

Библиографический список

1. Долматова И.Ю. Генетическая экспертиза племенной продукции. // Сельские узоры.-2006, №1.- С. 16-17.
2. Максимова Л., Петрачкова И., Шульга Л. Использование иммуногенетических маркеров при выведении внутривидового типа айрширского скота //Молочное и мясное скотоводство, 2007, №5. - С.9-12.
3. Охапкин, С.К. и др. Методические рекомендации по использованию групп крови для индивидуального подбора крупного рогатого скота/.М.: ВНИИплем, 1996.-37с.

УДК 638.145

Калашников А.Е.¹, Масленников И.В.², Колбина Л.М.², Удина И.Г.¹

¹ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, ²ГНУ Удмуртский НИИСХ РАСХН

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *APIS MELLIFERA* L. РЕСПУБЛИКИ УДМУРТЯ

Ключевые есть: митохондриальная ДНК; кубитальный индекс; порода; чистопородность; пчелы; *Apis mellifera* L.; вирусы пчел; вирус деформации крыла; вирус мешотчатого расплода; вирус острого паралича; вирус хронического паралича; ассоциации вирусов пчел; варрооз; *Varroa destructor*.

Введение. Пчела медоносная *Apis mellifera* является известной и морфологически и этологически [1]. Пчелы среднерусской породы *A. m. mellifera* L. Широко распространены на территории России, в том числе в республике Удмуртия [2, 3] и Башкортостан [4]. Эти пчелы зимостойки, устойчивы к ряду заболеваний, способны эффективно использовать короткий медосбор. Их хоботок короткий - 6,0–6,4 мм, они темной окраски, отличаются светлой «сухой» печаткой меда, но агрессивны и склонны к повышенному роению. Значение кубитального индекса (КИ) стандарта породы находится в пределах 0,60-0,65 [5].

В России, как и в Европе и Северной Америке, под воздействием антропогенного фактора произошла гибридизация *A. m. mellifera* подвидами медоносной пчелы, распространенными в более южных широтах. Если в Европе произошла гибридизация подвида *A. m. mellifera* в основном с подвидами *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* [6], то в России с подвидами *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. caucasica* [2, 3, 4]. Интрогрессия южных пород не только ухудшает промышленные качества местных северных пород и приспособляемость пчел к природным условиям, но и снижает иммунитет, повышается восприимчивость пчел к заражению эктопаразитами, увеличивается распространенность ряда заболеваний, в том числе вирусного происхождения [7].

Заражение пчел клещом *V. destructor* также является предрасполагающим фактором для инфицирования пчел вирусами [8, 9, 10]. С одной стороны, клещ является резервуаром для векторов вируса, с другой стороны, инвазия клеща ослабляет иммунитет пчел и способствует развитию вирусной инфекции [8, 9]. Из обнаруженных вирусов медоносной пчелы шесть вирусов вызывают тяжелые последствия при инфицировании – гибель пчелиных семей. Это вирусы: деформации крыла (DWV), вирус острого паралича (ABPV), вирус хронического паралича (CBPV), кашмирский вирус (KBV), вирус мешотчатого расплода (SBV), вирус черных маточников (BQCV) [8].

Целью данной работы являлось описание генетического разнообразия пчел популяций республики Удмуртия при помощи морфометрического анализа (по данным анализа кубитального индекса) (КИ), описание генетического разнообразия пчел при помощи анализа митохондриального генома пчелы (мтДНК) для дальнейшей паспортизации основных пород пчел, а также оценка распространенности РНК-содержащих вирусов пчел.

Материалы и методы

В работе использовались рабочие пчелы среднерусской породы с территории Удмуртской республики. При морфометрическом анализе и анализе мтДНК: д. Красный Яр (1UD_S) (N=11), д. Б. Уча (2UD_S) (N=24), д. Моторки (3UD_S) (N=23), г. Ижевск 9 км (4UD_S) (N=8), Воткинский район (5UD_S) (N=7) а при анализе на наличие вирусной РНК N=90 (30 семей, образцы которых объединены в пулы по 3 пчелы в каждом).

Рассмотрение породной принадлежности при помощи морфометрического анализа (КИ) проводили по методике, рекомендованной ГНУ НИИ пчеловодства РАСХН. Значение КИ рассчитывали в долях от единицы (по литературным данным иногда указывается обратная величина 1/КИ, либо КИ в %). [5]. Геномная ДНК выделялась при помощи набора “Diatom DNA prep 400” (Изоген, Россия). Выделение РНК проводили с применением набора “Trizol” (Изоген, Россия). ПЦР мтДНК проводили при помощи набора “ScreenMix” (Евроген, Россия). Так как генетический материал вируса представлен РНК, то на первом этапе ОТ-ПЦР образуется кДНК с помощью фермента обратной транскриптазы. Полученная кДНК служит матрицей на последующих этапах ОТ-ПЦР. Таким образом, определение присутствия вирусной инфекции проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой (ОТ-ПЦР) при помощи набора “GenPack RT-PCR Core” и “ScreenMix” (Изоген, Россия). В реакции ПЦР мтДНК использовали праймеры F-5'-tggcagaataagtcattgaa-3' и R-5'-cagcataatatgaatttgattctga-3' [10]. В реакции ОТ-ПЦР применялись праймеры ABPV F-5'gtgctatcttggactactac-3', R-5'-aaggttttaggttctactact-3'; для BQCV F-5'-agtagttgcgatgtacttcc-3', R-5'-cttagtcttactgccactt-3'; для CBPV F-5'-tgtcgaactgaggatcttac3', R-5'-gacgtattaacgacgttag-3'; для DWV F-5'-attgtgccagattggactac-3', R-5'-agatgcaatggaggatacag-3'; для KBV F-5'-gatgaacgtcgacctattga-3', R-5'-tgtgggttggtatgagta-3'; для SBV F-5'-accaaccgattcctcagtag-3', R-5'-ccttgaactctgctgtga-3' [8].

Определение типа породы (среднерусская против южной породы) проводилось при помощи ПЦР анализа области CO-I/CO-II цитохромоксидазы мтДНК пчел [2, 3, 4, 10]. Эта область мтДНК содержит элемент Р длиной 54 п.н., затем некоторое количество элементов Q, которыми отличаются пчелы южных популяций от северных, и фланкируется 3'- областью гена CO-I и 5'- областью гена CO-II длиной (обе области) 50 п.н. Известно, что в этой области у пчел южных пород содержится один элемент Q (длина 196 п.н.), а у пчел северных популяций два и более элемента Q. Однако признак гаплотипа неоднозначен, индивид может иметь более чем один митотип (гетероплазмия).

Математическую и статистическую обработку результатов проводили при помощи программы "Excel" (Microsoft, США). Обработку фотографий проводили в программе Corel X13 (Corel, США).

Результаты и обсуждение

Отклонения средних значений КИ для южных пород в большую сторону от стандарта [5] предварительно свидетельствуют о метизации с среднерусской породой, а в случае отклонения КИ для среднерусской породы в меньшую сторону, – о метизации последней с южными породами [2, 3, 4, 10]. Однако необходимо учитывать, что среднее значение КИ является средневзвешенной величиной, и не отражает в полной мере факт наличия или отсутствия метизации пород, а лишь в целом характеризует соответствие выборки породы породному стандарту по морфометрическим показателям. Средние значения КИ пчел Удмуртской популяции 14UD_S, 15UD_S, 16UD_S, 17UD_S и 18UD_S также были меньше стандарта породы на 17, 7, 7, 8 и 10% соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Морфометрические показатели и частоты митотипов пчел

№ п/п	№ выборки	N	КИ	Доверительный интервал (P=0,05)	CV	КИ _{мин}	КИ _{макс}	Варианты митотипов		
								350 PQ	546 PQQ	546/796 PQQ/P3xQ
14	1UD_S	11	0,499	±0,037	0,125	0,409	0,600	0,1538	0,8462	
15	2UD_S	24	0,557	±0,040	0,178	0,318	0,750		0,9600	0,0400
16	3UD_S	23	0,557	±0,030	0,132	0,429	0,722		1,0000	
17	4UD_S	8	0,550	±0,034	0,089	0,500	0,632		1,0000	
18	5UD_S	7	0,537	±0,053	0,134	0,450	0,625	0,6000	0,4000	

Дополнительно нами при помощи ПЦР проанализирован участок мтДНК CO-I/CO-II (табл. 1).

Рассмотрим каждую выборку пчел одновременно как с позиции морфометрического (КИ), так и анализа мтДНК, – это позволяет детально выявить степень чистоты породы и выявить уровень метизации пчел в семьях популяции.

Для пчел 1-5UD_S наблюдалась частоты встречаемости КИ в области высоких значений КИ>0,55. По данным анализа мтДНК пчелы 2UD_S, 3UD_S, 4UD_S представляют примеры чистой среднерусской породы. В выборке 2UD_S у одной особи наблюдалась гетероплазмия PQ/p3xQ. Выборки 1 и 5 UD_S оказалась помесными с южными породами (скорее всего, по данным

морфометрии – распределения частот КИ (рис. 1)), с карпатской породой пчел (табл. 1).

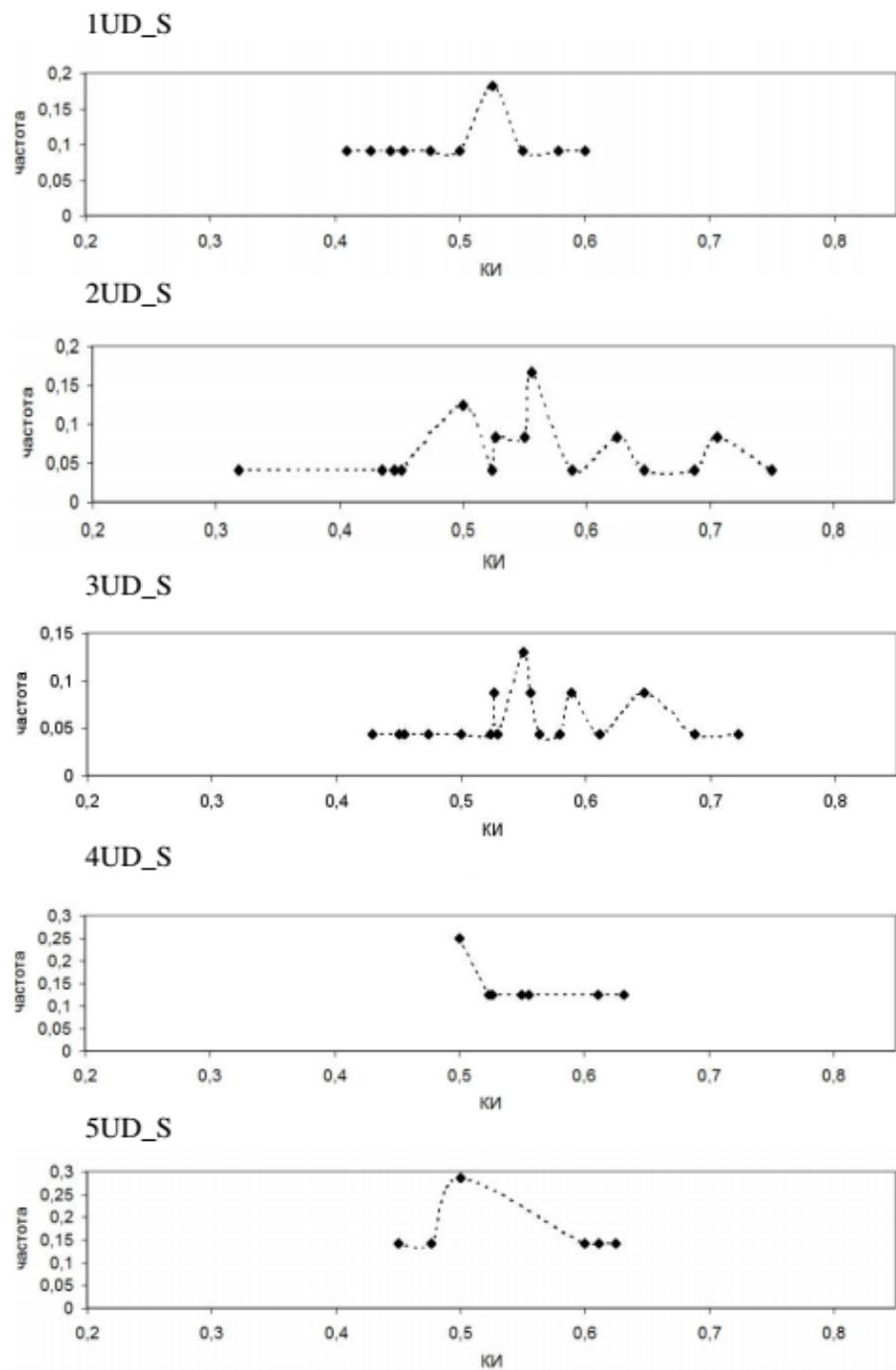


Рисунок 1 Распределение частоты встречаемости КИ в выборках пчел.

Такое же снижение среднего значения КИ до 5,25% при одновременном выявлении митотипа PQ, характерного для южных пород наблюдалось и для урбанизированных районов республики Башкортостан [4] со степенью метизации, достигающей 50%. Однако, как и в удаленных районах со слабой населенностью Удмуртии (выборки 2 и 3), так и для лесных районов Башкортостана (бурзятинская популяция, заповедник Шулган-Таш) [4], имела место высокая степень чистопородности среднерусской пчелы (частота митотипа PQQ не менее 0,99).

Для оценки распространенности РНК-содержащих вирусов в Удмуртии были целенаправленно отобраны образцы биологического материала на пасеках, где погибло не менее 20% пчелиных семей, и не менее 37% из них были поражены варроозом. Обнаружено, что наиболее распространенным вирусом является DWV (7 случаев, 23,3%), который наиболее часто встречается в семьях пчел, пораженных *V. destructor* [8, 9]. В меньшей степени обнаружен ABPV (4 случая, 13,3%) и SBV (4 случая, 13,3%). Количество вирусов, не менее 2-х одновременно обнаруженных составляло 4 случая (13,3%), не менее 2-х 1 случай (3,3%): ассоциации DWV-SBV и DWV-ABPV соответственно.

В работах Береней О. с соавторами и Миранда Дж. с соавторами также выявлены комбинативные инфекции DWV-ABPV, DWV-ABPV-SBV, DWV-SBV-ABPV, DWV-ABPV-SBV-BQCV, DWV-ABPV-BQCV, DWV-SBV, DWV-BQCV, DWV-SBV-BQCV [8, 9]. Известно, что такие комбинации, вероятно, играют значительную роль в распространении явления “коллапса” пчелиных семей (CCD), приводя к высокой вероятности гибели всей пчелиной семьи, особенно в момент весеннего размножения и создавая угрозу для сохранения пчел.

Выводы

Таким образом, нами был проведен анализ чистопородности одновременно при помощи морфометрического анализа и генетического маркера мтДНК, установлена степень чистоты исследуемых популяций с точностью до одной семьи. Выявлено, что не все представленные популяции пчел представляют чистую породу и метизированы. Также обнаружено, что в Удмуртии присутствует инфицирование пчел РНК-содержащими вирусами, приводящими к летальному исходу. В большинстве выборок наблюдается комбинированная инфекция, которая усугубляет эпизоотическую ситуацию, так как опасность гибели пчелиной семьи при комбинированной инфекции возрастает.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России 2009-2013» по Госконтракту «Молекулярно-генетический анализ биоразнообразия растений, животных и человека» 14.740.12.0826 (2011-1.4-501-001).

Библиографический список

1. Кузьмичев В.Е., Гришин О.С. Изучение корреляции морфологических и этологических признаков местной популяции медоносной пчелы // Известия калужского общества изучения природы: книга восьмая. Сборник научных трудов. 2008. КГПУ. С.194-219.
2. Непейвода С.Н., Колбина Л.М., С.Л. Воробьева, Санникова Н.В., Масленников И.В., Ильясов Р.А., Николенко А.Г. Анализ дифференциации популяции *Apis mellifera* в Удмуртии // Пчеловодство. 2011. №10. С.12-13.
3. Колбина Л.М., Непейвода С.Н., Воробьева С.Л., Санникова Н.А., Масленников И.В., Ильясов Р.А., Николенко А.Г. Генетическая дифференциация популяции медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в Удмуртской республике // Аграрная наука Северо-Востока. №6. 2011. С.46-48.
4. 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. Т.34. №11. С.1574-1577.
5. Бородачев А.В., Бурмистров А.н., Касьянов А.И., Кривцова Л.С., Кривцов Н.И., Лебедев В.И., Мартынов А.Г., Соловьева Л.Ф., Харитонов Н.Н. Методы проведения научно-исследовательских работ в пчеловодстве // Рыбное, НИИП. 2002. С.1-154.
6. Guillemaud T., Ciosi M., Lombaert E., Estoup A. Biological invasions in agricultural settings: Insights from evolutionary biology and population genetics // C. R. Biologies. 2011. V.334. P.237-246.
7. Кривцов Н.И., Горячева И.И., Удина И.Г., Бородачев А.В., Монахова М.А. Идентификация пород и популяций медоносной пчелы с использованием метода ПЦР // Сельскохозяйственная биология. 2010. № 6. С.26-29.
8. Berenyi O., Bakonyi N., Derakhshifar I., Koglberger H., Nowotny N. Occurrence of six honey bee viruses in diseased Austrian apiaries // Appl Envir Microbiol. 2006. V.72. N.4. P.2414-2420.
9. Miranda J.R., Cordon G., Budge G. The acute bee paralysis virus- Kashmir bee virus- Israeli acute paralysis virus complex // J Invertebr Pathol. 2010. V.103. N.1. P.30-47.
10. Удина И.Г., Кунижева С.С., Гришечкин А.Е., Калашников А.Е., Учаева В.С., Кривцов Н.И., Злобин В.И. Обнаружение вируса деформации крыла у медоносной пчелы *Apis mellifera* L. на пасеках в Московской области методом ОТ-ПЦР // Вопросы вирусологии. 2010, №5. С.37-40.