

Сохранение аборигенных (местных) подвидов МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ

Гузенко Елена, кандидат биологических наук
Царь Анастасия, научный сотрудник
Мария Парфенчик, кандидат биологических наук
Институт генетики и цитологии НАН Беларуси
e.guzenko@igc.by
14 февраля 2024 г.

Потеря биологического разнообразия – мировая проблема



Продовольственная и
сельскохозяйственная организация
Объединенных Наций

ПРЕСС-РЕЛИЗ

ПРОДОВОЛЬСТВЕННАЯ И СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ОБЪЕДИНЕННЫХ НАЦИЙ

ФАО: сохранение биоразнообразия и устойчивость взаимосвязаны



©ФАО/Riccardo De Luca

21/06/2023

21/06/2023

Согласно оценкам, численность 42 процентов известных видов наземных животных и растений в Европе и Центральной Азии сократилась за последнее десятилетие. Сейчас как никогда важно сохранять и устойчиво использовать биологическое разнообразие, а также снижать нагрузку на природные ресурсы и экосистемы. Необходимо действовать, чтобы обеспечить здоровье людей и планеты, а также защитить источники средств к существованию сельского и коренного населения стран Европы и Центральной Азии, большая часть которого прямо или косвенно зависит от сельскохозяйственного сектора и играет важнейшую роль в защите мирового биоразнообразия.

Сохранение и устойчивое использование опылителей



CBD



Конвенция о
биологическом
разнообразии

Distr.
GENERAL

CBD/SBSTTA/REC/22/9
6 July 2018

RUSSIAN
ORIGINAL: ENGLISH

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ ОРГАН ПО НАУЧНЫМ,
ТЕХНИЧЕСКИМ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ
КОНСУЛЬТАЦИЯМ

Двадцать второе совещание
Монреаль, Канада, 2-7 июля 2018 года

РЕКОМЕНДАЦИЯ, ПРИНЯТАЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫМ ОРГАНОМ ПО НАУЧНЫМ,
ТЕХНИЧЕСКИМ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ КОНСУЛЬТАЦИЯМ

22/9. Сохранение и устойчивое использование опылителей

Вспомогательный орган по научным, техническим и технологическим консультациям

1. приветствует проект Плана действий на 2018-2030 годы для осуществления Международной инициативы по сохранению и устойчивому использованию опылителей, который приводится в приложении I к настоящей рекомендации;

A1.4 **Контролировать торговлю домашними опылителями и их передвижение** и другие связанные с торговлей виды воздействия A.1.4.1 **Осуществлять мониторинг передвижения видов домашних опылителей**, подвидов и семян и торговли ими между странами и внутри стран; A.1.4.2 Разрабатывать механизмы и содействовать их внедрению с целью ограничения масштабов распространения паразитов и патогенов для популяций домашних и диких опылителей; A.1.4.3 **Предотвращать и минимизировать риски интродукции инвазивных чужеродных видов** (растений, опылителей, хищников, вредителей и патогенов), **представляющих неприемлемые риск для опылителей** и растительных ресурсов, от которых они зависят, и вести мониторинг риска дисперсии для уже интродуцированных видов.



АБОРИГЕННЫЕ ВИДЫ

Аборигенные виды – это растения и животные, которые являются оригинальными обитателями определенной территории.

- Аборигенные виды появились и существуют в данной местности задолго до появления человека, и, благодаря своей уникальности и адаптированности к местным условиям, играют важную роль в экосистеме.
- Устойчивость аборигенных видов заключается в их способности выживать в неблагоприятных условиях. Благодаря уникальным генетическим особенностям у них развились различные механизмы, позволяющие выжить.
- Устойчивость и адаптация аборигенных видов особенно важны в условиях изменения климата и экологического кризиса. Они могут быть ключевыми игроками в сохранении биоразнообразия и восстановлении поврежденных экосистем.
- Инвазивные виды часто конкурируют с аборигенными видами за ресурсы, возможно неконтролируемое размножение, которое приводит к снижению чистоты и численности аборигенных видов.

A.2.1.4 Содействовать генетическому разнообразию и его сохранению внутри популяций домашних опылителей

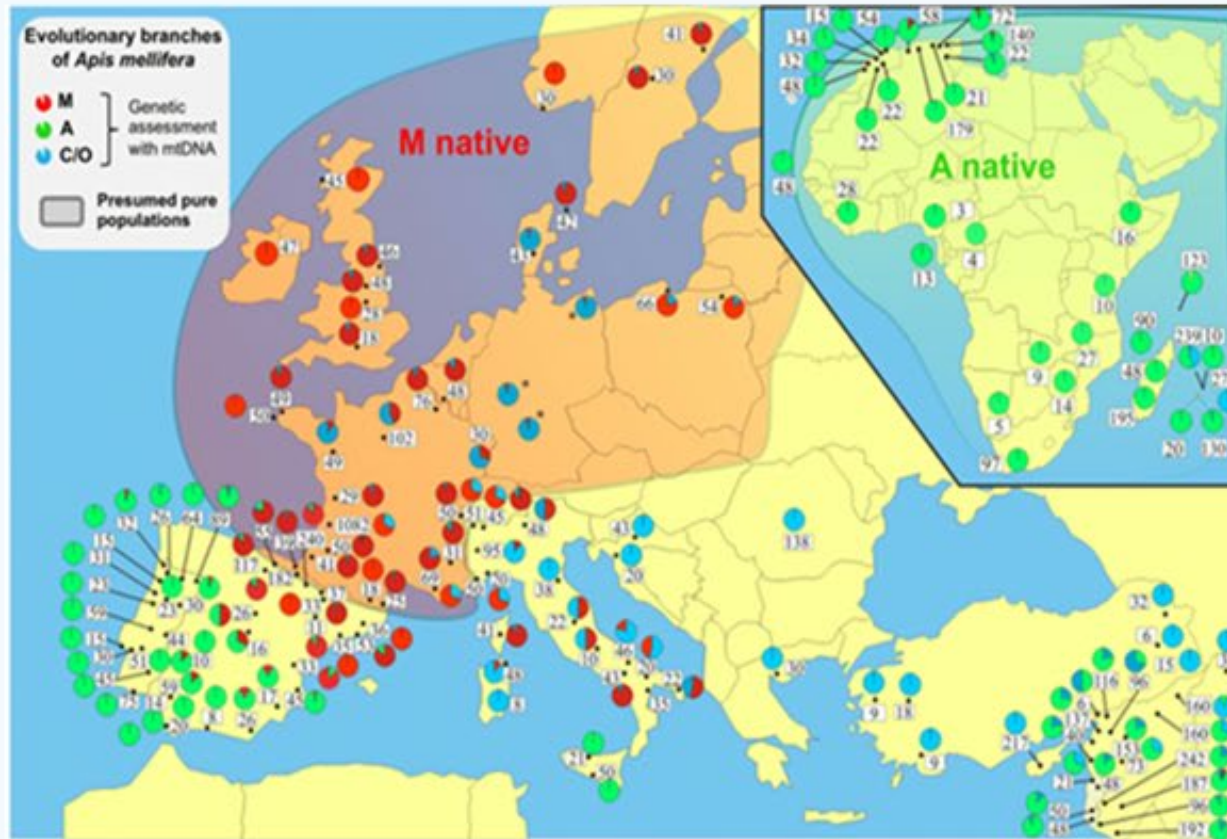


Естественный ареал *Apis mellifera* включает Европу, Африку и Западную Азию

Внутривидовая таксономия не завершена

Эволюционная ветвь	Подвиды	Ареал распространения
A	<i>A. m. sabariensis</i> , <i>A. m. intermissa</i> , <i>A. m. lamarckii</i> , <i>A. m. litorea</i> , <i>A. m. scutellata</i> , <i>A. m. monticola</i> , <i>A. m. adansonii</i> , <i>A. m. unicolor</i> , <i>A. m. capensis</i> , <i>A. m. simensis</i> , <i>A. m. nubica</i>	тропическая Африка
C	<i>A. m. ligustica</i> , <i>A. m. carnica</i> , <i>A. m. carpatica</i> , <i>A. m. macedonica</i> , <i>A. m. cecropia</i> , <i>A. m. sicula</i> , <i>A. m. pomonella</i> , <i>A. m. ruttneri</i> , <i>A. m. caucasica</i>	Средиземноморье, Центральная и Восточная Европа
M	<i>A. m. mellifera</i> , <i>A. m. iberiensis</i> , <i>A. m. sinisxinyuan</i>	Северная и Западная Европа
O	<i>A. m. remipes</i> , <i>A. m. armeniaca</i> , <i>A. m. adami</i> , <i>A. m. meda</i> , <i>A. m. cypria</i> , <i>A. m. anatoliaca</i>	Ближний Восток
Y	<i>A. m. jemenitica</i>	Республика Йемен
Z	<i>A. m. syriaca</i>	Сирия

Apis mellifera mellifera – темная лесная пчела, среднерусская пчела, темная европейская пчела



Из 30 подвидов пчел только *A. m. mellifera* эволюционировал в Северной Европе.

Подвид *A. m. mellifera* встречается на острове Корсика, в Великобритании, Ирландии, Южной Швеции, всей Северной и Западной Европе от Пиренеев и Альп до Урала.

Археологическими данными подтверждено, что темная лесная пчела в 1200 г. н. э. обитала на юге Норвегии.

ВСЁ НАЧАЛОСЬ В 2020 ГОДУ



Холодинский Михаил Михайлович
председатель РОО «Белорусские
пчеловоды»



В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси с 2020 г. ведутся системные молекулярно-генетические исследования медоносных пчел.

«Поиск эффективных ДНК-маркеров для характеристики генетического разнообразия медоносных пчёл (*Apis mellifera* L.), разводимых на пасеках Беларуси» (ГПНИ «Биотехнологии» 2016-2020 гг. подпрограмма 2 «Структурная и функциональная геномика»)

«Изучение генетического разнообразия популяции аборигенной медоносной пчелы Беларуси» (ГПНИ «Биотехнологии-2», подпрограмма «Геномика, эпигеномика, биоинформатика»)



МОРФОМЕТРИЯ

Показано, что организмы могут в течение одного поколения изменить фенотип для того, чтобы адаптироваться к меняющимся условиям окружающей среды и переключиться на избирательно предпочтительный фенотип (Kelly et al., 2012; Duncan et al., 2020, Pfennig and Pfennig, 2012; Wang et al., 2016, 2021).



Точность морфометрического анализа зависит от вида оцениваемых признаков медоносных пчел

Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*

Article in *Journal of Apicultural Research* · September 2013
DOI: 10.1080/00218758.2013.824448

Table 5. Summary of characteristics of the different methods used for identification of honey bee subspecies.

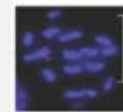
Characteristic	Morphometrics	Allozymes	mtDNA	Microsatellites	SNPs
Number of individuals per colony	10-15	10	1	1 or more (depending on the goal)	1 or more (depending on the goal)
Characters/loci usually screened	Up to 41; wing venation	MDH, ME, EST, PGM, HK, ALP	COI-COII/ <i>DraI</i> , COI/ <i>NcoI</i> / <i>StyI</i> / <i>SspI</i> , <i>NDS/AluI</i> / <i>HincII</i> / <i>FokI</i> , 16s rDNA/ <i>EcoRI</i>	Hundreds available. However, for most studies less than 20 screened (e.g. A7, A24, A28, A88, A113, B124, Ap43, A14, A107, A35, Ap55, Ap66)	Hundreds (1536 for Golden Gate Assay of Illumina) to thousands (with the Infinium Assay of Illumina)
Inheritance	Biparental	Biparental	Maternal	Biparental	Biparental
Dominance		Co-dominant	N/A	Co-dominant	Co-dominant
Polymorphism		Low	Very high in COI-COII intergenic region, otherwise medium to low	Very high	Can be high
Number of alleles		Multi-allelic	Multi-allelic	Multi-allelic	Biallelic
Abundance in the genome		Low		Medium	Very high
Cross-lab/study comparisons	Cross-checking recommended	Easy	Easy	Requires special preparation and cross calibration	Easy
Time to complete lab protocol	Depends on character suite typically 1 sample per day for full suite	1 day	Depends on assay, up to 2 days	1 locus or one multiplex up to 2 days	3 days
Main software packages	SPSS, Systat, Statistica, Morpheus, NTSYS, MORPHO3	GenAlex, Genepop, and others	GenAlex, Genepop, Network, Structure, and others	Genepop, Arlequin, Structure, GenAlex, GeneClass, Adegnet, and other R packages	Plink, Structure, Admixture
Main Equipment	Microscope, camera, measuring software, computer	Centrifuge, Electrophoresis Unit, incubator	Thermal Cycler, Electrophoresis Unit, Centrifuge, Water Bath	Thermal Cycler, Electrophoresis Unit, Centrifuge, Automated Sequencer	Thermal Cycler, Analyst Plate Reader, Hybridisation Oven, Bead Array Reader
Cost of equipment	Low	Low	Medium	High	Very high
Cost of genotyping	Low	Low	Medium	High	Very High



Наши компетенции по анализу ДНК пчёл



Анализ
митохондриального
генома



Анализ ядерного
генома
(различные типы
маркерных систем)

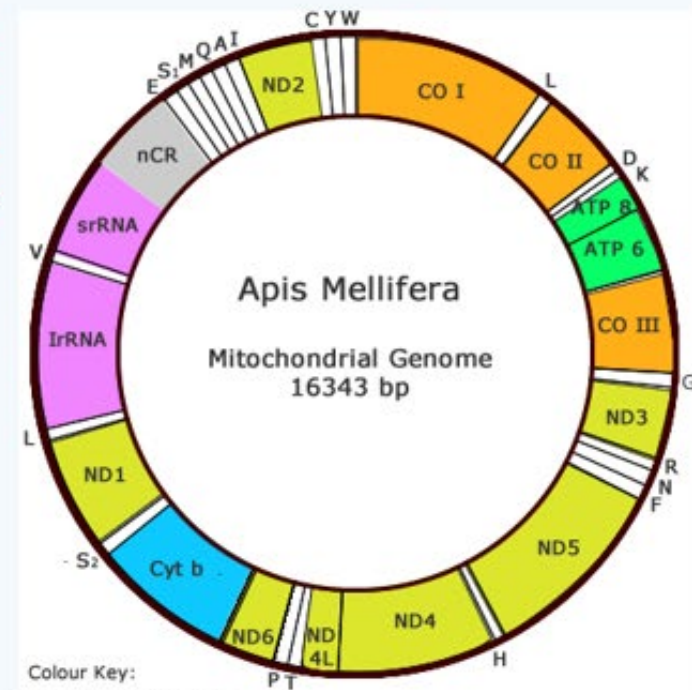
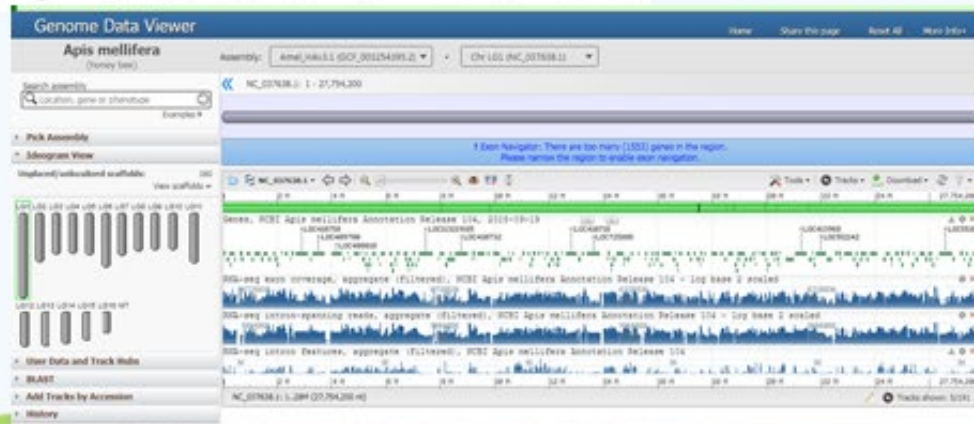
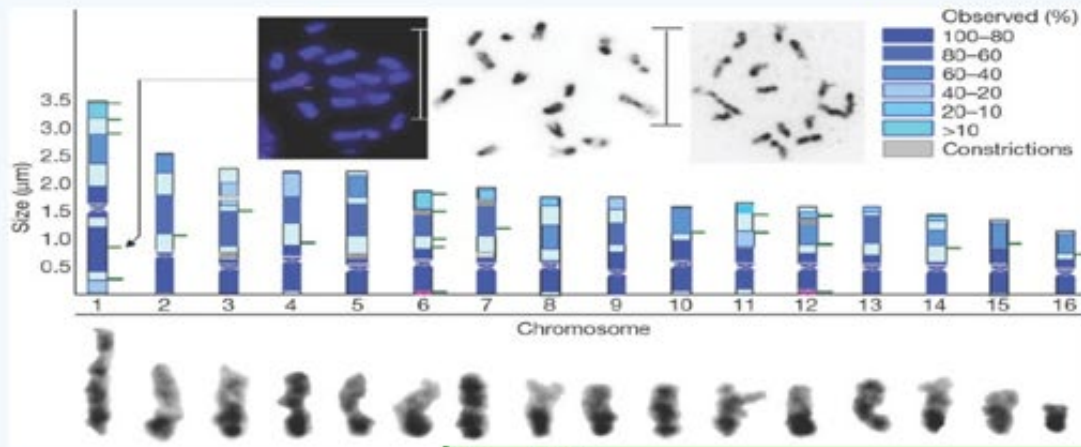


Секвенирование и
сборка
митохондриального
генома

ГЕНОМ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ *A. mellifera*

Ядерный геном - 246 927 000 п.н.,
16 хромосом и содержит 10 157
генов

Размер мтДНК – 16 300 п.н., 37 генов
13 протеин-кодирующих генов
22 гена тРНК
2 гена рРНК
один не кодирующий регион

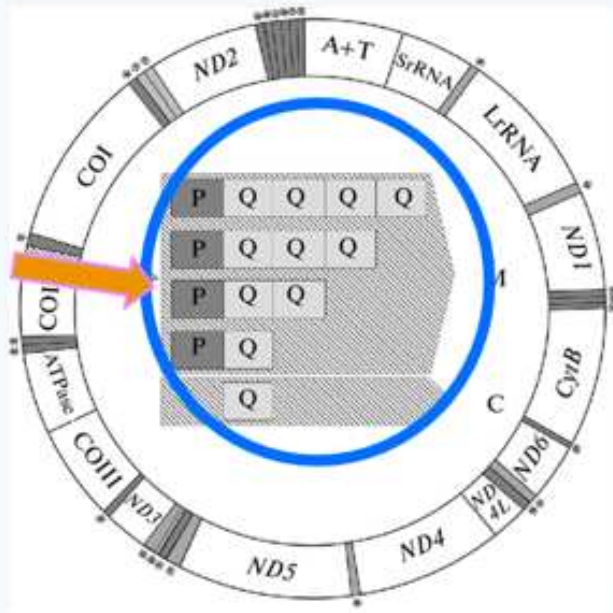


- Colour Key:
- non-coding region
 - 22 genes for t-RNAs are denoted by the one letter code for the corresponding amino acid. (shown on the outside of the circle)
 - 2 ribosomal RNA genes
 - 13 protein-encoding genes:
 - 2 genes for ATP synthesis
 - 1 gene encodes for cytochrome b oxidase
 - 3 genes encode for cytochrome c oxidase
 - 6 genes for NADH dehydrogenase system

Митохондриальный геном

Эволюционные линии

Комбинации элементов Р и Q



Подвиды эволюционной линии С содержат только элемент Q

у южных пород медоносной пчелы (серая горная кавказская, карпатская, итальянская) структура локуса представлена только последовательностью Q.

Подвиды эволюционных линий А, М, О, Y, Z содержат разные варианты элемента Р и от 1 до 5 копий элемента Q

у тёмной лесной пчелы регистрируются несколько вариантов локуса — RQQ, RQQQ, RQQQQ (от 600 п.н. до 1500 п.н.).

Вариабельность длины межгенного локуса COI–COII мтДНК обнаруживается полимеразной цепной реакцией, дополнительный полиморфизм выявляется при ПДРФ-анализе (DraI-тест).

DraI-тест позволяет дифференцировать свыше 100 гаплотипов медоносной пчелы

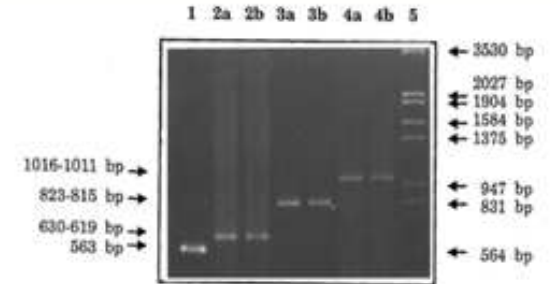


Figure 1. PCR amplification of the COI-COII mtDNA region provides four length categories of fragments corresponding respectively to the following combinations: (1) Q, (2a) PQ, (2b) PQQ, (3a) PQQQ, (3b) PQQQ and (4b) PQQQ. Lane (1) is *λ*(HindIII + EcoRI) as a DNA molecular weight marker.

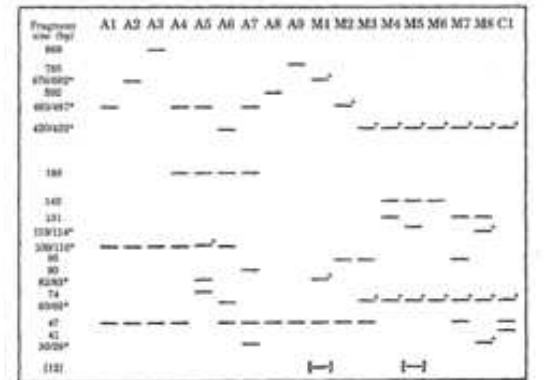
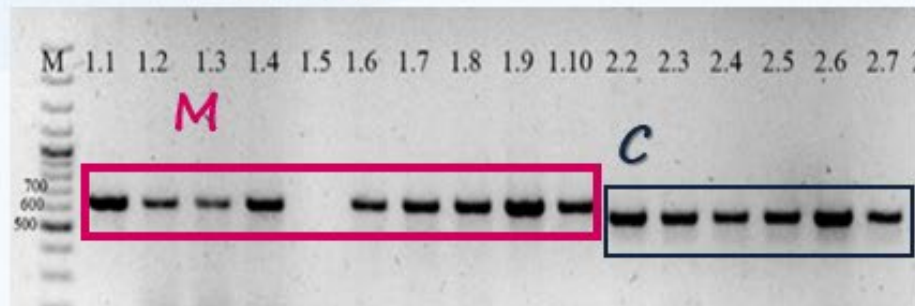


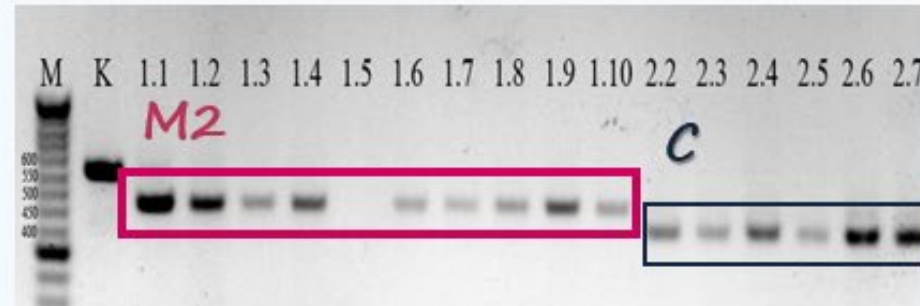
Figure 3. Schematic representation of the 18 *DraI* restriction patterns of the amplified fragment in the honey bee mtDNA COI-COII intergenic region. Patterns A1 to A9 correspond to the African mtDNA lineage, patterns M1 to M8 to the Western European lineage and pattern C1 to the northern Mediterranean lineage. Fragments of similar size have been placed on the same line and noted with/without an asterisk. The 12 bp fragments are enclosed in brackets because they were inferred from sequencing but not observed.

Особенности межгенного региона COI – COII у медоносных пчел Беларуси

Анализ мтДНК рабочих пчёл

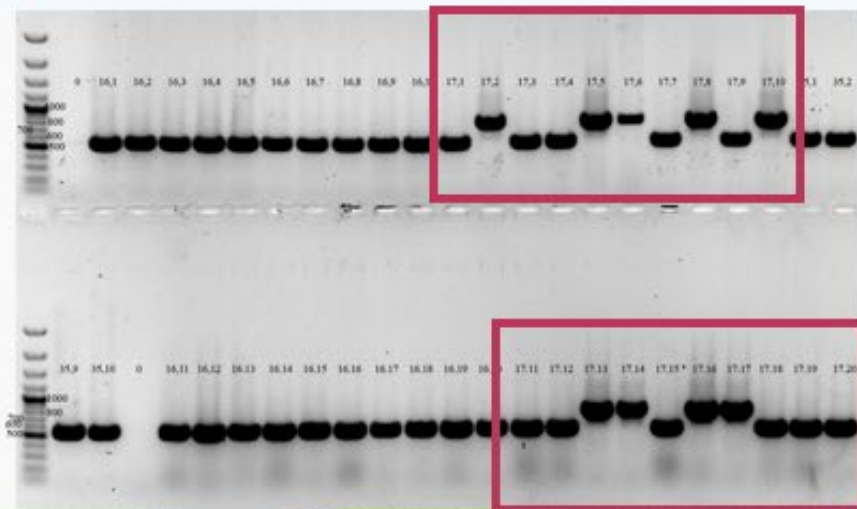


амплификация области мтДНК COI-COII



амплификация локуса COI-COII с последующим ограничением Dral амплифицированного фрагмента

образцы 1.1. – 1.10 соответствуют гаплотипу M2, который характеризуется наличием фрагмента рестрикции 483/487 п.н. и соответствует пчелам западно-европейского происхождения



В пчелосемье 17

у одиннадцати особей амплифицируется фрагмент размером 620 п.н., элемент PQ, *A. m. mellifera* или *A. m. iberiensis* или *A. m. sinisxinyuan*

у девяти особей амплифицируется фрагмент размером 820 п.н., элемент PQQ, *A. m. mellifera* или *A. m. iberiensis* или *A. m. sinisxinyuan*

Анализ ядерного генома позволяет определить экотип, изолят, популяцию, чистопородность, гибридность, уникальность

С 90-х гг. XX в. генетические исследования пчел и других перепончатокрылых насекомых стали проводиться на основе анализа полиморфизма микросателлитных локусов.



У медоносной пчелы описано более 2 000 микросателлитных локусов, из них более 500 являются вариабельными

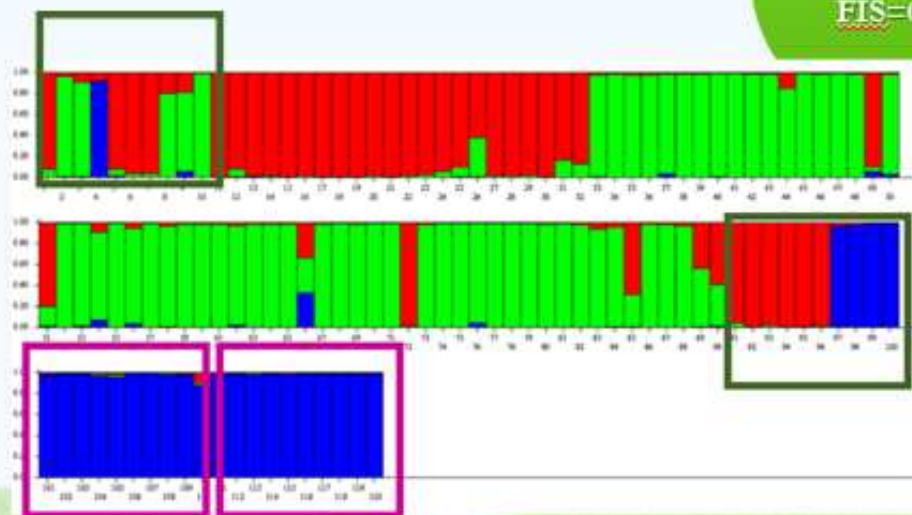
- оценки внутри- и межпородного генетического разнообразия
- характеристики генетических особенностей различных популяций и эволюционных линий медоносной пчелы
- установления уровня интрогрессии между разными линиями пчел
- для изучения особенностей формирования генетического состава пчелиных семей, его временной динамики, в том числе и с учетом особенностей биологии размножения пчел (полиандрии)



Анализ структуры пчелосемей с использованием моделирования в STRUCTURE v.2.3.4

Определен комплекс эффективных микросателлитных маркеров с высоким дифференцирующим потенциалом, с помощью которого возможно достоверно устанавливать чистопородные популяции и помесные.

Точность принадлежности к кластеру варьировала от 79,3% до 99,3%.



Образец		N_a	N_e	I	H_0	H_e	uH_e	F_{is}
семья №1	среднее	5,375	3,696	1,427	0,693	0,706	0,759	0,035
	σ	0,498	0,402	0,098	0,079	0,032	0,034	0,082
семья №2	среднее	6,750	4,463	1,592	0,838	0,743	0,782	-0,131
	σ	1,013	0,661	0,154	0,046	0,034	0,035	0,046
семья №3	среднее	4,125	2,810	1,004	0,534	0,518	0,548	-0,057
	σ	0,811	0,498	0,230	0,131	0,109	0,116	0,143
семья №4	среднее	4	2,966	1,103	0,734	0,602	0,634	-0,222
	σ	0,627	0,477	0,155	0,079	0,056	0,059	0,088
семья №5	среднее	4	2,468	1,038	0,669	0,564	0,594	-0,184
	σ	0,378	0,261	0,095	0,071	0,044	0,046	0,087
семья №6	среднее	5,250	3,244	1,215	0,750	0,597	0,628	-0,211
	σ	0,861	0,579	0,202	0,132	0,082	0,087	0,164
семья №7	среднее	3,875	2,351	0,989	0,639	0,535	0,567	-0,185
	σ	0,398	0,214	0,126	0,100	0,065	0,069	0,107
семья №8	среднее	4,625	2,948	1,169	0,660	0,595	0,627	-0,072
	σ	0,706	0,510	0,158	0,099	0,059	0,062	0,113
семья №9	среднее	4,625	2,877	1,112	0,706	0,563	0,603	-0,250
	σ	0,844	0,454	0,197	0,117	0,087	0,090	0,116
семья №10	среднее	6,500	4,107	1,550	0,688	0,725	0,766	0,060
	σ	0,926	0,526	0,138	0,077	0,036	0,037	0,089
семья №11	среднее	6,625	4,013	1,499	0,650	0,683	0,719	0,082
	σ	0,905	0,650	0,188	0,094	0,065	0,068	0,078
семья №12	среднее	5	3,314	1,322	0,813	0,676	0,712	-0,184
	σ	0,567	0,359	0,111	0,103	0,031	0,033	0,132

Отсутствие дефицита гетерозигот по всем изученным микросателлитным локусам ($H_0 < H_e$) свидетельствует об интенсивном процессе межпородной гибридизации. Данный вывод подтверждает значение индекса фиксации F_{is} (в среднем 0,107). Коэффициент F_{st} в среднем составил 0,213

Темная лесная пчела – аборигенный подвида Беларуси

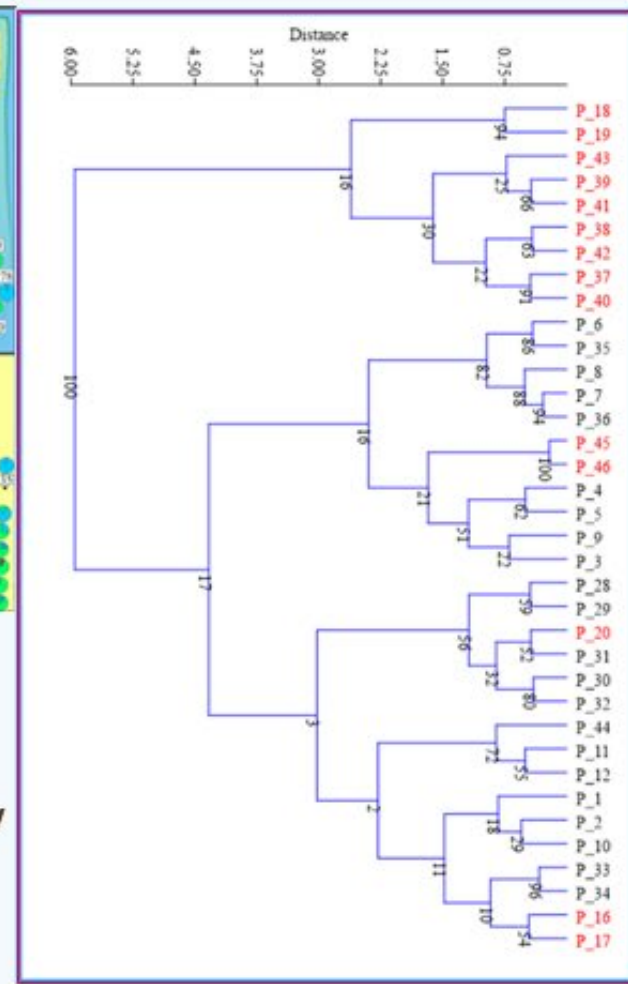
Собран биологический материал и проведен молекулярно-генетический анализ медоносных пчел с территорий Минской, Витебской, Гомельской, Гродненской и Брестской областей Беларуси.

Обнаружены популяции, относящиеся к эволюционной линии М – *A. m. mellifera* (темная лесная пчела).

Установлено, что митотип популяций темной лесной пчелы Гомельской области отличается от митотипа популяций темной лесной пчелы Витебской области.

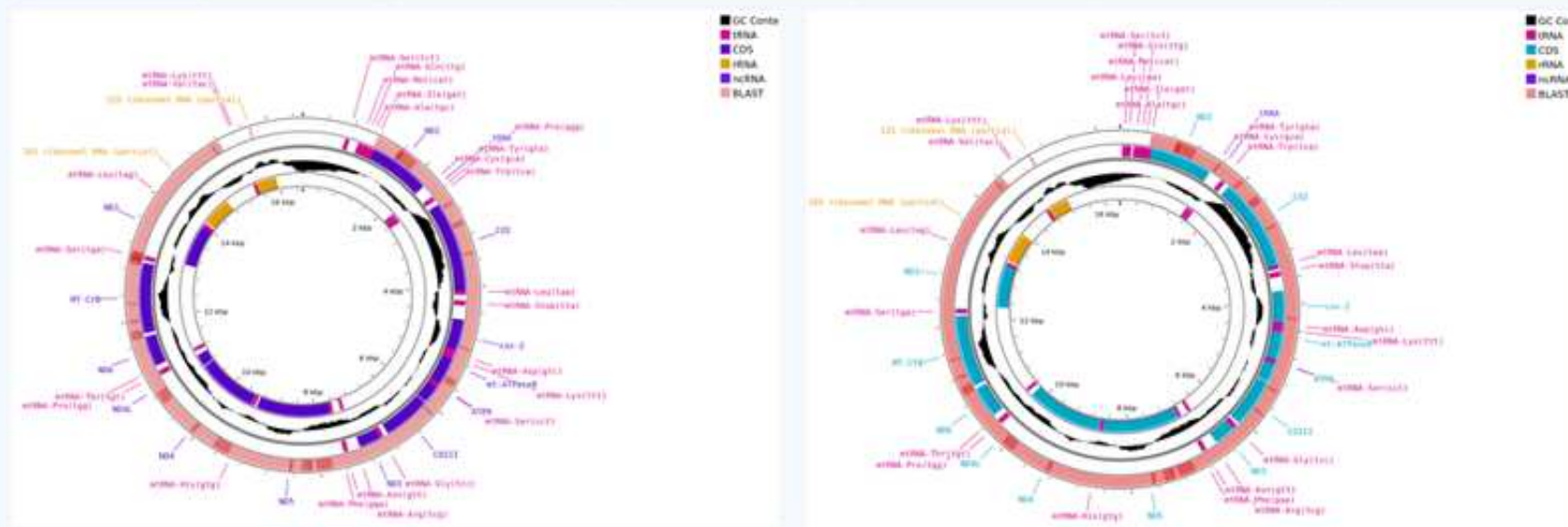


Генетические расстояния между исследуемыми пчелосемьями эволюционных линий С и М

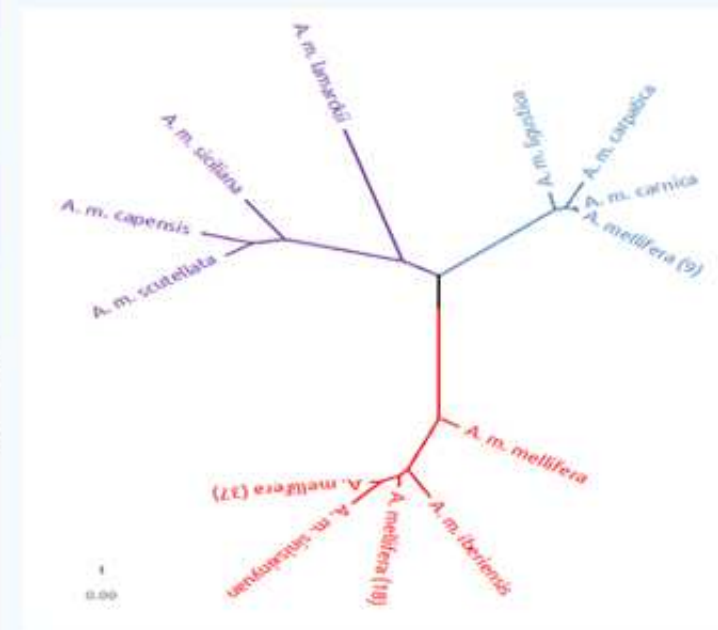


Результаты секвенирования мтДНК

Референс	NCBI BLAST, % <u>идентичности</u>			Корректно картированные прочтения, %		
	KY926884 <i>A.m.mellifera</i>	OK075087.1 <i>A.m.iberensis</i>	MN733955.1 <i>A.m.sinisxinyuan</i>	KY926884 <i>A.m.mellifera</i>	OK075087.1 <i>A.m.iberensis</i>	MN733955.1 <i>A.m.sinisxinyuan</i>
family_18	99.29	99.68	99.31	94.55	94.56	94.50
family_37	99.23	99.62	99.70	96.26	96.18	96.27



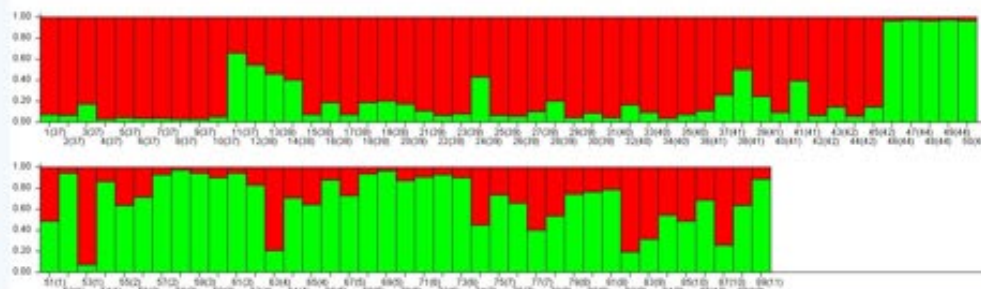
Физические карты полной последовательности референсного образца и исследуемого образца из семьи 18
(а - OK075087.1 - *A. mellifera iberensis*, б - KY926884 - *A. mellifera mellifera*)



Филогенетические отношения представителей *A. m. lamarckii*, *A. m. scutellata*, *A. m. capensis*, *A. m. siciliana* (эволюционная линия А); *A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. carpatica* (эволюционная линия С); *A. m. mellifera*, *A. m. iberiensis*, *A. m. sinisxinyuan* и исследуемых образцов белорусских популяций (*A. mellifera* (9), *A. mellifera* (18), *A. mellifera* (37)) на основе кластерного анализа полной последовательности мтДНК

Практическое применение результатов наших работ

С использованием данных молекулярно-генетического анализа на территории ГПУ «Национальный парк «Беловежская пуща» **создана пасека как резерват для сохранения генофонда автохтонной пчелы.**



Номер семьи
Заказник «Котра» № 7
Заказник «Котра» № 8
НП «Припять» № 1
Заказник «Котра» № 6
НП «Припять» № 3

Полученные результаты служат основой мероприятий по изучению и сохранению уникального генофонда аборигенной медоносной пчелы в республике, созданию зон чистопородного разведения *Apis mellifera mellifera*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ



CBD



Конвенция о
биологическом
разнообразии

Distr.
GENERAL

CBD/SBSTTA/REC/22/9
6 July 2018

RUSSIAN
ORIGINAL: ENGLISH

- Сообщается, что в Латинской Америке нашествие чужеродных пчёл является вторым по значению фактором сокращения популяций местных пчел.
- В Японии интродуцированные пчёлы представляют проблему для природных сетей опыления.

Конвенция о биологическом разнообразии говорит о существовании срочной необходимости в создании и согласовании правил торговли домашними опылителями, с тем чтобы текущие и возникающие риски были обнаружены почти в реальном времени и на границах ареалов, позволяя принимать ответные меры.



**Благодарю за
внимание**

e.guzenko@igc.by