

УДК 638.145.3

МАРКЕР-ОПОСРЕДОВАННАЯ СЕЛЕКЦИЯ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ APIS MELLIFERA L.**М.Д. Каскинова, Л.Р. Гайфуллина, Л.Р. Салтыкова, А.Г. Поскряков, А.Г. Николенко***Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, Россия*

Медоносная пчела *Apis mellifera* L. является важным звеном в экологической цепи. Также она имеет особое значение в хозяйственно-экономической деятельности человека как опылитель сельскохозяйственных культур и производитель пчеловодческой продукции. Медоносная пчела представляет собой довольно сложный объект для селекции – необходимо учитывать такие особенности биологии как эусоциальность, гаплодиплоидность и полиандрия. Медоносные пчелы, как большинство перепончатокрылых насекомых, являются гаплодиплоидными организмами – самки развиваются из оплодотворенных яиц и, следовательно, диплоидны, самцы же появляются из неоплодотворенных яиц и имеют гаплоидный набор хромосом, полученный от матери (партеногенез). Исследования последних лет с применением методов генетики показали, что пчелы имеют более сложный механизм определения пола (Beye, Hasselmann, 2003; Beye et al., 2013; Lechner et al., 2013; Zareba et al., 2017). Гетерозиготное состояние одного гена, названного *complementary sex determiner* (*csd*), приводит у медоносной пчелы 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 *csd* в семье появляется большая доля диплоидных трутней (явление генетического пестрого расплода), что приводит к снижению силы семьи. Следовательно, для успешной селекции пчел необходимо разработать комплекс рекомендаций по отбору желаемого признака (или признаков) с сохранением генетического разнообразия гена *csd*. Цель данной работы – разработка метода селекции пчел на основе данных о чистопородности и аллельного разнообразия гена *csd*.

Для анализа аллельного разнообразия гена *csd* были использованы две выборки пчел с разным уровнем контроля размножения. На первой племенной пасеке из Иглинского района Республики Башкортостан (РБ) (15 семей), специализирующейся на разведении *A. m. mellifera*, используются инструментальное осеменение и отцовские семьи разного происхождения. Во второй пасеке из Чишминского района РБ содержатся семьи предположительно *A. m. carpathica* и *A. m. carnica* (44 семьи). Контроль размножения отсутствует, но ежегодно ввозятся новые матки для поддержания генетического разнообразия семей. Отобранные из каждой семьи живые рабочие пчелы трутни фиксировали в 96 % этаноле и хранили до выделения ДНК при – 100 °С. ДНК выделяли из мышц торакса с использованием набора ДНК-ЭКСТРАН-2. Для анализа были выбраны экзон с 6 по 8 гена *csd*. ПЦР-анализ проводили в термоциклере BIO-RAD T100 в объеме 15 мкл с использованием праймеров F-GGGAGAGAAGTTGCAGTAGAG и R-TTGATGCGTAGGTCCAAATCC. Режим ПЦР: 5 мин 94 °С, затем 30 циклов с денатурацией 30 сек при 94 °С, отжигом 30 сек при 54,5 °С, элонгацией 60 сек при 72 °С и конечной элонгацией 7 мин при 72 °С. Определение нуклеотидных последовательностей (секвенирование) амплификатов гена *csd* проводили в фирме Синтол (Москва, Applied Biosystems) с прямым и обратным праймерами, использованными при проведении ПЦР. Подвидовую принадлежность определяли при помощи ПЦР-анализа мтДНК (локус COI-COII) и SSR локусов Ar243, 4a110, A24, A8, A43, A113, A88, Ar049, A28. В качестве сравнительных групп были использованы выборки *A. m. mellifera* из Бурзянского района РБ (N = 123) и Пермского Края (N=136), *A. m. carnica* из Республики Адыгея (N=15), *A. m. caucasica* из Краснодарского края (N=42) и *A. m. carpathica* из Закарпатской области Украины (N=15).

Анализ подвидовой принадлежности показал, что семьи с пасеки Иглинского района имеют умеренную гибридизацию – доля интрогрессии генофонда линии С составила в среднем 23 %. Для чишминской пасеки средняя доля интрогрессии генофонда линии М составила 3 %.

Анализ аллельного разнообразия гена *csd* в 15 семьях иглинской пасеки показал наличие 20 уникальных аллелей. Идентичные аллели обнаружены у семей № 13 и 52; № 43, 61 и 136; № 43 и 63; № 43 и 45. Наличие идентичных аллелей у этих семей объясняется родством этих семей – трутни из семьи № 13 использовались для осеменения маток из семьи № 52, а матки из семей № 43 и 45 являются сестрами. Для избежания появления диплоидных трутней было рекомендовано не использовать совместно сперму трутней из семей с одинаковыми аллелями гена *csd* при искусственном осеменении маток.

В 44 семьях с чишминской пасеки было выявлено 41 аллель, из них 22 редких (т. е. аллели, встречающиеся один раз). Семьи № 2 и 6 имеют одинаковые аллели. Одинаковые пары аллелей обнаружены также в семьях № 4 и 17, № 12 и 27. Когда семьи на пасеке в течение продолжительного времени разводятся «в себе», то это приводит к накоплению семей с одинаковым генотипом, что мы и видим на примере гена *csd*. Генетическая структура данной выборки однородная. На данной племенной пасеке, в отличие от пасеки с *A.m.mellifera*, не используется искусственное осеменение маток. На пасеке, использующей инструментальное осеменение и отцовские семьи разного происхождения, аллельное разнообразие относительно числа проанализированных семей выше, чем на пасеке, где контроль размножения отсутствует.

Таким образом, на основе анализа подвидовой принадлежности и аллельного разнообразия гена *csd* разработаны практические рекомендации по сохранению чистопородности и оптимизации числа семей для каждой отдельной популяции. Показано, что комплексный анализ семей на чистопородность и аллельное разнообразие гена *csd* необходим для племенных пасек, специализирующихся на разведении разных пород и линий пчел и использующих искусственное осеменение маток. Такой подход позволяет комбинировать родительские пары без потери чистопородности семей.

Данная работа позволила создать усовершенствованную схему селекции пчел *Apis mellifera*. Схема включает три основных этапа (рисунок).

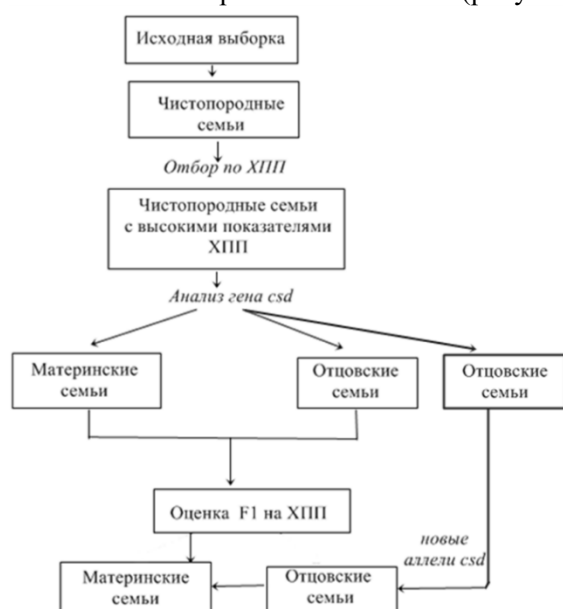


Рисунок Схема селекции медоносной пчелы с применением информации о чистопородности и аллельному разнообразию гена *csd*.

Первым этапом является отбор чистопородных семей подвита *A.m. mellifera* из исходной популяции пчел с использованием полиморфизма межгенного локуса COI-COII мтДНК и 9 SSR локусов яДНК (Ap243, 4A110, A24, A8, A43, A113, A88, Ap049, A28). Второй этап – анализ аллельного разнообразия гена *csd*. На основе данных по аллельному составу гена *csd* 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 *csd*. Если нет возможности применять инструментальное осеменение, то рекомендуется создать несколько отцовских семей вокруг пасеки с материнскими семьями, что позволит создать требуемый трутневый фон. На третьем этапе производится отбор семей по интересующим признакам (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

нежелательного скрещивания. Рекомендуется создать несколько таких пасек для дальнейшего их скрещивания. Отбор по селектируемому признаку (признакам) необходимо проводить в каждом поколении. Данная схема селекции позволит получить семьи пчел с высокими показателями продуктивности.

Работа выполнена в рамках госзадания № 01201350736.

ЛИТЕРАТУРА

- Beye M., Hasselmann M. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the Honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell*. 2003. V. 114. P. 419–429.
- Beye M., Hasselmann M., et al. Gradual molecular evolution of a sex determination switch through incomplete penetrance of femaleness. *Current Biology*. 2013. V.23. P. 2559–2564. doi: 10.1016/j.cub.2013.10.070
- Lechner S., Ferretti L., et al. Nucleotide variability at its limit? Insights into the number and evolutionary dynamics of the sex-determining specificities of the honey bee *Apis mellifera*. *MBE Advance Access published*. 2013. № 29. P. 1–37.
- Zareba J., Blazej P., et al. Uneven distribution of complementary sex determiner (*csd*) alleles in *Apis mellifera* population. *Scientific Reports*. 2017. V. 7. doi:10.1038/s41598-017-02629-9