

## ПРОБЛЕМЫ ИНТРОДУКЦИИ И ВНУТРИВИДОВОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ *APIS MELLIFERA*

© 2010 М.Б. Удалов<sup>1</sup>, С.Г. Козьминов<sup>2</sup>, Г.В. Беньковская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики УНЦ РАН

<sup>2</sup> Кабардино-Балкарский государственный университет им. Х.М. Бербекова

Поступила в редакцию 23.04.2010

В работе приведены экспериментальные данные по изучению проблемы внутривидовой гибридизации медоносной пчелы *Apis mellifera* на Южном Урале. Для оценки состояния аборигенных, интродуцированных и гибридных семей медоносных пчёл использовались методы полимеразной цепной реакции, а также биохимические параметры стресс-реакции рабочих пчёл.

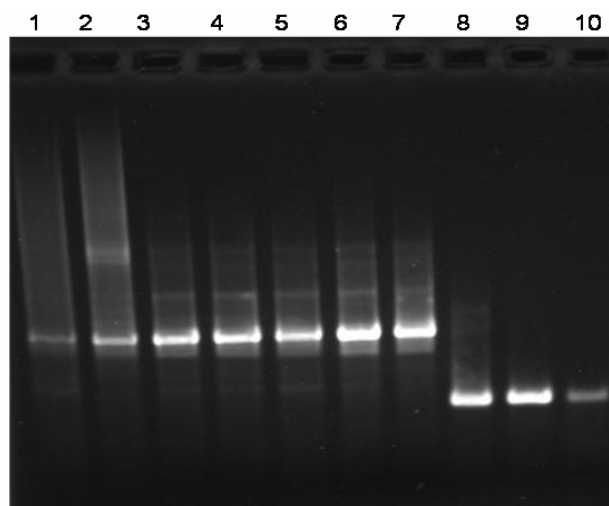
Ключевые слова: медоносная пчела, интродукция, внутривидовая гибридизация

Ареал башкирской популяции среднерусской расы медоносной пчелы *Apis mellifera mellifera* сокращается, и основную часть ареала вида в республике составляет расширяющаяся гибридная зона [3]. Этим процессам активно способствуют изменения экологических условий, связанные с антропогенными воздействиями, а также бесконтрольный завоз на пасеки Республики семей, принадлежащих к южным расам (*A.m. caucasica*, *A.m. carpatica* и другим), отличающимся большей продуктивностью и длительным периодом сбора нектара и пыльцы. Гибридные особи и семьи в большинстве своем хуже переносят длительную зимовку, подвержены заболеваниям. В республике резко снижается продуктивность семей и отмечается большая гибель, как следствие сплошной гибридизации [4].

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов изучался и для ядерной [6], и для митохондриальной ДНК (мтДНК) пчелы [7]. Затем использование метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) позволило выявить различия в структуре межгенного участка мтДНК COI-COII медоносной пчелы, что было использовано нами для оценки генетического полиморфизма в семьях *Apis mellifera* на территории Башкортостана [2]. Лocus COI-COII у расы *A.m. mellifera* с частотой встречаемости более 0,99 представлен аллелем RQQ. У южных рас *A.m. caucasica*, *A.m. carpatica* и др. (основной источник генетического загрязнения башкирской популяции *A.m. mellifera*) аллель Q, возможно, фиксирован. Ожидаемый размер амплифицируемых с использованием специфических праймеров фрагментов мтДНК составлял 350 пн в случае комбинации Q и 600 пн при комбинации RQQ [2]. Как и ожидалось, нами были выявлены различия в размерах амплифицированных

фрагментов мтДНК у *A.m. mellifera* и *A.m. caucasica*. Они составили 600 и 350 пн, соответственно (рис. 1).

Использование метода ПЦР дало возможность более детально исследовать переменный участок мтДНК пчелы [5]. Даже при сравнительно небольшой выборке, описанный выше метод позволяет охарактеризовать каждую семью по вариабельности локуса COI-COII и может быть предложен для анализа расового происхождения по материнской линии *A. mellifera*. В Иглинском районе на племенных пасеках были выявлены семьи, заявленные как чистопородные с принадлежностью к *A.m. mellifera*, и, тем не менее, содержащие мтДНК *A.m. caucasica*. В дальнейшем проверка расовой принадлежности семей медоносной пчелы по мтДНК использовалась как обязательный компонент во всех экспериментах.



**Рис. 1.** Результаты электрофоретического разделения продуктов, полученных при амплификации локуса COI-COII мтДНК *Apis mellifera* L.: образцы 1-7 – *A.m. mellifera* (600 п.н.), образцы 8-10 – *A.m. caucasica* (350 п.н.), образцы 1-5 получены из семей в заповеднике Шульган-Таш (среднерусская раса); 6-8 – с пасек в Иглинском районе; 9 и 10 – с пасеки учхоза БГАУ (кавказская раса)

Интродукция видов и подвидовых группировок насекомых в новых регионах влечет за собой

Удалов Максим Борисович, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории физиологической генетики. E-mail: udalov-m@yandex.ru

Козьминов Сергей Геннадьевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии. E-mail: kozminow@yandex.ru

Беньковская Галина Васильевна, доктор биологических наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории физиологической генетики. E-mail: bengal2@yandex.ru

первоначальный период адаптации к условиям соответствующих эколого-географических зон. Семьи пчел *A.m. caucasica*, интродуцируемые на территории Башкортостана в течение относительно короткого периода, менее адаптированы к условиям Южного Урала, чем аборигенные семьи *A.m. mellifera*, что показали результаты наших экспериментов.

Нами были исследованы тирозиназная и ДОФА-оксидазная активности у пчел среднерусской (*A. m. mellifera* L.) и кавказской (*A. m. caucasica* Gorb.) рас в норме и их распределение в организме имаго рабочих особей. Гибридизация в тех случаях, когда биоценологические условия остаются стабильными, может проявиться и в положительных эффектах (гетерозис), но нельзя забывать о том, что при этом высока вероятность разрушения сложившихся комбинаций и, соответственно, снижения адаптивного потенциала, по крайней мере, на начальном этапе процесса гибридизации.

Для сравнения состояния рабочих особей в чистопородных и метизированных семьях по каждому из биохимических показателей (ферменты фенолоксидазной и гидролазной систем) были проведены измерения в выборках семей средне-

русской, кавказской (по 50 семей) и карпатской (10 семей) рас, а также в выборке из 50 семей гибридных (в ходе пасечного содержания) пчел. Измерения проводились в одних и тех же семьях весной и осенью 2001 и 2002 гг. (табл. 1). В таблице приведены не средние для группы, а максимальные значения параметров, поскольку именно с их помощью удалось выявить существенные различия между группами семей. В зависимости от года и сезона разброс показателей оказался довольно значительным, однако удалось установить существование различий между особями из чистых и гибридных семей практически по всем показателям. Таким образом, эти величины могут служить для предварительной оценки чистопородности семей. Установлено воспроизводимое расхождение в значениях по основным группам ферментов, признанных интегральными показателями состояния у насекомых (лизосомальные гидролазы), либо выполняющих конкретные защитные функции (фенолоксидазный комплекс) в семьях пчел среднерусской расы, аборигенных на территории Башкирии и Южного Урала в целом, и в семьях пчел интродуцируемых южных рас (кавказской и карпатской).

**Таблица 1.** Максимальные значения биохимических параметров (удельная активность в нативных условиях) в семьях пчел из различных групп

Ферменты	Среднерусская раса	Кавказская раса	Карпатская раса	Гибридные семьи
ДОФА-оксидаза	0,01±0,0008	0,01±0,0005	0,012±0,001	0,011±0,001
тирозидаза	0,048±0,003	0,013±0,001*	0,033±0,002*	0,031±0,003*
щелочная фосфатаза	0,81±0,077	1,21±0,1*	1,01±0,08*	1,39±0,09*
кислая фосфатаза	0,89±0,07	1,24±0,012*	2,38±0,17*	0,86±0,066
эстеразы	7,32±0,56	9,42±0,8*	19,7±1,2*	6,9±0,45

Примечание: \* – достоверное ( $P \geq 0.95$ ) отличие от особей среднерусской расы

Существенное отличие, позволяющее дифференцировать семьи кавказской и карпатской рас, отмечено для уровней активности кислой фосфатазы и неспецифических эстераз. У особей карпатской расы эти показатели выше, чем у пчел среднерусской расы почти в 3 раза, тогда как у особей кавказской расы они выше всего в 1,5 раза. Гибридные семьи отличаются от чистопородных по уровню активности щелочной фосфатазы (значения уровня активности выше, чем у пчел среднерусской расы, в 1,7 раз). Следует отметить несовпадение изменений по сравнению с чистопородными семьями. Так, у гибридных особей по сравнению с особями из семей среднерусской расы снижена активность кислой фосфатазы и неспецифических эстераз и повышена активность ДОФА-оксидазы, однако эти отличия статистически мало достоверны. Данный набор биохимических маркеров позволяет дифференцировать не только семьи аборигенной среднерусской расы и южных рас, но и интродуцируемые расы между собой. Возможно также выделение гибридных семей.

О перспективности селекции гибридных семей и семей интродуцентов свидетельствуют достаточно редкие, но наблюдающиеся проявления гетерозиса, что можно продемонстрировать на

примере одного из наших экспериментов с бактериальным препаратом (БТБ). Чаще в аналогичных экспериментах наблюдается отрицательное влияние гибридизации, выражающееся в снижении жизнеспособности взрослых особей в гибридных семьях (табл. 2). Реакция на токсикант (БТБ, 0,5%) у пчел разных рас сопровождается значительно различающимися изменениями активности тирозиназы. Максимальные значения для каждой временной точки стресс-реакции отмечены для среднерусских пчел, при этом профиль динамики активности характерен именно для стрессовой реакции. Изменения активности тирозиназы у пчел кавказской и карпатской рас имеют противоположную направленность и приводят к 3х-кратному снижению ее в конечной точке регистрации. Примечательно, что динамика активности тирозиназы у гибридных особей абсолютно несходна ни с одним из описанных паттернов. Судя по всему это также является следствием дисбаланса генетических комплексов у гибридных особей пчел.

Модель стресс-реакции может служить основой для оценки уровня адаптированности к региональным условиям у аборигенных и интродуцируемых семей разных рас. У особей интродуцируемой расы *A.m. caucasica* изменения локомоторной активности,

динамика активности ферментов фенолоксидазного и гидролазного комплексов достоверно отличаются от таковых для особей аборигенных семей *A.m. mellifera*. Выявленные особенности стресс-

реакции свидетельствуют о том, что семьи интродуцируемых южных рас медоносной пчелы переносят стресс, связанный с акклиматизацией в новых эколого-климатических условиях.

**Таблица 2.** Отрицательные эффекты гибридизации в семьях *Apis mellifera* (2004 г.).

Раса	мтДНК, COI-COII	Длительность жизни без воздействия, сутки	Длительность жизни после воздействия БТБ, сутки	Коэффициент вариации, %
<i>A.m. mellifera</i>	PQQ	16,5 ± 0,5	10,0 ± 1,0*	10,00
<i>A.m. caucasica</i>	Q	16,5 ± 0,5	7,5 ± 0,5*	6,67
Гибридные семьи	PQQ/Q	16,3 ± 0,82	7,83 ± 2,14*	27,33

Примечание: \* – достоверное ( $P \geq 0,95$ ) отличие от контрольных вариантов. Приведены средние значения с ошибкой

Классический путь развития защитной реакции у насекомых на воздействие неблагоприятных факторов, к которым относятся и резкие изменения температуры, в гипотетической форме был описан достаточно давно [1], однако с проблемами адаптированности насекомых это не связывалось. Нами было высказано предположение о существовании различий на подвидовом уровне в механизмах реализации защитных реакций у вида *Apis mellifera* L. Различия между расами медоносной пчелы в контролируемых условиях не слишком велики; но модель стресса, вызванного каким-либо фактором, позволяет сделать эти различия значимыми. Адаптированность пчел башкирской популяции среднерусской расы к региональным условиям и отсутствие такой адаптированности у пчел кавказской расы, относительно недавно интродуцируемой на территории Башкортостана, нашли отражение в последовательности и интенсивности активации компонентов фенолоксидазной ферментной системы в условиях теплового стресса, что особенно наглядно удалось продемонстрировать на фоне влияния аскорбиновой кислоты. Как установлено, рабочие взрослые особи из метизированных семей отличаются в большинстве случаев более низкой устойчивостью к неблагоприятным воздействиям, и в результате – пониженной жизнеспособностью. Параметры стресс-реакции при экспериментальных температурных и токсических стрессах свидетельствуют о снижении согласованности компонентов защитной неспецифической реакции у метизированных особей по сравнению с особями из родительских семей, относящихся к различным расам. Особенности стресс-

реакции в гибридных семьях свидетельствуют о вероятном разрушении коадаптированных генетических комплексов родительских рас. Обнаруженные особенности параметров стресс-реакции могут быть использованы в тестах для оценки состояния и породной принадлежности семей медоносной пчелы на пасеках.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гилмур, Д. Метаболизм насекомых. – М.: Мир, 1968. – 230 с.
2. Никоноров, Ю.М. Использование метода ПЦР для контроля чистопородности пчелосемей *Apis mellifera* L. в условиях Южного Урала / Ю.М. Никоноров, Г.В. Беньковская, А.В. Поскрывков и др. // Генетика. – 1998. – Т.34, №11. – С. 1574-1577.
3. Сатаров, В.Н. Популяционно-генетический полиморфизм башкирской популяции медоносной пчелы *Apis mellifera* L. Дис... канд.биол.наук. – СПб-Пушкин, 2000. – 136 с.
4. Шакиров, Т.Д. Нужны не слова, а дела // Пчеловодство. – 1987. – №12. – С. 9.
5. Cornuet, J.M. Pupative origin and function intergenic region between COI-COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA / J.M. Cornuet, L. Garnery, M. Salignac // Genetics. – 1991. – V. 128. – P. 393-403.
6. Hall, G.H. PCR amplification of a locus with RFLP alleles specific to African honey bees // Biochem. Genet. – 1998. – V. 36, No. 9/10. – P. 351-361.
7. Smith, D.R. Polymorphisms in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) / D.R. Smith, W.M. Brown // Experientia. – 1988. – V. 44. – P. 257-260.

## PROBLEMS OF INTRODUCTION AND INTRASPECIFIC HYBRIDIZATION OF *APIS MELLIFERA*

© 2010 M.B. Udalov<sup>1</sup>, S.G. Kozminov<sup>2</sup>, G.V. Benkovskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics USC RAS

<sup>2</sup>Kabardino-Balkarian State University named after H.M. Berbekov

In work experimental data on studying the problem of intraspecific hybridization of melliferous bee *Apis mellifera* in South Ural are resulted. For an estimation of condition native, introductive and hybrid families of melliferous bees methods of polymerase chain reaction, and also biochemical parameters of working bees stress-reaction were used.

Key words: *melliferous bee*, *introduction*, *intraspecific hybridization*

Maxim Udalov, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Laboratory of Physiological Genetics. E-mail: udalov-m@yandex.ru  
Sergey Kozminov, Candidate of Biology, Associate Professor at the Zoology Department. E-mail: kozminow@yandex.ru  
Galina Benkovskaya, Doctor of Biology, Associate Professor, Senior Research Fellow at the Laboratory of Physiological Genetics