

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПЧЕЛЫ МЕДОНОСНОЙ В БАШКИРСКОМ ЗАУРАЛЬЕ

Исследовано морфологическое и генетическое разнообразие пчелы медоносной (*Apis mellifera mellifera* L.) на территории Башкирского Зауралья и горно-лесной части Южного Урала. Установлено, что генофонд популяции в пределах региона разнороден. Это может быть связано с бесконтрольным завозом пчел из других местностей. Выявлены различия в морфологической и генетической изменчивости выборок Башкирского Зауралья и бурзянской бортовой пчелы, что представляет угрозу ее генофонду.

В бывшем СССР был накоплен значительный опыт пчеловодства и разработаны оригинальные подходы к развитию отрасли. Однако в последние десятилетия в ней происходят масштабные негативные процессы [5], вызванные в основном экономическими проблемами. Кризисное состояние пчеловодства обуславливается также критическим состоянием генофонда пчелы медоносной [4]. Этому способствует антропогенная трансформация среды обитания среднерусской породы, постепенная утрата государственного контроля за развитием отрасли и возрастание роли частного сектора в обеспечении продукцией пчеловодства. В результате неконтролируемого завоза пчел из других местностей и последующей неуправляемой гибридизации генофонд локальных популяций может подойти к рубежу, за которым может начаться необратимая деградация. С учетом того, что во многих регионах страны местные популяции уже, возможно, не существуют в «чистом» виде, использование такого надежного инструмента мониторинга генетической структуры и анализа генофонда, как генетические маркеры, встает с особой остротой. Особенно это важно для Южного Урала, так как эти вышеуказанные процессы серьезно затрагивают генофонд местной бурзянской популяции среднерусской породы, которая обитает в регионе многие тысячелетия и выделяется хорошей адаптацией к резко континентальному климату, способностью к активному и кратковременному медосбору, устойчивостью к болезням [1]. Поэтому исследование генофонда пчелы медоносной на этой территории представляется чрезвычайно актуальным, в том числе в не изученном в этом плане таком обширном регионе, как Башкирское Зауралье.

Цель работы – исследовать морфологическую и генетическую изменчивость и дифференциацию выборок пчелы медоносной на территории Башкирского Зауралья и горно-лесной части Южного Урала.

Исследованы пчелы почти всех административных районов Башкирского Зауралья: Учалинского (выборка Учл-1, 4 семьи и 66 рабочих пчел), Абзелиловского (Аб-1, 10 и 200; Аб-2, 2 и 39, соответственно), Баймакского (Ба-1, 11 и 219; Ба-2, 4 и 77; Ба-3, 2 и 40), Зианчуринского (Зн-1, 4 и 80; Зн-2, 2 и 40), Зилаирского (Зл-1 и Зл-2, по 2 и 39). Кроме того, изучены пчелы из пасек в Бурзянском районе горно-лесной зоны Башкортостана: Бу-1 (15 и 300) и Бу-2 (4 и 79). В этом же районе находится основное ядро диких бортовых пчел. Из одного из урочищ взяты образцы из 9 (165 пчел), в другом – из 2 бортей (39).

Использованными морфологическими признаками были: длина жилок (а) и (б) третьей кубитальной ячейки переднего крыла ДЖ (а) и ДЖ (б); длина и ширина переднего членика задней лапки ДЧ и ШЧ; длина и ширина крыла ШК и ШЛ; длина и ширина тергита ДТ и ШТ; длина и ширина стернита ДС и ШС; длина и ширина воскового зеркала ДВЗ и ШВЗ; длина хоботка ДХ; кубитальный и тарзальный индексы КИ и ТИ. Измерения экстерьерных признаков проводили согласно общепризнанным методикам [1]. После отбора пчел, их фиксировали путем обработки серным эфиром, каждую из них помещали в марлевый мешочек и заливали 70%-ным этанолом. Морфометрические параметры на временных глицериновых препаратах измеряли при помощи окуляра-микрометра бинокулярного микроскопа МБС-9 (с 10-20 кратным увеличением, в зависимости от параметра).

Стандартные статистические анализы выполнены при помощи программы «STATISTICA 5.0» (версия 5.1.), а также MS EXCEL и SYN-TAX IV [12].

На одну выборку нами для электрофоретического анализа были отобраны по 32 рабочие пчелы. Большинство выборок были теми же, что и при морфологическом анализе. Исключениями являются: не были включены в анализ пчелы из пасек Бурзянского района (выборки Бу-1 и Бу-2), использованы дополнительные выборки из Белорецкого (Бл-1), Хайбуллинского (Хб-1) и Учалинского (Учл-и1, Учл-и2) районов, из Баймакского района были взяты только две выборки (кроме Ба-3).

В качестве основного метода лабораторных анализов выбран полиакриламидный диск-электрофорез в вертикальных блоках щелочного разделяющего геля [8, 11]. Для выявления изоферментов в гелях после электрофореза использовали гистохимические методы [3]. Изоферменты выделяли гомогенизацией целой особи. Экстракцию проводили в буфере (0.1 М трис-НСI, рН 8.0), содержащем 17% сахарозы. Гомогенизацию проводили в 200-400 мкл экстрагирующего буфера в фарфоровых ступках. После экстракции ферментов гомогенат центрифугировали в течение 15 минут при 15 тыс. об/мин при $t = 0^{\circ} \text{C}$.

При определении уровня генетического разнообразия и выборе информативных генетических маркеров в смешанной выборке пчел изучены фенотипы изоферментов малатдегидрогеназы (MDH, 1.1.1.37). Названия и номера ферментов даны в соответствии с рекомендациями номенклатурного комитета Международного союза биохимиков в сокращенном виде и прописными буквами. Локусы и аллели обозначали согласно системе [13]. Гипотеза об особенностях генетического контроля малатдегидрогеназы – единственного обнаруженного нами полиморфного фермента – изучали при помощи анализа фенотипов изоферментов. Отклонения от ожидаемого соотношения 1:1 оценивались по стандартному критерию χ^2 . При этом использована такая особенность генетики пчелы медоносной, как диплоидность матки и рабочих пчел и гаплоидность трутней. Гомозиготная по аллелю малатдегидрогеназы матка будет продуцировать рабочие

пчелы, имеющие в генотипе всегда этот аллель и другой, такой же, или другие, привнесенные трутнем (в этом случае рабочие пчелы – гетерозиготы по Mdh-1). Если же матка гетерозиготна изначально, у рабочих пчел будут встречаться все три фенотипа (Mdh-1^{1/1}, Mdh-1^{1/2}, Mdh-1^{2/2}) в концентрациях, зависящих от аллельного состава оплодотворяющих ее трутней.

Для статистической обработки результатов генетических исследований использованы в основном следующие показатели: частота аллелей, ожидаемая (H_e) и наблюдаемая гетерозиготность (H_o), индекс фиксации Райта F (коэффициент инбридинга), среднее число аллелей на локус A, доля полиморфных локусов (в том числе с введением критериев полиморфности). Эти параметры, показатели F-статистики Райта F_{is} , F_{it} и F_{st} [15], расстояния М.Нея D [10] и Кавалли-Сфорца D_{cse} [6] вычисляли с использованием компьютерной программы BIOSYS-1 [14]. Соответствие наблюдаемых соотношений генотипов в популяциях ожидаемому по правилу Харди-Вайнберга распределению 1:1 оценивалось с помощью стандартного χ^2 – критерия и G –теста [2]. Эти же критерии и способы использовались при определении степени различий выборок по частотам аллелей и генотипов.

Установлено, что в большинстве выборок, особенно в бурзянских, распределение значений морфологических признаков носит в целом характер, близкий к «нормальному». Но в некоторых выборках, в основном в зауральских, наблюдается тенденция к асимметрии или эксцессу.

Результаты кластерного анализа пчел по морфологическим показателям показаны на рисунке 1. Из дендрограммы видно, что выборки объединились в 2 больших кластера. Один кластер включает два подкластера – «диких» пчел из бортей и пасек на территории Бурзянского района. Несмотря на то, что «расстояния» между ними существенны, тем не менее, они серьезно отличаются от выборок Башкирского Зауралья и горно-лесного Белорецкого района. Характеризуя вторую группу кластеров, можно отметить две закономерности. Первая состоит в «отсутствии закономерности» – в близкие кластеры объе-

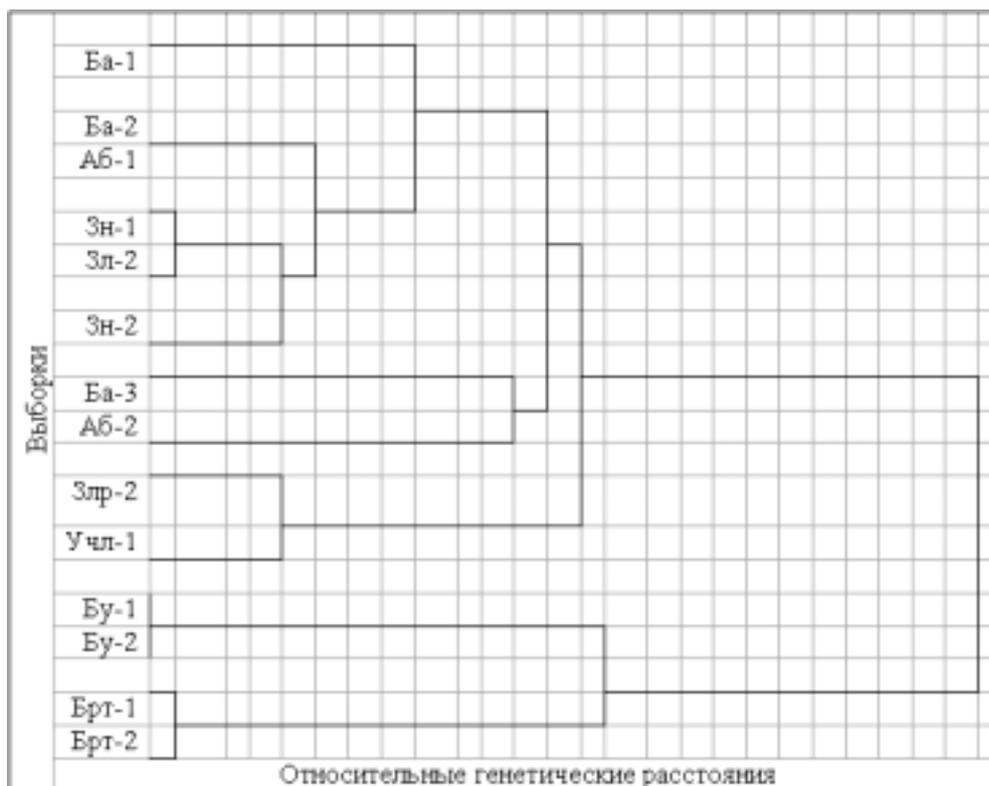


Рисунок 1. Дендрограмма, составленная по морфологическим параметрам

динились удаленные друг от друга выборки (например, пары Злр-2/Учл-1). Иногда близкорасположенные выборки (например, Злр-2 и Злр-1) «разнесены» по разным кластерам. То есть выборки расположены на дендрограмме в целом «хаотически». Вторая закономерность – в относительно высоком уровне дифференциации выборок (групп кластеров). Другими словами, несмотря на указываемую в литературе невысокую изменчивость (вариацию) морфометрических показателей [1], генотип пчелы в исследованном регионе довольно разнороден. Эти закономерности выявляются не только по средним абсолютным значениями морфологических параметров, но и по их изменчивости. При помощи кластерного анализа установлена разная информативность морфологических параметров для выявления различий бурзянских (бортевых и из пасек) и зауральских пчел (таблица 1).

Главной причиной выявленных закономерностей может быть бесконтрольный завоз других пород и популяций на территорию Республики, что приводит к метизации местных пчел, увеличению изменчивости и разли-

чий морфометрических показателей. Свидетельством этого, в частности, являются данные рис. 2. В 9 семьях бортевых пчел кубитальный индекс составляет 58-62, но на гистограмме отдельную группу образуют 2 семьи с индексом 55-56. Для многих пчел из Башкирского Зауралья характерны такие значения индекса. В частности, там пределы его изменений – 48.23-54.31, в среднем 51.58 ± 0.69 .

На электрофореграммах МДН наблюдается гистохимическое окрашивание трех зон с активностью малатдегидрогеназы, из которых МДН-2 является полностью моно-

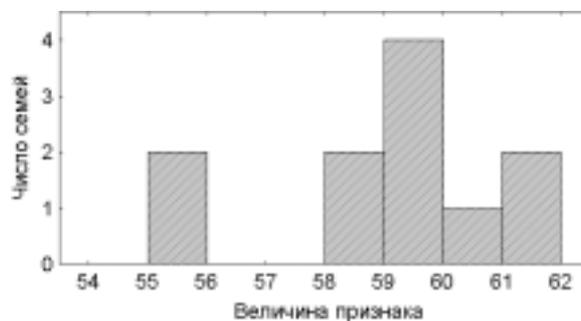


Рисунок 2. Значения кубитального индекса в семьях бортевых пчел.

Таблица 1. Общая характеристика морфологических признаков

Признаки	Значения признака	Коэффициент вариации С, %	Пределы изменений С	Закономерности*	
				1	2
ДЖ (а)	18.81	11.08	7.40-19.1	+	+
ДЖ (б)	34.96	8.41	6.58-10.4	+	+
ДЧ	4.23	2.90	2.34-3.31	-	-
ШЧ	2.36	3.22	2.58-4.21	-	-
ДК	9.19	2.15	1.72-2.67	-	-
ШК	3.12	2.53	1.89-2.88	-	-
ДТ	4.63	4.05	3.47-5.22	+	-
ШТ	2.38	6.95	2.99-12.39	+	-
ШС	4.51	3.55	2.79-4.26	+	-
ДС	2.92	2.63	2.21-3.11	+	+
ШВЗ	2.46	3.14	2.46-4.09	+	-
ДВЗ	1.55	4.03	3.18-4.9	-	-
ДХ	6.21	2.06	1.57-2.59	+	-
ТИ	56.12	1.92	1.35-2.50	+	+
КИ	51.58	2.91	1.05-4.24	+	+

* – закономерности, показывающие относительные различия выборок Башкирского Зауралья от пчел бортей (1) и относительную близость к последним пчел из пасек (2) Бурзянского района

морфной. В двух других зонах выявлялись одно- и трехполосные фенотипы изоферментов, что доказывает димерность структуры фермента. Однако в одной из полиморфных зон активность изоферментов слаба и проявляется непостоянно. Поэтому в данной работе эти маркеры нами не использованы. Описанная нами версия генетического контроля изоферментов локуса *Mdh-1* полностью соответствует результатам определения механизмов наследования с использованием контролирующих скрещиваний [7]. Частоты генотипов *Mdh-1* приведены в табл. 2.

Аллель 3 (в виде гетерозигот *Mdh-1*^{2/3}) обнаружен нами лишь в двух выборках (Ба-1 и Хб-1) с низкой частотой встречаемости (0.062 и 0.187). Генотип *Mdh-1*^{1/1} относительно редок в некоторых выборках (Ба-1, Учл-1, Учл-и1, Учл-и2, Зл-2) или отсутствует вообще (Зн-2, Ба-2, Зл-1, бортевые пчелы). В других выборках (Хб-1, Зн-1) он встречается намного чаще или даже доминирует (Аб-1). У некоторых выборок (Аб-1) в целом наиболее частый аллель оказался в меньшинстве. Таким образом, различия в аллельном составе касаются не только относительно редких, как это характерно для популяций перекрестно оплодотворяющихся организ-

мов [9], но и частых аллелей. При этом выборки Ба-1 и Хб-1 обладают «своим» редким аллелем, не имеющимся на других участках.

Об определенном дисбалансе генетической структуры может свидетельствовать нарушение правила Харди-Вайнберга. Статистически достоверные (на уровне значимости $p < 0.05$) несоответствия наблюдаемых и ожидаемых частот генотипов обнаружены нами в выборках Ба-1, Зл-1 и Зл-2. Это привело к высокому значению коэффициента инбридинга *F* (индекса фиксации Райта) у большинства выборок, а в Зл-2 эксцесс гомозигот был даже статистически достоверным на $P < 0.05$ ($G_{набл.} = 5.0$, $G_{ожид.} = 3.8$).

Генетическое расстояние Нея в среднем по всем парам составило $D = 0.121$ – относительно высокую величину даже для разных популяций в пределах одного вида. Этот уровень дифференциации характерен для внутривидовых различий [9]. О высоком уровне различий свидетельствует и статистическая оценка степени гомогенности частот ($P < 0.001$ и по аллелям и по генотипам). При этом и большая часть попарных сравнений выборок показывает существование статистически достоверных на $P < 0.05$ различий. Величина, приходящаяся на межвыборочную со-

Таблица 2. Частоты генотипов в выборках

Выборки	Генотипы Mdh-1			
	1 x 1	1 x 2	2 x 2	2 x 3
Ба-1	0.187	0.437	0.187	0.187
Учл-1	0.067	0.333	0.600	0
Учл-и1	0.056	0.333	0.611	0
Учл-и2	0.125	0.312	0.563	0
Аб-1	0.625	0.250	0.125	0
Хб-1	0.375	0.375	0.187	0.062
Зн-1	0.250	0.500	0.250	0
Зн-2	0	0.563	0.437	0
Ба-2	0	0.688	0.312	0
Зл-1	0	0.688	0.312	0
Зл-2	0.187	0.125	0.688	0
Бл-1	0.125	0.250	0.625	0
Брт-1	0	0.094	0.906	0

ставляющую генетической изменчивости, составляет $F_{st} = 0.134$ или 13,4%. О том, что этот уровень превышает даже межпопуляционную дифференциацию, свидетельствуют литературные данные [9]. Наибольший вклад в такую дифференциацию вносят несколько выборок (Аб-1, Хб-1, Зн-1, бортевые пчелы). Без их учета величина параметра F_{st} уменьшается в несколько раз. Особенно велики различия бортевых пчел и других выборок. Это демонстрирует дендрограмма на основе генетического расстояния D_{cse} (рис. 3). Здесь необходимо отметить, что дендрограммы, построенные по другим типам генетических расстояний, не обнаруживают каких-либо принципиальных различий.

Чем ближе по генетической структуре те или иные выборки, тем больше вероятности, что они окажутся в одном или близких кластерах. Действительно, две выборки (Учл-1 и Учл-и1) пчел из хозяйств «Башкирия» и «Красный партизан» Учалинского района образовали такой кластер из практически генетически однородных групп ($D_{cse} = 0.008$). Однако на них эта закономерность заканчивается, а все остальные выборки расположены на дендрограмме «хаотически». Например, обладающие практически полной гомогенностью аллельных частот выборки Зл-2 и Бл-1 находятся на территориях удаленных друг от друга Зилаирского и Белорецкого районов, сильно отличающихся

по природно-климатическим условиям. И наоборот, выборки близкорасположенных территорий могут быть отнесены к разным кластерам. Например, это пара из соседствующих Баймакского и Хайбуллинского районов Ба-1/Хб-1 ($D_{cse} = 0.118$). Между этой парой и выборкой Аб-1 из Абзелиловского района генетическое расстояние еще выше ($D_{cse} = 0.219$). Выборка бортевых пчел выделяется от пчел двух главных кластеров на уровнях $D_{cse} = 0.227$ и $D_{cse} = 0.265$.

Главной причиной выявленных закономерностей (практически полное отсутствие связи между географическим и генетическим расстояниями) мы считаем бесконтрольный завоз пчел других пород и популяций на территорию Республики. Это приводит к метизации местных пчел и, теоретически, повышенной изменчивости внутри «гибридных» семей и в пределах отдельных пасек, «мозаичности» генетической структуры выборок, сильной выраженности межвыборочной дифференциации частот генотипов. Действительно, при рассмотрении гетерозиготности выборок выявляется низкая изменчивость бортевых пчел ($H_c = 0.094$ и $H_o = 0.090$), по сравнению с другими выборками (в среднем $H_c = 0.425$ и $H_o = 0.441$) – там она в 4.5-4.9 раз меньше. Другой феномен – наблюдается большой разброс значений гетерозиготности. Даже если исключить из сопоставления бортевых пчел,

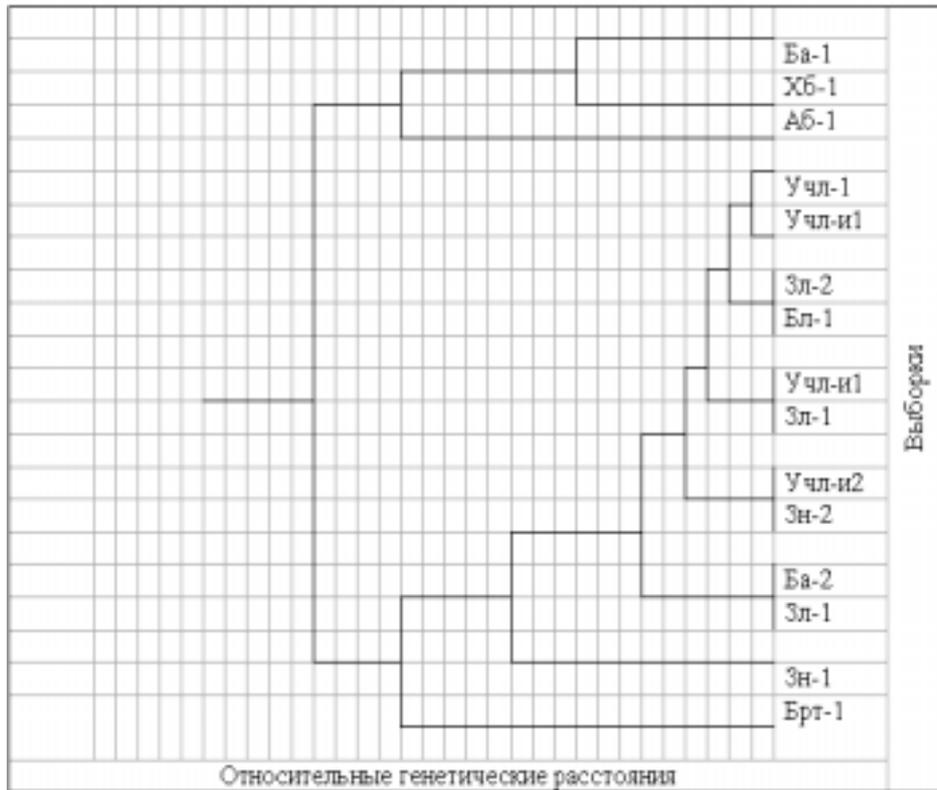


Рисунок 4. Дендрограмма, построенная на основе генетических данных

все равно в зауральских выборках он значителен – $H_c = 0.125 - 0.688$ и $H_o = 0.356 - 0.595$.

Таким образом, полученные различными методами (морфометрическим и электрофоретическим анализами) результаты показывают, что: 1) генофонд выборок пчел в пределах Башкирского Зауралья разноро-

ден, что может быть связано в основном с бесконтрольным завозом пчел из других регионов; 2) он отличается от генофонда бурзянской бортовой пчелы и тем самым несет последнему угрозу; 3) среди семей бурзянской бортовой пчелы уже ощущаются признаки изменения генофонда.

Список использованной литературы:

1. Биляш Г.Д., Кривцов Н.И. Селекция пчел. М.:Агропромиздат. 1991. 412с.
2. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. – 271 с.
3. Корочкин Л.И., Серов О.Л., Пудовкин А.И. и др. Генетика изоферментов. – М.: Наука, 1977. – 275 с.
4. Николенко А.Г., Сатаров В.Н., Косарев М.Н. и др. Генетические аспекты сохранения биологического разнообразия. Уфа. БГУ, 2000. 108 с.
5. Сокольский С.С. Состояние и проблемы производства маток и пакетов пчел в России // Пчеловодство. 2001. №7.
6. Cavalli-Sforza L.L., Edwards A.W. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures // Am. J. Hum. Genet. -1967. – Vol. 19. – P. 233-257.
7. Contel E.P.B., Mestriner M.A., Martins E. Genetic control and developmental expression of malate dehydrogenase in *Apis mellifera* // Biochem. Genet. – 1977. – V. 15. –p. 859-876.
8. Davis B.J. Disc electrophoresis. 11. Methods and application to human serum proteins //Ann. New York Acad. Sci. – 1964. – V. 121. – P. 404-427.
9. Hamrick J.L., Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species //Plant population genetics, breeding, and genetic resources. (Brown H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. eds.) – 1989. – P. 43-63.
10. Nei M. Genetic distance between populations //Amer. Natur. – 1972. – V. 106. – N. 949. – P. 283-292.
11. Ornstein L. Disk electrophoresis. I. Background and theory // Ann. New York Acad. Sci. – 1964. – V. 121. – P. 321-349.
12. Podani J. SYN-TAX IV: Computer programs for data analysis in ecology and systematics on IBM-PC and Macintosh Computers. Trieste, 1990. – 145 pp.
13. Prakash S., Lewontin R.C., Hubby J.L. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. 1Y. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* //Genetics. -1969. – V.61. – P. 841-858.
14. Swofford D.L., Selander R.B. BIOSYS-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetics and systematics //J. Heredity. – 1981. – V.72. – P.281-283.
15. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating // Evolution. 1965. V. 19. P. 3