

МИКРОСАТЕЛЛИТЫ КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ОЦЕНКИ ДИНАМИКИ АЛЛЕЛОФОНДА ПРИ СОЗДАНИИ ПРИОКСКОГО ТИПА СРЕДНЕРУССКОЙ ПОРОДЫ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *Apis mellifera**

Н.А. ЗИНОВЬЕВА¹, Н.И. КРИВЦОВ², М.С. ФОРНАРА^{1, 3}, Е.А. ГЛАДЫРЬ^{1, 3},
А.В. БОРОДАЧЕВ², С.А. БЕРЕЗИН², В.И. ЛЕБЕДЕВ²

Изучалась информативность тест-системы анализа семи микросателлитов (A024, A88, A113, AP043, HB-C16-05, HB-THE-03 и HB-C16-01) для характеристики аллелофонда в популяциях медоносной пчелы среднерусской ($n = 65$), серой горной кавказской ($n = 70$) пород и приокского типа среднерусской породы ($n = 88$). Показано, что среднее число аллелей на локус составляет $7,48 \pm 1,02$, число информативных аллелей — $3,62 \pm 0,71$, эффективных аллелей — $3,38 \pm 0,56$. Установлено повышение генетического разнообразия аллелофонда в приокском типе по сравнению с популяциями среднерусской и серой горной кавказской пород, участвовавших в его выведении (соответственно $9,57 \pm 1,88$ против $6,86 \pm 1,55$ и $6,00 \pm 1,84$). Показана интродукция аллелей исходных пород. Установлено, что 7,9 % аллельного разнообразия приходится на межпопуляционные различия.

Ключевые слова: генетические маркеры, микросателлиты, гетерогенность, породы медоносной пчелы.

Keywords: genetic markers, microsatellites, heterogeneity, honey bee breeds.

Одним из приемов улучшения продуктивных и племенных качеств пчелиных семей служит создание новых породных типов. Селекционными достижениями признаны новые типы — орловский среднерусской породы (1), майкопский карпатской породы (2), краснополянский серой горной кавказской породы (3). Посредством скрещивания маток среднерусских пчел с трутнями серых горных кавказских пчел с последующим использованием инбридинга в НИИ пчеловодства выведен новый высокопродуктивный внутривидовой приокский тип среднерусской породы (4).

Развитие технологий ДНК-маркирования открывает возможности контроля и управления процессами изменчивости, протекающими в популяциях медоносной пчелы. Показано использование маркеров, основанных на случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD), и межмикросателлитных повторяющихся последовательностей (ISSR) в качестве инструмента для оценки дифференциации пород и популяций медоносной пчелы (5, 6), митохондриальных маркеров при выявлении обмена генами между популяциями (7), определении степени чистопородности пчелиных семей по материнской линии (8, 9). Один из наиболее информативных типов генетических маркеров — микросателлиты (7, 10). Показано их прикладное значение в характеристике новых типов животных (11). Информативность методов анализа генома на основе микросателлитов во многом определяется числом и степенью полиморфизма исследуемых локусов. Нами предложена мультилокусная тест-система для генетической экспертизы медоносной пчелы, включающая семь полиморфных локусов (A024, A88, A113, AP043, HB-C16-05, HB-THE-03 и HB-C16-01).

Цель настоящей работы заключалась в оценке информативности предлагаемой тест-системы анализа микросателлитов как инструмента для характеристики аллелофонда медоносной пчелы и определения степени интрогрессии исходных пород у пчел приокского типа.

Методика. Материалом для исследований служили образцы мате-

* Исследования выполнены при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, проекты № 16.512.11.2212 и № 14.740.12.0821.

риала от 88 рабочих пчел приокского типа среднерусской породы. В качестве групп сравнения были использованы рабочие пчелы среднерусской ($n = 65$) и серой горной кавказской ($n = 70$) пород, предварительно оцененные по генетической принадлежности к соответствующей породе (12) и имеющие значение критерия Q в среднем соответственно $98,6 \pm 0,14$ и $99,0 \pm 0,05$ %.

Генотипирование пчел осуществляли с помощью тест-системы для проведения ДНК-экспертизы медоносной пчелы, включающей комплект реагентов для выделения ДНК ДНК-ЭЛЮТ (Россия) и комплект реагентов для генотипирования семи локусов микросателлитов пчел APIS-7 (Россия). Разделение и детекцию продуктов амплификации выполняли на генетическом анализаторе ABI3130xl («Applied Biosystems», США). Расчет популяционно-генетических параметров проводили с помощью программного обеспечения GenAlEx (v. 6.4). Для определения популяционной принадлежности особей по методу J.K. Pritchard с соавт. (12) использовали программное обеспечение Structure (v. 2.3.1), при этом для оценки «долей крови» исходных пород у пчел приокского типа анализ выполняли с указанием числа исходных пород, участвующих в выведении типа ($k = 2$), в то время как для оценки консолидированности аллелофонда нового типа использовали значение показателя k , равное числу исследуемых популяций ($k = 3$).

Данные обрабатывали согласно описанию (13) с применением admixture model и correlation model без введения предварительной информации о популяционной принадлежности особей, используя в качестве порогового значения генетической принадлежности особи к популяции уровень исключения $Q = 75$ %. Расчет генетических дистанций осуществляли по М. Nei с соавт. (14).

Результаты. Анализ аллельных профилей показал, что число аллелей в локусе микросателлитов варьировало от 5 для A024 до 17 для НВ-С16-01. Среднее число аллелей на локус составляло $7,48 \pm 1,02$, число информативных аллелей — $3,62 \pm 0,71$, эффективных аллелей — $3,38 \pm 0,56$. Было установлено более высокое генетическое разнообразие типа приокский по сравнению с исходными породами, участвующими в его выведении: среднее число аллелей на локус равнялось $9,57 \pm 1,88$ против $6,86 \pm 1,55$ и $6,00 \pm 1,84$ в группах пчел соответственно среднерусской и серой горной кавказской породы. Детальный анализ аллельных профилей позволил проследить интродукцию аллелей исходных пород у пчел приокского типа и показал, что повышение аллельного разнообразия у нового типа связано с объединением аллелофонда обеих пород. Так, у пчел серой горной кавказской породы в локусе A024 отсутствовал аллель 103, в локусе НВ-С16-05 — аллель 75, у пчел среднерусской породы не выявлялись аллели 107 и 77 соответствующих локусов, тогда как у пчел приокского типа идентифицировались все перечисленные аллели (рис. 1). Указанием на участие двух пород пчел в создании изучаемого типа служат промежуточные значения частоты встречаемости большинства аллелей микросателлитов. Например, частота встречаемости аллелей 97 и 105 локуса A024, а также аллеля 69 локуса НВ-С16-05 у особей приокского типа равна соответственно 0,256; 0,517 и 0,599, в то время как в группах исходных пород этот показатель составил соответственно 0,531; 0,385 и 0,458 (среднерусская), 0,114; 0,614 и 0,786 (серая горная кавказская) (см. рис. 1). Аналогичные закономерности были выявлены и при анализе аллельных профилей по другим локусам микросателлитов. Таким образом, анализ аллельных профилей по микросателлитам позволяет проследить характер интродукции аллелей исходных

пород при создании новых типов пчел.

Проведенная оценка характера изменчивости аллелофонда микросателлитных локусов с использованием метода анализа молекулярной варiances (AMOVA) показала, что разнообразие аллельных профилей по микросателлитам обусловлено главным образом внутривидовыми различиями (92,1 % в общей изменчивости, в том числе различия между индивидами — 87,4 %, внутри индивидов — 3,7 %), в то время как на межвидовые различия приходится 7,9 % общей изменчивости ($R_{st} = 0,079$ при $p = 0,01$).

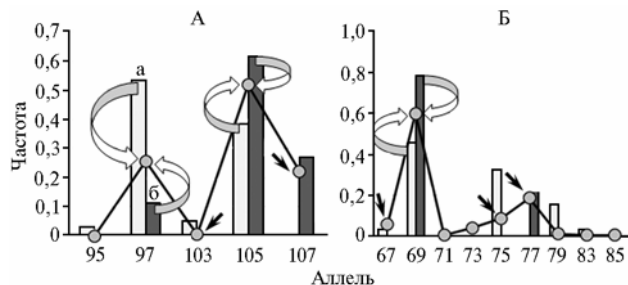


Рис. 1. Аллельные профили пчел приокского типа (график) среднерусской породы и исходных пород, участвовавших в его выведении, по микросателлитным локусам A024 (А) и НВ-С16-05 (Б): а, б — соответственно серая горная кавказская и среднерусская порода. Промежуточный характер изменения частот встречаемости аллелей в группе пчел приокского

типа отражают круглые стрелки; интродуцированные аллели, отсутствующие у одной из исходных пород, отмечены прямыми стрелками.

Анализ наблюдаемой гетерозиготности показал практически полное отсутствие различий между группами пчел приокского типа и серой горной кавказской породы (0,583 против 0,581). Однако высокое генетическое разнообразие у типа приокский нашло отражение в заметно повышенном уровне ожидаемой гетерозиготности (0,711 против 0,529), результатом чего стал существенный дефицит гетерозигот ($F_{is} = 0,177$) на фоне избытка гетерозигот в группе серой горной кавказской породы ($F_{is} = -0,084$). Дефицит гетерозигот при снижении наблюдаемой гетерозиготности (0,385) отмечался также в группе пчел среднерусской породы ($F_{is} = 0,116$). По всей видимости, выявленный дефицит гетерозигот при высоком уровне генетического разнообразия в типе приокский — это следствие использования инбридинга при создании нового типа с целью закрепления желательных экстерьерных и хозяйственно полезных признаков.

Создание нового типа не сводится к простому объединению аллелофондов исходных пород при межпородном скрещивании. На следующем этапе осуществляется разведение «в себе» с отбором в каждом поколении лучших особей, отвечающих целевым требованиям по экстерьеру, поведению и медопродуктивности, что в итоге формирует уникальный аллелофонд создаваемого типа. Проведенная оценка распределения «долей крови» исходных пород у пчел приокского типа по J.K. Pritchard с соавт. (12) с указанием числа популяций, равного числу пород, участвующих в выведении типа ($k = 2$), показала, что «доли крови» среднерусской и серой горной кавказской пород в созданном типе составляют соответственно $29,6 \pm 3,5$ и $71,4 \pm 3,5$ % с вариациями у отдельных особей от 0,6 до 98,7 и от 1,3 до 99,4 % (рис. 2, А). При $k = 3$ среднее значение уровня исключения Q в группе пчел приокского типа равнялось $72,9 \pm 3,3$ % с вариациями у отдельных особей от 0,9 до 98,8 %, при этом у 58 из 88 исследованных особей (65,9 %) значение критерия Q было выше 75 %, что, по мнению D'O. Raffaele с соавт. (13), служит указанием на генетическую изолированность. К собственной популяции относилось 46,6 % особей при $Q = 90$ % (см. рис. 2, Б). Полученные нами данные свидетельствуют о формировании у типа собственного уникального аллелофонда, однако процесс его

генетической консолидации пока не завершен.

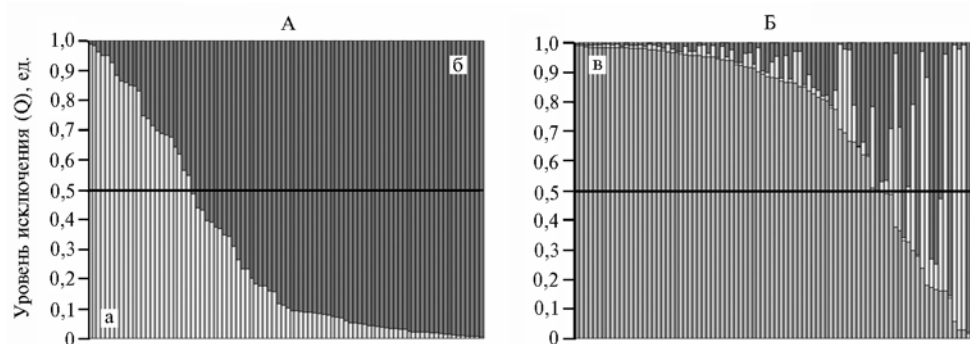


Рис. 2. Результаты анализа популяционной принадлежности индивидуумов в группах пчел исходных пород (А) — среднерусской (а) и серой горной кавказской (б), а также нового породного типа (Б) — приокского среднерусской породы (в), полученного на их основе. Анализ проводили по J.K. Pritchard с соавт. (12) с указанием числа популяций, равного числу пород, участвующих в выведении типа ($k = 2$) (А), и с указанием общего числа исследуемых популяций ($k = 3$) (Б). По оси X индивидуумы ($n = 88$) распределены в порядке снижения значения Q.

Расчет генетических дистанций по М. Nei с соавт. (14) показал большую близость типа приокский к группе серых горных кавказских пчел (0,256), чем к среднерусской породе (0,350). Генетическая дистанция между серыми горными кавказскими и среднерусскими пчелами равнялась 1,055. При парном сравнении популяций пчел серой горной кавказской и среднерусской пород с пчелами типа приокский на основе анализа значений R_{st} выявленные межпопуляционные различия микросателлитных профилей составили соответственно 10,8 и 2,2 % ($p = 0,01$). Различия между серой горной кавказской и среднерусской породами при этом характеризовались величиной 17,2 % ($p = 0,01$). Принимая во внимание селекционную стратегию создания типа, при использовании аллельных профилей микросателлитов в качестве критерия для оценки различий между популяциями показатель R_{st} , по всей видимости, следует считать более объективным.

Таким образом, анализ микросателлитов представляет собой информативный инструмент оценки изменчивости аллелофонда при создании новых типов медоносной пчелы. Изученный нами приокский тип среднерусской породы имеет собственный уникальный аллелофонд, отличающийся от аллелофонда среднерусской и серой горной кавказской пород, участвующих в его выведении. Популяция пчел этого типа характеризуется высоким генетическим разнообразием и относительной изолированностью от исходных пород, однако процесс генетической консолидации типа пока не завершен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гранкин Н.Н. Тип среднерусских пчел орловский. Пчеловодство, 2008, 4: 8-9.
2. Малькова С.А., Василенко Н.П. Майкопский тип карпатской породы. Пчеловодство, 2008, 3: 18-19.
3. Кривцов Н.И., Савушкина Л.Н., Сокольский С.С., Любимов Е.М. Выведение породного типа краснополянский серой горной кавказской породы. Вест. РАСХН, 2008, 5: 69-71.
4. Бородачев А.В., Кривцов Н.И. Новый породный тип пчел «Приокский». Вест. РАСХН, 2000, 4: 70-72.
5. Suazo A., McTiernan R., Hall H.G. Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera* L.) in random amplified polymorphic DNA (RAPD). J. Hered., 1998, 89: 32-36.
6. Sylvestre H.A. Inter-simple sequence repeat restriction fragment length polymorphisms for DNA fingerprinting. Biotechniques, 2003, 34(5): 942-944.

7. Kraus F.B., Franck P., Vandame R. Asymmetric introgression of African genes in honeybee populations (*Apis mellifera* L.) in Central Mexico. *Heredity*, 2007, 99: 233-240.
8. Никоноров Ю.М., Беньковская Г.В., Поскряков А.В. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera mellifera* L. в условиях Южного Урала. *Генетика*, 1998, 34(11): 1574-1577.
9. Кривцов Н.И., Горячева И.И., Удина И.Г., Бородачев А.В., Монова М.А. Идентификация пород и популяций медоносной пчелы с использованием метода ПЦР. *С.-х. биол.*, 2010, 6: 26-29.
10. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.*, 1989, 17: 6463-6471.
11. Стрекозов Н.И., Зиновьева Н.А., Горелов П.В., Листратенкова В.И., Коновалова Е.Н., Чернушенко В.К., Эрнст Л.К. Генетическая характеристика созданных типов скота бурой швицкой и сычевской пород с использованием полиморфизма микросателлитных локусов. *С.-х. биол.*, 2009, 2: 10-15.
12. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, 155: 945-959.
13. Raffaele D'O., Alberto M., Marco L., Robin F.A.M. Genetic characterization of Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica*, based on microsatellite DNA polymorphisms. *Apidologie*, 2007, 38: 207-217.
14. Nei M., Tajima F., Tatenou Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *J. Mol. Evol.*, 1983, 19: 153-170.

¹ГНУ Всероссийский НИИ животноводства
Россельхозакадемии,

142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,
e-mail: n_zinovieva@mail.ru;

²ГНУ НИИ пчеловодства Россельхозакадемии,
391110 Рязанская обл., г. Рыбное, ул. Почтовая, 22,
e-mail: bee@email.ryazan.ru;

³ООО «БИОСТРИМ»,
142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы

Поступила в редакцию
23 августа 2011 года

MICROSATELLITES AS A TOOL FOR EVALUATION OF ALLELE POOL DYNAMICS WHEN CREATION OF PRIOKSKY TYPE OF MIDDLE RUSSIAN HONEY BEE

N.A. Zinovieva¹, N.I. Krivtsov², M.S. Fornara^{1, 3}, E.A. Gladyr^{1, 3},
A.V. Borodachev², S.A. Berezin², V.I. Lebedev²

S u m m a r y

The informative capacity of the test system for the analysis of seven microsatellites (A024, A88, A113, AP043, HB-C16-05, HB-THE-03, HB-C16-01) for the allele pool characteristics of Middle Russian ($n = 65$), Gray Mountain Caucasian ($n = 70$) and Prioksky type of Middle Russian ($n = 88$) honey bee breeds was studied. The average number of alleles, the number of informative alleles and the number of effective alleles per loci were 7.48 ± 1.02 , 3.62 ± 0.71 and 3.38 ± 0.56 , respectively. The increase of allele pool genetic diversity in Prioksky type comparing to Middle Russian and Grey Mountain Caucasian breeds used in type breeding was observed: 9.57 ± 1.88 allele per loci as against 6.86 ± 1.55 and 6.00 ± 1.84 , respectively. The allele introduction of initial breeds was evaluated. It was shown that 7.9 per cent of common microsatellite diversity was due to intra population differences.

Выставки



13-16 октября 2011 года Всероссийский НИИ животноводства (ВИЖ) в качестве экспонента принял участие в 13-й Российской агропромышленной выставке «Золотая осень». По результатам работы выставки институт награжден золотой медалью и двумя дипломами «За активное участие в выставке». Золотой медалью также отмечена лаборатория биологии воспроизводства и трансплантации эмбрионов сельскохозяйственных животных им. В.К. Милованова. В конкурсе «За инновационные разработки в области сельскохозяйственной науки» получены награды: золотая медаль и диплом «За разработку и производство симбиотической лизинсинтезирующей кормовой добавки Проллизэр-БиоР» (совместно с ООО «Биореактор», г. Москва), бронзовая медаль и диплом «За разработку технологии возделывания сорго сахарного на силос в условиях Нечерноземья». В конкурсе «За эффективное информационное обеспечение АПК» получены награды: серебряная медаль и диплом за подготовку научно-практического и учебно-методического пособия «Альбом по искусственному осеменению крупного рогатого скота», бронзовая медаль и диплом за разработку автоматизированной информационной системы «Корма и кормление сельскохозяйственных животных».