменение маток, поэтому, для избежания появления диплоидных трутней в последующих поколениях, необходимо провести мероприятия по замене матки. Поскольку семьи данной пасеки имеют однородную генетическую структуру, семьи с одинаковыми аллелями можно использовать как производителей медовой продукции, не допуская при этом их дальнейшего размножения путем установки трутневых решеток.

Генетическая структура и аллели *csd* в чишминской пасеке

№ семьи	Доля С	Доля М	Аллель <i>csd</i>	№ семьи	Доля С	Доля М	Аллель <i>csd</i>
1	0.825	0.175	h8, h19	23	0.997	0.003	h46, h47
2	0.994	0.006	h8, h26	24	0.990	0.010	h48
3	0.911	0.089	h26, h35	25	0.996	0.004	h49
4	0.996	0.004	h19, h23	26	0.960	0.040	h47
5	0.995	0.005	h41, h42	27	0.995	0.005	h23, h24
6	0.994	0.006	h8, h26	28	0.989	0.011	h23, h39
7	0.997	0.003	h8, h29	29	0.995	0.005	h24, h48
8	0.992	0.008	h43, h44	30	0.984	0.016	h8, h24
9	0.996	0.004	h22, h45	31	0.995	0.005	h47, h50
10	0.989	0.011	h8, h20	32	0.844	0.156	h2, h39
11	0.993	0.007	h21, h22	33	0.995	0.005	h51, h52
12	0.991	0.009	h23, h24	34	0.993	0.007	h10, h53
13	0.992	0.008	h23, h25	35	0.973	0.027	h54
14	0.981	0.019	h25, h26	36	0.906	0.094	h26
15	0.935	0.065	h27	37	0.996	0.004	h36
16	0.804	0.196	h23, h28	38	0.993	0.007	h8
17	0.988	0.012	h19, h23	39	0.996	0.004	h24, h37
18	0.993	0.007	h29, h30	40	0.991	0.009	h17, h38
19	0.970	0.030	h25, h31	41	0.982	0.018	h23
20	0.926	0.074	h23, h26	42	0.983	0.017	h39, h45
21	0.895	0.105	h32, h33	43	0.982	0.018	h19, h40
22	0.997	0.003	h26, h34	44	0.982	0.018	h8, h11

В целом, в исследуемых выборках установлено высокое аллельное разнообразие по гену пола. В чишминской популяции аллельное разнообразие обеспечивается за счет ежегодного притока новых маток. В иглинской – за счет содержания разных линий одного подвида. В бурзянской популяции оно поддерживается благодаря естественному генетическому разнообразию, что еще раз подтверждает значимость аборигенных популяций медоносной пчелы.

6. Схема селекции медоносной пчелы с использованием анализа чистопородности и аллельного разнообразия гена *csd*

Одним из основных принципов селекционной работы с пчелами, согласно Руттнеру, является разведение породистых пчел наилучшего качества. «Чистопородное разведение и отбор по продуктивности — это не

антиподы, как часто считали раньше, а факторы, совместно создающие основу успешной селекционной работы» (Руттнер, 2006). На основе этого принципа нами была дополнена схема селекции породной линии пчел (рис. б).

Первым этапом селекционной работы является отбор чистопородных семей из исходной популяции пчел. В гибридных семьях необходимо будет провести мероприятия по замене маток на чистопородных. В 2017 – 2018 гг. из бурзянской популяции было проанализировано 235 семей, из них 161 соответствуют требуемому уровню чистопородности, то есть в данной популяции пчел имеется материал для восстановления.

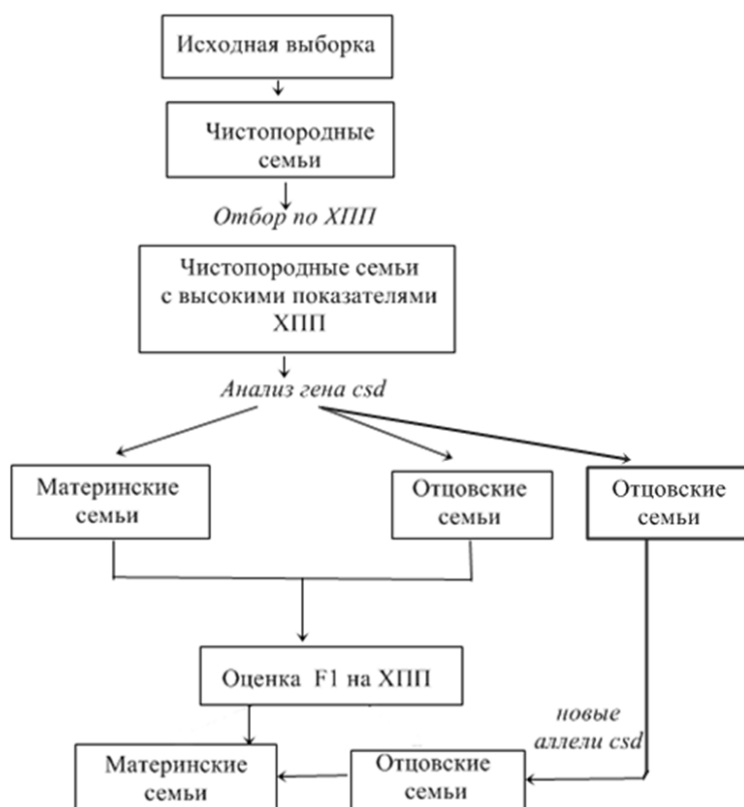


Рисунок 6. Схема селекции медоносной пчелы с применением информации о чистопородности и аллельному разнообразию гена *csd*.

Второй этап – это отбор чистопородных семей по хозяйственно-полезным признакам (ХПП, к ним относятся продуктивность, устойчивость к болезням, зимостойкость и т.д.). Отобранные семьи рекомендуется разместить на пасеке, отдаленной от других семей из исходной популяции для избежания нежелательной гибридизации. Рекомендуется создать несколько таких пасек для дальнейшего их скрещивания.

На третьем этапе производится анализ аллельного разнообразия гена *csd* в чистопородных семьях, отобранных для селекции. На основе данных по аллельному составу гена пола формируются отцовские и материнские семьи (100 – 200 материнских семей и несколько отцовских семей по 15 – 20 семей в каждой). Материнские и отцовские семьи должны иметь разные аллели

гена пола. Если отсутствует возможность применять инструментальное осеменение, то рекомендуется создать несколько отцовских семей вокруг пасеки с материнскими семьями, что позволит получить чистопородных плодных маток. Кроме того, родительские семьи рекомендуется проверить на наличие заболеваний.

На четвертом этапе производится оценка потомства на ХПП. Отбор по ХПП поставлен перед анализом на аллельное разнообразие гена пола в связи с экономической целесообразностью. На определение аллелей гена пола во всех семьях исходной популяции будет затрачено больше времени и средств. К тому же на примере выборки из Бурзянского района было показано, что бурзянская популяция имеет высокое аллельное разнообразие по гену пола и в ней относительно больше редких аллелей. Отбор по селективируемому признаку (признакам) необходимо проводить в каждом поколении. Такая схема селекции позволит получить линии пчел с высокими показателями продуктивности. Кроме того, ежегодная оценка аллельного разнообразия гена пола на одной пасеке позволит пролить свет на частоту формирования новых аллельных вариантов и другие вопросы, связанные с эволюцией этого гена.

Таким образом, нами был разработан набор из SSR локусов, с помощью которого можно дифференцировать наиболее часто экспортируемые подвиды из эволюционной линии *C* – *A. m. carpatica* из Узбекистана, *A. m. carnica* из Республики Адыгея и *A. m. caucasica* из Краснодарского края. Данный набор SSR локусов был использован для контроля подвидовой принадлежности трех пасек, отобранных для анализа аллельного состава пол-определяющего гена *csd*. Анализ гена *csd* в этих пасеках в целом показал его высокое аллельное разнообразие, которое в одних пасеках поддерживается благодаря грамотной работе пчеловодов, в других – благодаря естественному генетическому разнообразию и высокой скорости эволюции аллель-специфичного гипервариабельного участка *csd*. Исходя из полученных результатов, была усовершенствована схема селекции породной линии пчел.

ВЫВОДЫ

- 1) Выявлен рост гибридизации бурзянской популяции *A. m. mellifera*. В выборках за 2017-2018 гг. более 30% семей имеют гибридное происхождение.
- 2) Разработан набор из 12 SSR локусов, дифференцирующий выборку *A. m. mellifera*, *A. m. carpatica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica*. Наибольшую информативность показали локусы Ab124, Ap256 и A079.
- 3) Установлено, что семьи из пасек Бурзянского и Иглинского районов соответствуют заявленному подвиду *A. m. mellifera*, но имеют разный уровень гибридизации с линией С. Семьи из пасеки Чишминского района, заявленные как *A. m. carpatica* и *A. m. carnica*, формируют общий кластер с *A. m. carnica* из Республики Адыгея.
- 4) В трех пасеках выявлено 70 аллелей гена *csd*, 47 из которых являются редкими. Большое число редких аллелей подтверждает, что гипервариабельный участок гена *csd* является мутационной «горячей точкой» и испытывает влияние балансирующего отбора, который благоприятствует редким аллелям. Сравнение нуклеотидных последовательностей гипервариабельного участка гена *csd* исследуемых выборок с представленными в GenBank последовательностями, принадлежащими пяти разным видам *Apis*, показало наличие 16 новых аллелей.
- 5) Впервые выявлен трансвидовой полиморфизм гипервариабельного участка для четырех видов *Apis*. Ранее трансвидовой полиморфизм был зафиксирован только в первом участке (region 1) гена *csd* для *A. dorsata* и *A. cerana*. Доказано, что для формирования функционального белка *csd* достаточно 5 АК замен.
- 6) Установлены механизмы поддержания аллельного разнообразия гена *csd* в популяциях с разным уровнем контроля размножения. В чишминской популяции аллельное разнообразие обеспечивается за счет ежегодного притока новых маток. В иглинской – за счет содержания разных линий одного подвида. В бурзянской популяции оно поддерживается благодаря естественному генетическому разнообразию, что еще раз подтверждает значимость аборигенных популяций медоносной пчелы.

Практические рекомендации

1. Для получения высокопродуктивных линий рекомендуется использовать чистопородные семьи определенного подвида. Разработанный набор SSR локусов, позволяющий дифференцировать основные подвиды, распространенные в России, рекомендуется использовать для выявления гибридных семей.
2. Большое значение при разведении семей пчел имеет происхождение семей и разделение отцовских и материнских семей. Поэтому в качестве отцовских семей нами рекомендуется использовать семьи с заведомо известным разным происхождением и имеющим редкие аллели гена *csd*.
3. Аллели гена *csd* из отцовских и материнских семей должны иметь более 5 АК различий. Высокое аллельное разнообразие гена *csd* не гарантирует отсутствия диплоидных трутней в потомстве, если аллели из отцовских и материнских семей не будут иметь более 5 АК различий.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

1. **Каскинова М.Д.**, Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Анализ генетической структуры популяций медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) // Генетика. – 2015. – Т. 51. – № 10. – С. 1199-1202.
2. **Каскинова М.Д.**, Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Косарев М.Н., Шарипов А.Я., Николенко А.Г. Оценка чистопородности семей темной лесной пчелы бурзянской популяции // Пчеловодство. – 2016. – № 6. – С. 20-23. (РИНЦ)
3. **Каскинова М.Д.**, Поскряков А.В., Николенко А.Г. Маркеропосредованная селекция медоносных пчел // Пчеловодство. – 2017. – №2. – С.22-24.
4. **Каскинова М.Д.**, Николенко А.Г. Ген *csd* медоносной пчелы: структура, функционирование и эволюция // Генетика. – 2017. – Т.53. – № 3. – С. 279–283.
5. Гатауллин А.Р., **Каскинова М.Д.**, Ильясов Р.А. Генетическая структура популяции медоносной пчелы Нуримановского района Республики Башкортостан // Вестник БГАУ. – 2018. – № 1. – С. 48-53.
6. **Каскинова М.Д.**, Гатауллин А.Р., Хасанов М.В., Ильясов Р.А., Квон Хюн Вук, Николенко А.Г. Оценка чистопородности популяции *Apis mellifera mellifera* L. на территории заказника Алтын-Солок // Известия Уфимского Научного Центра РАН. – 2018. – № 3(4). – С. 51-56.
7. **Каскинова М.Д.**, Гатауллин А.Р., Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Поскряков А.В., Николенко А.Г. Полиморфизм гипервариабельного участка гена *csd* в популяции *Apis mellifera* L. на Южном Урале // Генетика. – 2019. – Т. 55. – № 2. – С. 239-242.
8. Юнусбаев У.Б., **Каскинова М.Д.**, Ильясов Р.А., Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е.С., Николенко А.Г. Роль полногеномных исследований в изучении биологии медоносной пчелы // Генетика. – 2019. – Т.55. – № 7. – С. 778–787.
9. Николенко А.Г., Гатауллин А.Р., **Каскинова М.Д.**, Ильясов Р.А. Генетическая структура уральской популяции тёмной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. // Научно-практическая конференция «Современное пчеловодство. Проблемы разведения и селекции». – Рыбное, 2015. – С. 22-26.
10. Гатауллин А.Р., **Каскинова М.Д.**, Николенко А.Г. Пути решения проблемы роста смертности пчелиных семей // Международная научная конференция «ЭкоБиотех–2015». – Уфа, 2015. – С. 67-69.
11. Николенко А.Г., Гатауллин А.Р., **Каскинова М.Д.** Уральские популяции тёмной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. // IV Международная конференция «Концептуальные и прикладные аспекты научных

исследований и образования в области зоологии беспозвоночных». – Томск, 2015. – С. 112-115.

12. **Каскинова М.Д.**, Ильясов Р.А., Поскряков А.В., Косарев М.Н., Шарипов А.Я., Николенко А.Г. Генетические показатели бурзянской популяции *Apis mellifera mellifera* L. / Биомика. – 2016. – Т. 8. – № 2. – С. 117-124. (РИНЦ)

13. **Каскинова М.Д.**, Николенко А.Г. Определение оптимального числа отцовских семей на племенной пасеке на основе полиморфизма гена *csd* // Молекулярная биотехнология: материалы научных докладов участников Всероссийской школы-конференции молодых ученых. – Уфа, 2017. – С. 102-105.

14. Николенко А.Г., **Каскинова М.Д.**, Гатауллин А.Р., Салтыкова Е.С. Восстановление здоровья пчелы вместо лечения антибиотиками и применения искусственных стимуляторов // IV международная научно-практическая конференция «Роль биоразнообразия пчелиных в поддержании гомеостаза экосистем». – Ялта, 2017. – С.281-287.

15. **Каскинова М.Д.**, Поскряков А.В., Николенко А.Г. Генетическая структура внутривидовых типов карпатской породы // IV международная научно-практическая конференция «Роль биоразнообразия пчелиных в поддержании гомеостаза экосистем» – Ялта, 2017. – С.50-55.

16. Николенко А.Г., **Каскинова М.Д.**, Гатауллин А.Р., Салтыкова Е.С. Структура популяционной системы тёмной лесной пчелы в Волго-Уральском регионе // «Генетика популяций: прогресс и перспективы». Материалы Международной научной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения акад. Ю.П. Алтухова. – Москва, 2017. – С.191-192.

17. **Каскинова М.Д.**, Поскряков А.В., Николенко А.Г. Аллельное разнообразие гена *csd* в локальной популяции *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) // XV Съезд Русского энтомологического общества. – Новосибирск, 2017. – С.230-231.

18. Николенко А.Г., **Каскинова М.Д.**, Гатауллин А.Р., Салтыкова Е.С. Молекулярно-генетическая система контроля племенной ценности темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) для ускоренной селекции породных линий // XV Съезд Русского энтомологического общества. – Новосибирск, 2017. – С.359-360.

19. **Каскинова М.Д.**, Николенко А.Г. Установление подвидовой принадлежности алтайской популяции *Apis mellifera* L. // Тезисы докладов XXII Международного Конгресса Апиславия. – Москва, 2018. – С.43.

20. Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., **Каскинова М.Д.**, Поскряков А.В., Николенко А.Г. Иммуностимулирующее действие хитозана при нозематозе у

медоносной пчелы // Тезисы докладов XXII Международного Конгресса Апиславия. – Москва, 2018. – С.92.

21. **Каскинова М.Д.**, Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Поскряков А.В., Шунк А.А., Николенко А.Г. Генетическое состояние алтайской популяции темной лесной пчелы *Apis mellifera mellifera* L. // Биомика. – 2018. – Т.10(3). – С. 281-285. (РИНЦ)

22. **Каскинова М.Д.**, Салтыкова Е.С., Николенко А.Г. Аллельное разнообразие гена пола *csd* медоносной пчелы в условиях племенного хозяйства и естественного разведения // Тезисы докладов VII съезда ВОГиС. – Санкт-Петербург, 2019. – С. 607.