

На правах рукописи



Островерхова Надежда Васильевна

**МЕДОНОСНАЯ ПЧЕЛА *APIS MELLIFERA* L. В СИБИРИ:
БИОРАЗНООБРАЗИЕ, ЭПИДЕМИОЛОГИЯ БОЛЕЗНЕЙ
И АСПЕКТЫ СЕЛЕКЦИИ**

03.02.04 – Зоология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Томск – 2018

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Кучер Аксана Николаевна

Официальные оппоненты:

Бородачев Анатолий Владимирович, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр пчеловодства», направление селекции и разведения медоносных пчёл, главный научный сотрудник

Бугров Александр Геннадьевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт систематики и экологии животных Сибирского отделения Российской академии наук, лаборатория филогении и фауногенеза, ведущий научный сотрудник

Осинцева Любовь Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет», кафедра биологии, биоресурсов и аквакультуры, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Защита состоится 27 декабря 2018 года в 14 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 212.267.09, созданного на базе федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 36 (Главный корпус ТГУ, аудитория 224).

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на официальном сайте федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет» www.tsu.ru.

Материалы по защите диссертации размещены на официальном сайте ТГУ: <http://www.ams.tsu.ru/TSU/QualificationDep/co-searchers.nsf/newpublicationn/OstroverkhovaNV27122018.html>

Автореферат разослан «___» октября 2018 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук, доцент



Симакова
Анастасия Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Исследование медоносной пчелы *Apis mellifera* L., как экологически и экономически значимого вида, является актуальной и необходимой задачей и в России, и в мире. Медоносная пчела – один из основных видов насекомых-опылителей (опыляют около 85% всей цветковой флоры), поэтому как ресурсный вид представляет огромный научный и практический интерес (Кривцов, 2011; Лебедев и др., 2015; Pritchard, 2006; Danner et al., 2017). Актуальность исследования различных аспектов биологии медоносной пчелы лишь возрастает в связи с тем, что в последние годы во всем мире, включая Россию, намечаются негативные процессы в популяциях медоносной пчелы: снижается уровень приспособленности семей к факторам окружающей среды, в частности отмечена массовая гибель пчел во всем мире (Гробов и др., 2009; Салтыкова и др., 2011; Саттаров и др., 2014; vanEngelsdorp et al., 2017); во многих регионах наблюдается бессистемный и бесконтрольный завоз и воспроизведение семей разных пород, что привело к массовой гибридизации пчел, дизадаптации семей и потере их чистопородности (Монахова и др., 2009; Ильясов, 2016; Jensen et al., 2005; Pinto et al., 2014; Lee et al., 2015); изменяется кормовая база медоносных пчел в связи с появлением новых интродуцированных растений.

Процессы бесконтрольной гибридизации пчел связаны с массовой гибелью пчелиных семей: уровень приспособленности гибридных семей к условиям окружающей среды снижается, гибриды характеризуются пониженным иммунитетом и меньшей устойчивостью к паразитам и патогенам, пестицидам и различным абиотическим стрессогенным факторам, что может приводить к гибели пчел (Genersch et al., 2010; Higes et al., 2010; Van Der Zee et al., 2013; Gisder et al., 2017). Так, одной из основных причин коллапса пчел рассматриваются именно болезни пчел и снижение иммунитета пчелосемьи (Dainat et al., 2012; Dietemann et al., 2012; Budge et al., 2015; Chauzat et al., 2016). Среди факторов, обуславливающих гибель пчел в зимний период в Европе, чаще обсуждаются клещ *Varroa destructor* Anderson et Trueman (как переносчик вирусных инфекций) и микроспоридия *Nosema ceranae* Fries, 1996 (возбудитель нозематоза типа С), однако роль этого паразита в определении приспособленности медоносной пчелы остается спорной (Chen et al., 2010; Fries, 2010; Paxton, 2010; Bourgeois et al., 2015; Gisder et al., 2017). Кроме того, вследствие гибридизации происходит потеря уникальных генофондов аборигенных подвидов и чистопородности пчел (Кривцов, 2008; Саттаров, 2011). В настоящее время в Европе один из уникальных подвидов медоносной пчелы – темная лесная пчела *Apis mellifera mellifera* L., признан исчезающим (Jensen, Pedersen, 2005; Muñoz et al., 2015). В связи с вышесказанным, вопрос сохранения популяций и генофонда *A. mellifera* приобретает биосферное значение.

В России межпородная гибридизация пчел также достигла угрожающих масштабов, поэтому важной проблемой в пчеловодстве является сохранение генофондов отечественных популяций (пород, подвидов) пчел (Гранкин, 1997; Плахова, 2003; Удалов и др., 2010; Саттаров, 2012; Гранкин и др., 2016). Россия пока обладает уникальными возможностями для сохранения аборигенных популяций медоносной пчелы (Кривцов, 2008; Бородачев, Савушкина, 2012).

Значительный интерес представляет среднерусская порода *A. m. mellifera*, рекомендованная к разведению на большей территории России, особенно в регионах с суровыми природно-климатическими условиями (Урал, Сибирь, Дальний Восток), как наиболее адаптированная к низким температурам, продолжительной зиме и устойчивая к ряду заболеваний (Бородачев, Савушкина, 2015). В России известны две крупные популяции среднерусской пчелы: бурзянская (Башкортостан) и енисейская (Красноярский край), которые могут быть использованы для восстановления генофонда среднерусской пчелы (Темная лесная пчела..., 2016). По состоянию селекционно-племенной работы, количеству и качеству племенной продукции, продуктивности семей, ветеринарному благополучию в России аттестовано около 20 племенных хозяйств, занимающихся разведением среднерусской породы (Кривцов, Лебедев, 2011; Бородачев, Савушкина, 2015). В Сибири племенных хозяйств нет.

В связи с этим, особую значимость приобретают исследования медоносной пчелы в Сибири. Если бурзянская популяция активно изучается в течение длительного времени в разных направлениях (биологическом, генетическом, экологическом и др.) (Николенко, Поскряков, 2002; Саттаров, 2011; Ильясов, 2016; Шарипов, 2016; Юмагузин, 2018), то данные по сибирским (енисейской) популяциям единичны (Бородачев и др., 2013; Люто и др., 2015, 2016).

Важным условием сохранения генофонда *A. mellifera* является четкая идентификация породной принадлежности пчел (Fransis et al., 2014). Однако, используемые для этой цели морфометрические признаки мало информативны в условиях гибридизации пчел, а анализ мтДНК позволяет установить происхождение семьи только по линии матки. Для дифференциации подвидов медоносной пчелы необходим поиск диагностических ДНК-маркеров ядерного генома. Изучение современного состояния разнообразия *A. mellifera* в разных регионах России, поиск информативных породо-специфичных, адаптивно-значимых и ассоциированных с хозяйственно-полезными признаками ДНК-маркеров является важным условием сохранения популяций медоносной пчелы (включая среднерусскую пчелу), а также представляет собой научную основу для селекционной работы. Вместе с тем, такие исследования популяций *A. mellifera* в России немногочисленны, а молекулярно-генетические и/или комплексные исследования, включающие оценку биологических, генетических, экологических, хозяйственно-ценных признаков – единичны (Кривцов, Гранкин, 2004; Форнара, 2012; Калашников, 2013; Ильясов, 2016). В Сибири изученность медоносных пчел недостаточна, а имеющиеся данные фрагментарны и не дают целостного представления о породном составе, текущем состоянии популяций и их генофонда, что является препятствием для более полного понимания путей развития популяций *A. mellifera*, реальной оценки процесса гибридизации пчел и его последствий, решения задач практического пчеловодства.

В связи с вышесказанным, **цель диссертационной работы** – на основе комплексного подхода выявить биологическое разнообразие и адаптационный потенциал медоносной пчелы *Apis mellifera* Сибири и разработать научно-обоснованный алгоритм селекционной работы.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Выявить породный состав медоносных пчел, обитающих в Сибири, и описать их разнообразие по комплексу молекулярно-генетических маркеров митохондриального и ядерного генома.

2. Изучить особенности формирования разнообразия (вариабельность морфометрических и молекулярно-генетических показателей) гибридных семей в популяциях со смешанным породным составом.

3. Оценить информативность морфометрических и молекулярно-генетических данных для дифференциации подвидов медоносной пчелы.

4. На основании сравнительного анализа разнообразия пчел среднерусской породы (темной лесной пчелы), обитающих в различных географических регионах, определить маркеры, потенциально значимые для адаптации к различным экологическим условиям обитания (маркеры экотипов).

5. Охарактеризовать зараженность пчелиных семей и пасек Сибирского региона паразитами и патогенами.

6. Выявить возможные причины массовой гибели пчел на пасеках и оценить влияние различных факторов (географических, климатических, генетических) на распространение возбудителя нозематоза *Nosema ceranae*.

7. Провести поиск маркеров, ассоциированных с параметрами продуктивности и устойчивости к заболеваниям у медоносных пчел различной породной принадлежности.

8. Разработать научно-обоснованный алгоритм проведения селекционной работы по отбору и разведению семей, адаптированных к определенным природно-климатическим условиям и обладающих высокими хозяйственно-значимыми показателями.

Необходимость решения этих задач потребовала тщательного изучения медоносных пчел на пасеках разных регионов Сибири.

Научная новизна. В работе впервые с использованием комплексного подхода, включающего анализ ДНК-маркеров митохондриального и ядерного геномов и данные морфометрического исследования, представлены сведения о биологическом разнообразии медоносных пчел *A. mellifera*, обитающих в Сибири. Оценен адаптационный потенциал медоносных пчел, прежде всего среднерусских пчел Сибири, как особого экотипа *A. mellifera mellifera*. На основе полученных результатов разработан и апробирован научно-обоснованный алгоритм селекционной работы в Томской области и в пчелопитомнике (Алтайский край).

Впервые идентифицирован возбудитель *Nosema ceranae* на пасеках Томской области и Красноярского края с использованием молекулярно-генетических методов и изучено распространение паразита в разных экологических регионах Северной Азии. В исследовании зараженности спорами *Nosema Naegeli*, 1857 медоносных пчел использован оригинальный подход – анализ пчелиной семьи на разных уровнях индивидуальности (на уровне целой семьи путем анализа пула пчел и на уровне отдельных особей). Впервые в России проведен поиск генетических факторов, обуславливающих различную восприимчивость пчел к паразитам и патогенам.

Теоретическая значимость. Работа вносит вклад в изучение биологии и генетики медоносной пчелы, эпизоотологии болезней *Apis mellifera* и паразито-хозяйинных отношений «микроспоридии – медоносная пчела». Получены новые данные в области систематики медоносной пчелы, а именно, по информативности разных методов исследования (морфометрического, молекулярно-генетических) для идентификации подвидов *A. mellifera*, относящихся к эволюционным линиям М и С; о статусе *A. mellifera carpatica*; о сибирском экотипе *A. mellifera mellifera* на основании данных анализа микросателлитных локусов. Обобщены данные по заболеваемости медоносных пчел паразитами и патогенами на пасеках Сибири с акцентом на различных аспектах нозематоза (многолетняя и сезонная динамики зараженности медоносных пчел паразитами, паразито-хозяйинные отношения и межвидовые взаимоотношения микроспоридий, роль абиотических факторов в распространении возбудителей).

В целом, в итоге 10-летних исследований впервые приведены обобщенные данные по современному состоянию популяций медоносной пчелы в Сибири с учетом биологических (породный состав, заболеваемость/устойчивость к болезням и др.) и генетических (генетическое разнообразие по мтДНК и микросателлитным локусам, процесс гибридизации пчел и уровень интрогрессии генов эволюционной линии С в М-линию) особенностей, а также хозяйственно-значимых показателей семей (сила семьи, медопродуктивность, продуктивность маточного молочка). Используемый комплексный подход к изучению медоносной пчелы, основанный на анализе различных характеристик пчелиных семей, может быть рекомендован для изучения популяций в других регионах страны, а также других групп насекомых, что может быть полезным при современной тенденции перехода исследований на молекулярно-генетический уровень.

Общебиологический интерес представляют новые данные по биоразнообразию и адаптивной ценности медоносных пчел в Сибири, а также характеристика процесса гибридизации пчел разных эволюционных линий. Разработанные положения развивают и уточняют учение о биологической эволюции, в частности о паразито-хозяйинных отношениях и межвидовых взаимоотношениях микроспоридий. Обобщения, сделанные на изученном материале, могут быть использованы в филогенетике, паразитологии, генетике и экологии насекомых.

Практическая значимость работы состоит в том, что значительно расширены сведения о породном составе медоносной пчелы *A. mellifera* и распространении подвидов на территории Сибири. Составлены карты распределения чистопородных и гибридных семей и пасек в Томской области. Установлена локализация популяции среднерусской пчелы в Красноярском крае (енисейская популяция) и пасек на территории Томской области, Алтайского края и Республики Алтай, где обнаружен подвид *A. m. mellifera*.

Сформирован банк ДНК и образцов пчел от более 500 пчелиных семей, полученных с пасек Сибири в течение 2008–2017 гг., с различными

характеристиками (разного происхождения, условно здоровых и зараженных болезнями, с различными хозяйственно-значимыми показателями).

Разработана шкала длин фрагментов ДНК (стандартная аллельная лестница) по 30 изученным микросателлитным локусам для *A. m. mellifera* сибирских популяций (Томская область, Красноярский и Алтайский края) и двух подвидов южного происхождения (*A. m. carpatica* и *A. m. carnica*), что позволит генотипировать пчел и выполнять внутри- и межпородные сравнения, проводить временной и пространственный мониторинг их генофондов. Выявлены породо- и эко-специфичные локусы, которые могут быть использованы в качестве диагностических маркеров в системе оценки породности и качества пчелосемей.

На основании полученных данных по оценке генетического разнообразия медоносных пчел разного происхождения и различной географической локализации (анализ геномного полиморфизма с использованием микросателлитных ДНК-локусов, маркирующих биологические и хозяйственно-значимые показатели) разработан алгоритм проведения селекционно-племенных работ по отбору и разведению семей, адаптированных к определенным природно-климатическим условиям. Выявлены регионы хромосом, которые могут представлять интерес для дальнейшего поиска конкретных генов, определяющих хозяйственные показатели пчелиных семей. Разработаны научные основы сохранения популяций медоносных пчел среднерусской породы, в том числе система оценки качества пчелиных семей для проведения генетической паспортизации среднерусской породы и создания племенного ядра в пчелопитомниках среднерусской породы на территории Сибири.

Выявлен спектр основных паразитов и патогенов, встречающихся у медоносных пчел на территории Томской области. На основании данных по зараженности медоносных пчел паразитами и патогенами составлены карты распространения основных болезней на пасеках разных районов Томской области. Выявлены наиболее проблемные территории – очаги заболеваемости, где в первую очередь необходимо проведение мониторинговых исследований.

Результаты изучения многолетней и сезонной динамики зараженности болезнями пчелосемей с учетом видового состава паразитов, полученные в настоящем исследовании, являются научной основой для разработки системы мониторинга эпизоотологического состояния пчелиных семей и проведения профилактических и лечебных мероприятий на пасеках Томской области. Это необходимо для научно-обоснованного управления пчеловодством, формирования стратегии развития данной отрасли, а также быстрого реагирования в случае неблагоприятных ситуаций для жизнедеятельности пчелосемей (а еще лучше – для предупреждения таких ситуаций).

Полученные данные и разработанные в диссертации подходы могут быть включены в соответствующие разделы учебных программ по энтомологии, экологии насекомых и паразитологии. Автором написан раздел в учебном пособии «Основы пчеловодства (избранные главы)», а результаты изучения медоносной пчелы в Сибири излагаются в соответствующих разделах курса по генетике насекомых, читаемого на кафедре зоологии беспозвоночных БИ ТГУ.

Методология и методы исследования. Основной методологический подход – анализ семейного материала с учетом «родословных», происхождения, биологических и хозяйственно-ценных признаков семей и заболеваемости пчел. Пчелиная семья – это биологическая и функциональная единица медоносной пчелы (Алпатов, 1948), однако анализ только нескольких особей от семьи может быть мало информативным для объективной оценки генетических особенностей.

Для характеристики биологического разнообразия *A. mellifera* применен комплексный подход, включающий молекулярно-генетический анализ (как мтДНК, так и ядерного генома) и данные морфометрической изменчивости основных показателей крыла с учетом географической локализации пчел.

Настоящее исследование включает два направления: 1) характеристика биологического разнообразия *A. mellifera* по комплексу морфометрических признаков и ДНК-маркеров митохондриального и ядерного генома; 2) сравнительный анализ семей разного происхождения и с различными биологическими и хозяйственно-полезными признаками с целью поиска информативных ДНК-маркеров, позволяющих диагностировать подвиды пчел и проводить отбор качественных семей в ходе селекционно-племенной работы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Большинство пчелиных семей на пасеках Томской области представлено помесными формами, преимущественно гибридами среднерусской и карпатской пород. В процессе гибридизации пчел происходит «вытеснение генов» карпатской породы генами среднерусской пчелы.

2. Медоносная пчела среднерусской породы, обитающая на территории Сибири, представляет собой особый сибирский экотип подвида *A. m. mellifera*.

3. На пасеках Сибирского региона распространены два вида микроспоридий рода *Nosema*, но процесса замещения вида *N. apis* паразитом *N. ceranae* не наблюдается. Развитие нозематоза у медоносных пчел связано с абиотическими факторами: зараженность особей микроспоридиями р. *Nosema* зависит от температуры, тогда как зараженность разными видами (*N. apis* и *N. ceranae*) – от влажности.

4. В геноме *Apis mellifera* выявлены пороодно-специфические локусы, дифференцирующие среднерусскую и карпатскую породы (микросателлитные локусы A043, A088, A028, Ap081, A113, K0711 и *mrip3*) и эко-специфичные локусы, варианты которых характерны для различных экотипов среднерусской породы медоносной пчелы (локусы A008, A007 и A088).

5. Продуктивность маточного молочка пчелиных семей на территории Сибири не ассоциирована с вариантами микросателлитного локуса *mrip3*; данный локус позволяет дифференцировать породы и определять уровень интрогрессии генов между эволюционными линиями М и С.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы представлены и обсуждены на 8 научных конференциях: III Всероссийская школа-семинар и IV Международная конференция «Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных» (Томск, 2011, 2015); Чтения памяти А. И. Куренцова (Владивосток, 2015); V Межрегиональная конференция «Паразитологические

исследования в Сибири и на Дальнем Востоке» (Новосибирск, 2015); Евроазиатский симпозиум по перепончатокрылым насекомым (Нижний Новгород, 2015); II Международная конференция «Популяционная экология животных», посвященная памяти академика И. А. Шилова (Томск, 2016); XV съезд РЭО (Новосибирск, 2017).

Степень достоверности результатов исследований. Достоверность полученных результатов и выводов определяется объемом изученного материала (более 400 семей и 2500 особей) и широкой географической представленностью объектов исследования (более 100 пасек, 70 населенных пунктов различных регионов Сибири). 10–летние исследования проводились на обширных территориях Сибири (Томская и Кемеровская области, Красноярский и Алтайский края, Республика Алтай). Изучены территории Западной и Восточной Сибири, северные и южные районы Томской области, различные экологические регионы Северной Азии, районы с хорошо развитым пчеловодством и изолированные пасеки. Для всех пчелиных семей максимально учтены следующие показатели (географическая локализация пасеки, история пасеки, происхождение семьи, биологические и хозяйственно-значимые признаки), что позволило проводить сравнительный анализ и обеспечить потенциальную воспроизводимость и контроль результатов исследования.

При обработке первичных данных использован широкий спектр стандартных методов исследования (морфологических, микроскопических, молекулярно-генетических). Все исследования проведены на поверенном оборудовании в лаборатории молекулярно-генетических исследований кафедры зоологии беспозвоночных ТГУ и на базе ЦКП «Медицинская геномика» НИИ МГ ТНИМЦ РАН. Корректность проведенных расчетов определяется тем, что для статистической обработки первичных данных использованы общепринятые методы биометрической статистики; при анализе больших массивов данных – метод главных компонент, *post hoc* тест множественных сравнений Тьюки, непараметрический дискриминантный анализ, анализ отношений шансов и др.

Результаты диссертации получены на обширном экспериментальном материале, опубликованном в научных журналах высокого экспертного уровня. Каждый из аспектов настоящего исследования представлен на конференциях.

Конкурсная поддержка работы. Исследования были поддержаны грантами: ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.» (№ 02.740.11.0024); Фонда содействия инновациям. Программа СТАРТ «Создание пчелопитомника для Сибири и Дальнего Востока на основе современных биотехнологических подходов в области генотипирования подвидов, пород и популяций медоносных пчел» (№ 12078р/22897, 2013–2016); РФФИ «Генетическая структура популяций медоносной пчелы в Томской области: исследование митохондриального генома и микросателлитный анализ» (№13-04-98116р-а, 2013-2015); Администрации Томской области «Исследование породного состава пчёл на пасеках Томской области с помощью современных методов» (2013, 2015); Научного фонда им. Д. И. Менделеева (ТГУ): «Генетическое разнообразие медоносных пчел среднерусской породы (*Apis mellifera mellifera* L.) на территории Томской области» (№ 8.1.66.2015, 2015 г.),

«Характеристика изменчивости и функциональной значимости гена *mrjр3* у медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) как кандидатного ДНК-маркера для оценки продуктивности пчелосемей» (№ 8.1.37.2017, 2017 г.); РФФИ «Распространение болезней медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) на пасаках Томской области: генетический аспект» (№16-44-700902р-а, 2016–2018 гг.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 52 научные работы. Основные научные результаты диссертации представлены в 22 научных публикациях, изданных в рецензируемых научных журналах, в том числе 16 статей в журналах из списка ВАК РФ, 7 статей – в изданиях, включенных в международные базы Web of Sciences и Scopus, 3 монографии (в соавторстве; 2 – опубликованы за рубежом, одна из которых проиндексирована в Web of Science). Нуклеотидные последовательности четырех аллелей локуса *mrjр3* депонированы в международную базу данных (Genbank) под номерами MN673344–MN673347.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, девяти разделов, заключения и выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 361 странице, проиллюстрирована 43 таблицами и 49 рисунками. Список литературы включает 60 источников, в том числе 359 зарубежных авторов.

Личный вклад автора. Работа выполнена на кафедре зоологии беспозвоночных БИ Томского государственного университета в период 2008–2018 гг. в лаборатории молекулярно-генетических исследований.

Общая концепция диссертации, ее структура, основные результаты, положения, выносимые на защиту, и выводы сформулированы лично автором и отражают точку зрения на рассматриваемую проблематику. Автор организовала работу молекулярно-генетической лаборатории, лично поставила молекулярно-генетические методы и провела основную часть исследований, статистическую обработку и анализ полученных данных. Все совместно выполненные по теме диссертации исследования проведены под руководством автора, и касались таких аспектов как постановка задач, обработка материала, систематизация, интерпретация и обобщение полученных результатов, написание публикаций и представление результатов исследования на научных конференциях. Личный вклад автора в исследование составляет более 90%.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному консультанту д.б.н., проф. А. Н. Кучер за постоянную поддержку и неоценимую помощь; ст. преп. О. Л. Конусовой за плодотворное сотрудничество; директору НПЦ «Апис» Ю. Л. Погорелову за всестороннюю поддержку; всем сотрудникам кафедры зоологии беспозвоночных ТГУ и её руководителю д.б.н., проф. В. Н. Романенко за интерес к моей работе и деловую атмосферу на кафедре; проректору ТГУ, проф. С. П. Кулижскому за содействие в организации молекулярно-генетической лаборатории, где выполнялась настоящая работа; директору НИИМГ ТНИМЦ РАН В. А. Степанову за предоставленную возможность проведения экспериментов на базе ЦКП «Медицинская геномика»; С. А. Россейкиной, А. З. Брандорф, С. В. Свистуну, Д. В. Козлову и всем пчеловодам, обеспечившим сбор материала на пасаках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Комплексная характеристика медоносной пчелы, обитающей на территории Сибири, проводилась по двум направлениям (рис. 1). Первое направление – изучение породного состава медоносных пчел и распространения подвидов *A. mellifera* в Сибири с использованием молекулярно-генетических методов (анализ митохондриального и ядерного геномов) и данных морфометрического анализа, а также поиск популяций *A. m. mellifera* и изучение их разнообразия по комплексу микросателлитных локусов. Затем проведено сравнение спектра и частоты регистрации аллелей микросателлитных локусов между выборками пчел среднерусской и «южных» пород с целью выявления пороодно-специфичных маркеров. Второе направление – характеристика биологических показателей пчелиных семей, включающая анализ зараженности пчел паразитами и патогенами и поиск генетических маркеров, ассоциированных с параметрами продуктивности и устойчивости к заболеваниям у пчел разного происхождения.



Рисунок 1 – Алгоритм комплексного исследования медоносной пчелы в Сибири.

Примечание. # – Данные любезно предоставлены ОГБУ «Томская областная ветеринарная лаборатория». * – Данные любезно предоставлены пчеловодами.

Изучение породного состава медоносных пчел в Сибири

Материалом для исследования послужили медоносные пчелы, полученные: с 71 пасеки 52 населенных пунктов 13 районов *Томской области* (изучена вариабельность локуса COI-COII мтДНК для 340 семей; изменчивость 11

микросателлитных локусов – для 893 особей от 106 семей; данные морфометрического анализа получены для 2101 рабочей особи от 160 семей); с 5 пасек 4 населенных пунктов **Кемеровской области** (вариабельность локуса COI-COI мтДНК изучена для 16 семей, микросателлитных локусов – для 29 особей от 3 семей); с 9 пасек 6 населенных пунктов **Алтайского края** (варианты мтДНК определены для 31 семьи, микросателлитных локусов – для 29 особей от 6 семей). С использованием морфометрических и молекулярно-генетических методов изучены также: 1 семья с изолированной пасеки (окр. с. Онгудай) **Республики Алтай** и 25 пчелиных семей с 6 пасек 6 населенных пунктов **Красноярского края**, включая длительно изолированные пасеки, расположенные в тайге у староверов (енисейская популяция).

Всего исследованы медоносные пчелы с 92 пасек 69 населенных пунктов Сибири: анализ изменчивости мтДНК выполнен для 413 семей (2451 особь); микросателлитный анализ – для 140 семей (1519 особей). Для 202 семей сведения об изменчивости морфометрических признаков взяты из базы данных кафедры зоологии беспозвоночных БИ ТГУ.

На **первом этапе исследования** изучен спектр и распространение подвидов *A. mellifera* в Сибири на основании анализа локуса COI-COI мтДНК (оценивалось происхождение семьи по линии матки, изучали 3–5 особей от семьи) и вариабельности морфометрических признаков; а также охарактеризована изменчивость 11 микросателлитных локусов (для 106 семей, 3–10 особей от семьи). На **втором этапе** на основании анализа изменчивости морфометрических признаков и мтДНК проведен поиск популяций/пасек *A. m. mellifera* в Сибири и изучено генетическое разнообразие семей по расширенному спектру микросателлитных локусов – изучен 31 локус в выборке 824 особей от 35 семей среднерусской породы (основная выборка). На **третьем этапе** проведен поиск пороодно-специфичных ДНК маркеров ядерного генома путем сравнительного анализа генетических особенностей по комплексу микросателлитных локусов у среднерусских пчел сибирских популяций (собственные данные), популяций Урала и Европы (данные из работ: Ильясов, 2016; Franck et al., 1998; Garnery et al., 1998) и пчел «южных» пород (вспомогательная выборка, также изучены варианты локуса COI-COI и морфометрические признаки), полученные из питомников Украины (*A. m. carpatica*, 5 семей, 150 особей) и Германии (*A. m. carnica*, 4 семьи, 120 пчел).

Изучение зараженности медоносных пчел паразитами и патогенами

Материалом для исследования зараженности медоносных пчел паразитами и патогенами (изучены паразитарные (варроатоз и нозематоз) и инфекционные (микозы и бактериозы) болезни) послужили пчелы с пасек Сибири (табл. 1). Для оценки распространения видов *Nosema Naegeli*, 1857 в разных экологических регионах Северной Азии (южная тайга, подтайга, лесостепь, горно-таежные леса) дополнительно проведен анализ зараженности медоносных пчел на 8 пасеках Восточно-Казахстанской области (ВКО, Курчумский район) (рис. 2).

Всего проанализировано 493 семей с 199 пасек. С каждой пасеки изучено минимум по одной семье, от каждой семьи – не менее 30–50 особей.

Таблица 1 – Исследованные регионы Сибири и спектр изученных болезней

Географическая локализация	Изученные болезни	Кол-во псек/семей
Томская область (13 районов)	Нозематоз	157/437
	Варроатоз	136/424
	Грибковые инфекции	73/100
	Бактериальные инфекции	102/248
Кемеровская обл. (4 района)	Нозематоз	7/7
Красноярский край (2 района)	Нозематоз	4/11
	Аскофероз	2/6
Алтайский край (6 районов)	Нозематоз	14/16



Рисунок 2 – Карта локализации изученных псек в различных экологических регионах Северной Азии. Цифрами указано число обследованных псек в данной точке.

Исследование заболеваемости пчел на пасеках Сибири включало три этапа.

1. Характеристика эпизоотологической ситуации на пасеках Томской области. Изучена зараженность пчелиных семей и пасек паразитами и патогенами в 2008–2017 гг. и описан спектр патогенов и паразитов медоносных пчел (табл. 1). С целью поиска причин массовой гибели семей в 2016 г., детально исследованы пчелы с пасек в Молчановском и Тегульдетском районах.

2. Анализ зараженности нозематозом медоносных пчел. Изучено распространение видов *Nosema* в Сибири в период 2012–2017 гг. методом ПЦР. Всего исследовано 182 пасеки, 471 семья. Также проведен ретроспективный анализ зараженности нозематозом типа С образцов пчел, собранных в 2008–2012 гг. Всего исследовано 74 семьи с 18 пасек 10 районов Томской области.

С целью поиска возможных причин широкого распространения нозематоза изучено распределение двух видов *Nosema* на пасеках различных экологических регионов Северной Азии. Всего исследовано 77 пасек в период 2016–2017 гг. Для оценки влияния климатических факторов на жизнеспособность *Nosema* исследована сезонная динамика зараженности отдельных особей 5 семей в течение пчеловодческого сезона 2017 г. От каждой семьи отбиралось 8 проб (по 20–30 особей в каждой пробе) в период май–сентябрь; всего изучено 712 особей.

3. Поиск ДНК-маркеров ядерного генома, ассоциированных с устойчивостью/заболеваемостью пчел нозематозом. Сначала была оценена экстенсивность инвазии пчел разных подвидов на уровне семьи и отдельных особей. Всего изучено 28 семей *A. m. mellifera* (553 особи) и 12 семей (337 особей) «южных» пород (*A. m. carpatica*, *A. m. caucasica*, *A. m. carnica*). Затем выполнено сравнение генетических особенностей пчел разного происхождения и различной степени зараженности спорами *Nosema*.

Поиск ДНК-маркеров, ассоциированных с хозяйственно-значимыми показателями медоносных пчел

С целью поиска маркеров, ассоциированных с хозяйственно-значимыми признаками, проведена оценка информативности микросателлитного локуса *mrj3* как возможного маркера для отбора семей по продуктивности маточного молочка. На **первом этапе** изучена изменчивость локуса *mrj3* у 1058 особей от 114 семей разных подвидов (*A. m. mellifera*, *A. m. carnica*, *A. m. carpatica*, *A. m. caucasica*); 5–15 особей от семьи. На **втором этапе** проведено сравнение генетических вариантов локуса *mrj3* у *A. m. mellifera*, полученных от семей, отличающихся показателями медопродуктивности и силой семьи (изучено 5 семей, 150 особей). На **третьем этапе** изучены особенности локуса *mrj3* семей с разной продуктивностью маточного молочка (изучено 7 гибридных семей).

Методы исследования

В работе использованы стандартные методы для оценки зараженности медоносных пчел варроозом (смывы с пчел) и нозематозом (световая микроскопия), а также молекулярно-генетические методы для анализа: 1) вариабельности локуса COI-COII мтДНК; 2) изменчивости микросателлитных локусов; 3) нуклеотидной последовательности локуса COI-COII мтДНК и локуса *mrj3* (секвенирование ДНК); 4) вида микроспоридий р. *Nosema* (ПЦР-

диагностика). Для молекулярно-генетического анализа использованы образцы ДНК, выделенные из внутренних органов рабочих пчел или из пула (суммарная проба пчел от семьи или с пасеки для оценки зараженности нозематозом).

Изучена изменчивость 31 микросателлитного локуса, локализованных на 15 из 16 хромосом медоносной пчелы (в среднем по 2 локуса на хромосому); в т.ч. A008, Ap049, AC117, Ap066, Ap081, A088, A113, Ap243, A024, A007, A043, A028, 6339, H110, SV185, SV220, K0457B, K1168, Ap033, K0820, Ap007, Ap068, K0405, K1615, K0711, SV167, Ap249, A056, Ap226, AT139 и *mrjp3*. ПЦР проводили с использованием специфических праймеров, меченных FAM, HEX или JOE (Albert et al., 1999; Solignac et al., 2003). Генотипирование выполняли на базе ЦКП «Медицинская геномика» НИИ МГ ТНИМЦ РАН на генетическом анализаторе ABI Prism 3730 с применением стандартов длины молекул ДНК GeneScan500-ROX в условиях, рекомендуемых производителем; анализ размера фрагментов – с помощью программного обеспечения GeneMapper Software.

Для секвенирования локуса COI-COII мтДНК отобраны 17 образцов ДНК *A. m. mellifera*; локуса *mrjp3* – 12 образцов ДНК (*A. m. mellifera* – 7; *A. m. carpatica* – 5). Секвенирующую ПЦР проводили с прямого или обратного праймеров (BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit); анализ данных выполняли с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis v5.4. Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали с помощью программы BioEdit (Hall, 1999) и сравнивали с референс-последовательностями (NCBI Reference Sequence, GenBank) с использованием программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), а также последовательностями ДНК, приведенными в публикациях (Albert et al., 1999; Ruvolo-Takasusuki et al., 2016).

Статистическая обработка результатов

Для исследования соответствия вариантов локуса мтДНК и изменчивости морфометрических показателей у медоносных пчел использовали следующие подходы: критерий Колмогорова–Смирнова; дистанции Махаланобиса (MD^2); непараметрический дискриминантный анализ (DFA); тест Дункана (Duncan test; $\alpha=0,050$), post hoc теста множественных сравнений Тьюки (Tukey's HSD test).

Расчет частот аллелей и генотипов микросателлитных локусов, оценку генетической подразделенности выборок пчел проводили с использованием стандартных подходов (Животовский, 1980; Sokal, Rhoif, 1980); *t*-критерий Стьюдента использовали для сравнения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности. Для оценки дифференциации различных подвидов *A. mellifera* использовали метод главных компонент (PCA). Уровень интрогрессии «южных» генов в ядерном геноме среднерусских пчел и гибридов, обитающих в Сибири, определяли на основе данных полиморфизма микросателлитных локусов с использованием программы STRUCTURE 2.3.4 на основе байесовского анализа (Bayesian analysis) с применением метода кластеризации Монте-Карло с цепями Маркова (MCMC) при заданном числе кластеров $K=2$ с использованием модели смешивания (Admixture model) и повторности MCMC 5000 (Pritchard et al., 2000). Анализ результатов проводили с использованием программ POPULATIONS 1.2.28, STRUCTURE 2.3.4, STATISTICA 8.0, MICROSOFT EXCEL 2010.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПОДВИДОВ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ В СИБИРИ

В Сибирь медоносная пчела была завезена 230 лет назад и представляет собой искусственные популяции, зимовку которых контролирует человек. Первоначально разводилась среднерусская пчела *A. m. mellifera*, как наиболее адаптированная к суровым климатическим условиям региона. Однако с конца XX в. отмечен активный завоз «южных» пород, преимущественно карпатской пчелы, что привело к массовой гибридизации пчел (Конусова и др., 2009).

В **Томской области** по данным анализа локуса COI-COII мтДНК 60% пчелосемей имеют происхождение по материнской линии от *A. m. mellifera*, 32% семей – от «южных» пород и 8% составляют смешанные семьи (Островерхова и др., 2015). Зарегистрированы три варианта локуса COI-COII мтДНК: PQQ, PQQQ (характерны для *A. m. mellifera*) и Q (свойствен «южным» подвидам). Для южных районов показано большее генетическое разнообразие пчел (выявлено до 6 вариантов локуса COI-COII или их сочетаний) по сравнению с северными районами, где преобладают однородные по генетическому варианту локуса COI-COII (1–2 варианта) семьи (96%) и пасеки (73%). Согласно данным анализа изменчивости морфометрических признаков и локуса COI-COII большинство изученных семей являются гибридами среднерусской и карпатской пород (рис. 3). В Томской области не обнаружено больших территорий с однородным по породному составу массивом пчел, соответствующих стандарту *A. m. mellifera*, но в ряде районов (Тегульдетском, Молчановском и др.) выявлены пасеки, где сохранился подвид *A. m. mellifera*. В **Кемеровской области** на большинстве изученных пасек разводят пчел «южных» пород: особи имеют вариант Q локуса COI-COII и по морфометрическим показателям соответствуют стандартам *A. m. carpatica* или *A. m. carnica*. Выявлена промышленная пасека в Новокузнецком районе, где разводится *A. m. mellifera*. В **Алтайском крае** обнаружены как чистопородные (среднерусская и карпатская породы), так и гибридные семьи. В **Республике Алтай** изучена изолированная пасека в окр. с. Онгудай, где обитает *A. m. mellifera*. Особый интерес представляют семьи енисейской популяции в **Красноярском крае**: у изученных пчел выявлен вариант PQQ мтДНК (рис. 4).

В результате проведенного скрининга разных популяций Сибири (изучено 413 семей) выявлена уникальная енисейская популяция, а также пасеки в Томской области, Алтайском крае и Республике Алтай, где обитает *A. m. mellifera* (рис. 5). У всех особей выявлены варианты PQQ или PQQQ, но обнаружены некоторые особенности морфометрических параметров. Для некоторых семей томской выборки значение признака «дискоидальное смещение» отклонялось от стандарта (выявлены особи с нулевым значением), что указывает на возможное влияние «южных» пород пчел. Для большинства семей енисейской и алтайской выборки показано отклонение среднего значения кубитального индекса (значения ниже минимальных по стандарту), что может быть следствием потери генетического разнообразия (изолированность) или результатом адаптации к суровым природным условиям. Тем не менее, изолированные пасеки в Красноярском крае и Республике Алтай – уникальные популяции *A. m. mellifera*, существующие в течение длительного времени без влияния других пород пчел.

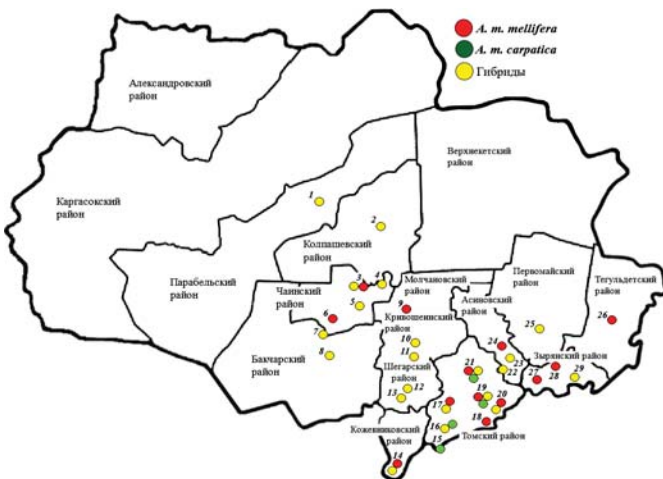


Рисунок 3 – Геногеографическая карта распределения подвидов медоносной пчелы и гибридов на пасеках Томской области на основании морфометрического и молекулярно-генетического анализа (мтДНК) пчел. Пасеки, расположенные на расстоянии менее 20 км, обозначены одной точкой.

1 – с. Парабель; 2 – окр. г. Колпашево; 3 – с. Подгорное; 4 – с. Леботор; 5 – д. Стрельниково; 6 – с. Гореловка; 7 – с. Высокий Яр, д. Крыловка; 8 – с. Бакчар; 9 – с. Могочино, с. Волог; 10 – с. Кривошеино; 11 – с. Володино; 12 – с. Каргала; 13 – с. Баткат; 14 – д. Еловка; 15 – с. Яр; 16 – с. Курлек, д. Кандинка; 17 – с. Зоркальцево, с. Рыбалово, д. Губино, д. Березкино, с. Нижне-Сеченово; д. Кудринский участок, п. Заречный (Межениновское сельское поселение); 18 – с. Межениновка; 19 – п. Синий Утес, д. Магадаево, д. Просекино, с. Коларово, окр. г. Томска; 20 – д. Бодажково, д. Большое Протопопово; 21 – с. Семилужки, п. Заречный (Малиновское сельское поселение); 22 – д. Тихомировка; 23 – окр. г. Асино; 24 – урочище Кужербак; 25 – д. Крутоложное; 26 – с. Тегульдэт; 27 – с. Дубровка; 28 – с. Зырянск; 29 – с. Окунеево.

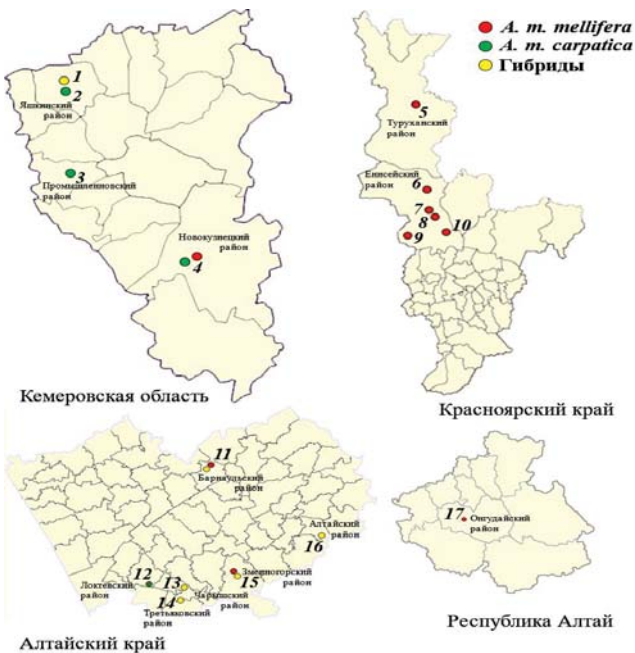


Рисунок 4 – Карта распределения подвидов медоносной пчелы и гибридов на пасеках Сибири на основании морфометрического и молекулярно-генетического анализа (мтДНК) рабочих особей.

1 – п. Яшкино; 2 – с. Нижнеяшкино; 3 – п. Промышленная; 4 – окр. г. Новокузнецк (2 пасеки); 5 – окр. с. Туруханск; 6 – с. Ярцево; 7 – с. Остяцкое; 8 – с. Колмогорова; 9 – п. Якша; 10 – с. Озерное; 11 – окр. г. Барнаул; 12 – п. Массальский; 13 – окр. с. Чарышское; 14 – с. Староалейское; 15 – с. Барановка; 16 – с. Ая; 17 – окр. с. Онгудай.

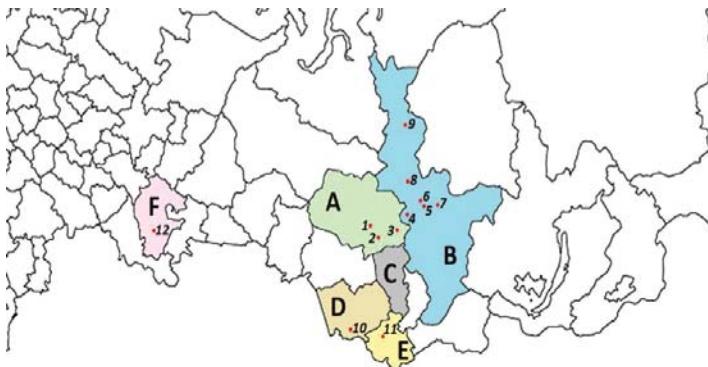


Рисунок 5 – Карта исследованных территорий Сибири, где проведен поиск популяций медоносной пчелы среднерусской породы (скрининговое исследование): А – Томская область; В – Красноярский край; С – Кемеровская область; D – Алтайский край; E – Республика Алтай; F – Башкортостан (заповедник «Шульган-Таш»). Цифрами обозначены населенные пункты, где выявлены пасеки с семьями *A. m. mellifera*: 1 – с. Могочино; 2 – с. Тегульдэт; 3 – п. Заречный; 4 – п. Якша; 5 – с. Колмогурово; 6 – с. Остяцкое; 7 – с. Озерное; 8 – с. Ярцево; 9 – с. Туруханск; 10 – с. Барановка; 11 – окр. с. Онгудай; 12 – бурзянская популяция *A. m. mellifera*, использованная для сравнения.

МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ЛОКУСЫ КАК МАРКЕРЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ

Разнообразие медоносных пчел Томской области

Для характеристики разнообразия медоносных пчел были изучены образцы пчел с пасек Томской области с использованием 11 локусов (A008, AC117, A043, A113, A024, Ap243, Ap049, H110, SV185, K0820, *mrjп3*) (Ostroverkhova et al., 2017). Для большинства локусов выявлены различия в спектре и/или частоте аллелей между среднерусскими и карпатскими пчелами. Для большинства локусов наблюдаемая гетерозиготность была ниже ожидаемой, но статистически значимые различия показаны только по локусам A113 и *mrjп3* для *A. m. mellifera* и локусам A008, A043 и A113 у пчел *A. m. carpatica* (табл. 2). У гибридов на основе *A. m. mellifera* происходит интрогрессия генетических вариантов линии С. Сходная картина наблюдается и у гибридов на основе *A. m. carpatica*: имеет место интрогрессия вариантов линии М, с тем лишь отличием, что этот процесс более выражен (см. далее). В целом, у гибридов на основе как среднерусской, так «южных» пород ядерный геном более соответствует *A. m. mellifera*.

Разнообразие медоносных пчел разного происхождения

На основании анализа изменчивости 31 микросателлитного локуса оценено генетическое разнообразие *A. m. mellifera*, *A. m. carpatica* и *A. m. carnica*, проведен поиск уникальных и специфических ДНК-маркеров, характерных для разных пород пчел, а также локусов, маркирующих популяции *A. m. mellifera*, обитающие в различных экологических условиях. В результате исследования разработана стандартная аллельная лестница по изученным локусам.

Таблица 2 – Частота регистрации (\pm ошибка) преобладающих аллелей[#] некоторых локусов у среднерусской и карпатской пород, обитающих в Томской области

Лocus	Размер аллеля, пн	<i>A. m. mellifera</i> (PQQ/PQQQ)	<i>A. m. carpatica</i> (Q)	Лocus	Размер аллеля, пн	<i>A. m. mellifera</i> (PQQ/PQQQ)	<i>A. m. carpatica</i> (Q)
A008	162	0,87±0,01	0,03±0,01	A043	128	0,83±0,02	0,08±0,02
	174	0,02±0,01	0,46±0,04		140	0,16±0,02	0,63±0,04
	<i>Ho</i>	0,23±0,02	0,50±0,06***		<i>Ho</i>	0,28±0,03	0,24±0,05***
	<i>He</i>	0,24±0,02	0,73±0,03		<i>He</i>	0,29±0,02	0,55±0,04
	<i>N</i>	306	78		<i>N</i>	305	66
A113	212	0,11±0,01	0,91±0,02	A024	92	0,66±0,02	0,07±0,02
	218	0,57±0,02	0,01±0,01		100	0,19±0,02	0,43±0,04
	220	0,26±0,02	0,03±0,01		102	0,01±0,01	0,46±0,04
	<i>Ho</i>	0,52±0,03*	0,08±0,03*		<i>Ho</i>	0,51±0,03	0,53±0,06
	<i>He</i>	0,60±0,02	0,18±0,04		<i>He</i>	0,51±0,02	0,60±0,02
	<i>N</i>	290	80		<i>N</i>	307	68
Ap049	127	0,67±0,02	0,21±0,04	<i>mrip3</i>	406	0	0,49±0,03
	130	0,18±0,02	0,68±0,01		529	0,83±0,03	0,04±0,01
	<i>Ho</i>	0,45±0,03	0,59±0,07		<i>Ho</i>	0,07±0,03***	0,01±0,01
	<i>He</i>	0,50±0,02	0,49±0,05		<i>He</i>	0,30±0,04	0,01±0,01
	<i>N</i>	309	53		<i>N</i>	89	145

Примечание. *N* – число исследованных образцов; *Ho* – наблюдаемая гетерозиготность; *He* – ожидаемая гетерозиготность. # – Преобладающие аллели выделены жирным шрифтом (частота регистрации $\geq 0,43$). Статистически значимые отличия *Ho* от *He* отмечены как * – $p < 0,05$ и *** – $p < 0,001$.

Локусы K0711, Ap049, SV220, *mrip3* и др. могут рассматриваться как породо-специфические маркеры, дифференцирующие подвиды пчел эволюционных линий М и С (табл. 3); локусы A043, Ap081, A028, A088 и A113 более информативны для дифференциации среднерусской и карпатской пород, чем среднерусской породы и карники.

На основании изменчивости 7 локусов (Ap243, 4a110 (=H110), A024, A008, A043, A113, Ap049 – локусы, доступные для максимального числа включенных в анализ выборок) оценена дифференциация различных подвидов медоносной пчелы и определен уровень генетической гетерогенности выборок пчел среднерусской породы различной географической локализации.

Установлено, что в пространстве главных компонент (РАС) выборки пчел четко кластеризуются в зависимости от породной принадлежности (рис. 6): первая компонента объясняет 78% суммарной изменчивости и дифференцирует выборки среднерусских пчел от выборок «южных» пчел; вторая компонента объясняет 22% всей изменчивости и, вероятно, отражает географическую локализацию выборок пчел (*A. m. mellifera* кластеризуется по географическому принципу восток (выборки Сибири) – запад (Урал)). Две выборки карпатской породы и выборка карники формируют обособленные группы, несмотря на то, что карпатская порода рассматривается ветвью карники. Генетическая специфичность *A. m. carpatica* по вариантам ядерного генома свидетельствует о необходимости переосмысления ее эволюционного статуса.

Для оценки генетической однородности различных популяций *A. m. mellifera*, также был проведен сравнительный анализ следующих выборок

пчел: 1) сибирские популяции (Томская область, Красноярский край, Алтай) – анализ 31 локуса (собственные данные); 2) сибирские и бурзянская (Урал) популяции – анализ был возможен для 9 локусов (Ильясов, 2016) (табл. 4); 3) сибирские и европейские популяции – анализ был возможен для 5 локусов (Franck et al., 1998; Garnery et al., 1998).

Таблица 3 – Характеристика аллельного спектра* некоторых микросателлитных локусов у разных подвидов медоносной пчелы

Локус	Размер аллеля, пн	Частота аллелей** (%) у подвидов <i>A. mellifera</i>		
		Линия М		Линия С
		<i>A. m. mellifera</i>	<i>A. m. carpatica</i>	<i>A. m. carnica</i>
		Сибирь	Украина	Германия
A043	128	91	7	22
	140	7	81	77
	<i>N</i>	756	177	106
Ap081	124	93	4	20
	130	0	76	0
	132	1	10	71
	<i>N</i>	554	193	137
A088	140	98	10	23
	150	0	90	75
	<i>N</i>	318	82	77
Ap226	233	82	5	26
	237	0	61	40
	<i>N</i>	470	167	100
<i>mrjр3</i>	406	0	49	40
	464	4	10	193
	518	0	20	19
	529	80	4	2
	<i>N</i>	360	82	77
A028	126	83	7	24
	132	8	83	76
	<i>N</i>	469	170	109
A113	212	7	87	60
	218	73	3	27
	220	17	4	2
	<i>N</i>	832	194	136
K0711	212	94	2	0
	219	5	82	87
	<i>N</i>	252	127	53
SV220	179	1	45	60
	185	46	5	4
	<i>N</i>	479	82	81
Ap049	120	5	23	19
	127	72	3	4
	130	17	16	24
	139	3	51	45
	<i>N</i>	787	183	85

Примечание. * – указаны преобладающие аллели и частота их регистрации; ** – ошибка находится в пределах 0,002–0,039. *N* – число исследованных пчел. Частота аллелей >40% выделена жирным шрифтом.

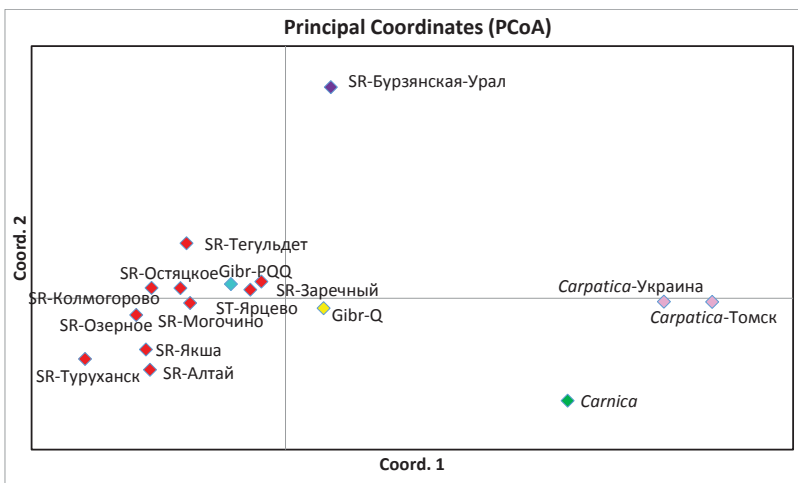


Рисунок 6 – Расположение в пространстве главных компонент (Coord. 1 и Coord. 2) выборок *A. m. mellifera* разной географической локализации и «ожных» пород по данным об изменчивости 7 микросателлитных локусов. Красным цветом отмечены выборки среднерусской породы (SR) разных популяций Сибири; синим – выборка пчел бурзянской популяции; зеленым – выборка пчел карники (Carnica) из питомника (Германия); розовым – выборки пчел карпатской породы; голубым – гибриды на основе среднерусской породы (Gibr-PQQ); желтым – гибриды на основе южных пород (Gibr-Q).

Сибирские популяции. Для 16 (Ar081, A043, A008, A024, Ar226, AT139, AC117, Ar049, A113, *mjrp3*, A028, Ar007, K0711, A088, A056 и Ar249) из 31 изученного локуса у среднерусских пчел исследованных сибирских популяций зарегистрирован один преобладающий (>40%) аллель (Островерхова и др., 2015; Ostroverkhova et al., 2018), значения наблюдаемой гетерозиготности были ниже ожидаемой (для A113 различия достигали уровня статистической значимости во всех выборках, $p < 0,05$). Для локусов Ar066, Ar243, SV185, H110 показаны отличия по частоте преобладающих аллелей между пчелами разных выборок.

Сибирские и бурзянская популяции. Пчелы сибирских популяций близки между собой по спектру и частотам аллелей 7 из 9 анализируемых локусов (Ar049, A113, Ar243, A024, A008, A088 и A028), тогда как пчелы уральской популяции отличаются от них по ряду локусов (табл. 4). Только для локуса A043 выявлено сходство в спектре и частоте аллелей у среднерусских пчел из разных популяций России (кроме того, данный локус дифференцирует среднерусскую и карпатскую породы (табл. 3)), что позволяет рассматривать его в качестве пороодно-специфичного маркера. В целом, выборка пчел бурзянской популяции более удалена от выборок пчел сибирских популяций, причем последние дистанцированы друг от друга (рис. 7).

Сибирские и европейские популяции. Из 5 привлеченных для сравнения локусов, для A008 зарегистрированы отличия по спектру преобладающих аллелей между выборками пчел из Сибири, Урала и Европы (рис. 8), что позволяет рассматривать его в качестве маркера различных экотипов

A. m. mellifera. Так, у среднерусских пчел Сибири с высокой частотой (около 90%) регистрировался аллель "162", тогда как у бурзянских пчел – аллель "154" (87%), а у европейских пчел – аллель "148".

Таблица 4 – Параметры генетического разнообразия 9 микросателлитных локусов у среднерусской породы разных популяций России

Локус	Параметр		Частота аллелей			
			Сибирь			Урал
			Томская область	Енисейская популяция	Алтай	Бурзянская популяция ¹
Ap049	N/NA		149/8	371/6	36/4	326/3
	Min/max		117/142	120/152	117/152	129/142
	Аллель, пн	127	0,71	0,76	0,54	0
		130	0	0	0,25	0,78
A113	N/NA		149/5	367/7	33/2	326/4
	Min/max		212/228	212/232	218/220	216/228
	Аллель, пн	218	0,63	0,80	0,88	0,09
		220	0,30	0,15	0,12	0,85
H110	N/NA		144/3	376/7	36/5	326/3
	Min/max		162/170	158/170	156/174	160/168
	Аллель, пн	160	0	0,04	0	0,68
		162	0,73	0,48	0,11	0
166		0,19	0,13	0,72	0	
Ap243	N/NA		109/6	203/9	32/8	326/3
	Min/max		257/275	254/284	254/275	254/260
	Аллель, пн	254	0	0	0,14	0,62
		257	0,47	0,30	0,56	0,32
263		0,27	0,55	0,13	0	
A008	N/NA		145/4	295/7	34/3	326/3
	Min/max		151/173	151/173	163/173	154/158
	Аллель, пн	154	0	0	0	0,87
		163	0,91	0,91	0,87	0
A088	N/NA		76/3	236/2	Н.д.	326/4
	Min/max		141/146	138/141		143/155
	Аллель, пн	140	0,93	1,00		0
		146	0,05	0		0,74
A028	N/NA		78/4	342/5	Н.д.	326/2
	Min/max		118/132	120/148		134/140
	Аллель, пн	126	0,80	0,85		0
		134	0	0,13		0,89
A043	N/NA		76/4	236/3	33/3	326/3
	Min/max		128/140	121/140	128/140	128/140
	Аллель, пн	128	0,78	0,98	0,86	0,76
A024	N/NA		148/6	376/5	34/4	326/3
	Min/max		92/106	92/102	92/100	98/108
	Аллель, пн	92	0,29	0,67	0,78	0
		98	0	0	0,03	0,63

Примечание. N/NA – число исследованных пчел/ зарегистрированных аллелей; Min/max – минимальный/максимальный размер аллелей, пн. ¹ – Данные по бурзянской популяции (Урал) из (Ильясов, 2016). *Указаны аллели с частотой более 50% (преобладающие выделены жирным шрифтом). Н.д. – нет данных

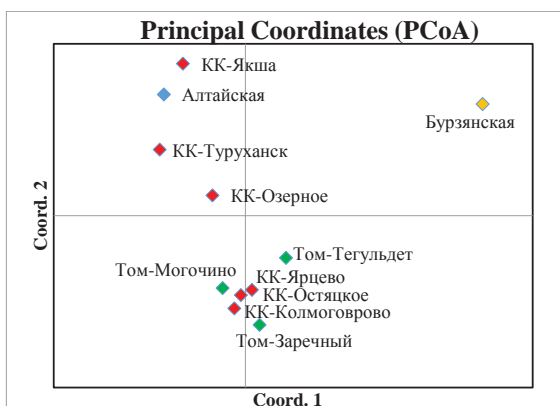


Рисунок 7 – Локализация 11 выборок *A. mellifera* различных популяций Сибири и Урала в пространстве главных компонент (ПСА) по данным об изменчивости микросателлитных локусов. Красным цветом отмечены выборки красноярской популяции (КК), зеленым – томской (Том), синим – алтайской и желтым – бурзянской популяции (Урал).

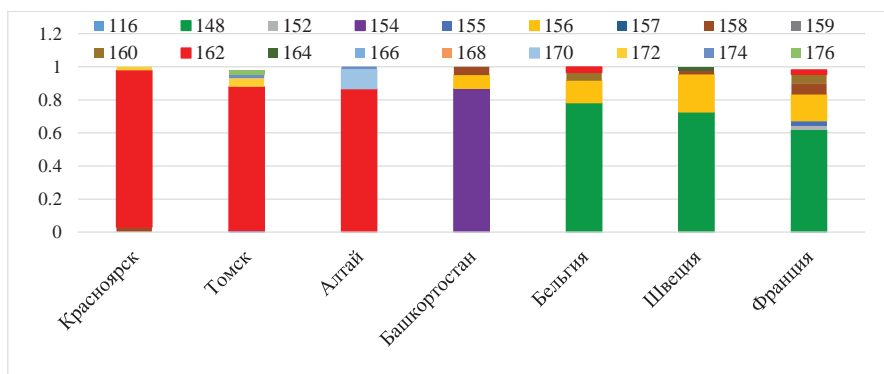


Рисунок 8 – Аллельный спектр и частота преобладающих аллелей локуса A008 у медоносной пчелы *A. mellifera* в разных популяциях России и Европы.

Дальнейшие исследования необходимы для оценки значимости локусов **A088**, **A113** и, возможно, **A007** в качестве возможных ДНК-маркеров различных экотипов *A. mellifera*, а локус **A043** – как маркер дифференциации породы (по этому локусу большинство обследованных пчел/семей среднерусской породы, вне зависимости от ареала обитания имели короткий аллель "128"; для пчел южного происхождения характерны более длинные аллели ("134", "140", "141").

Приведенные результаты подтверждают предположение о существовании сибирского экотипа среднерусской пчелы, а изолированная енисейская популяция *A. mellifera* представляет интерес с точки зрения выявления генетической компоненты адаптированности к суровым условиям Сибири.

С целью углубленного изучения генетических характеристик пчел сибирского экотипа был проведен анализ нуклеотидных последовательностей локуса COI-COII мтДНК и микросателлитного локуса *mrjр3*.

Характеристика нуклеотидной последовательности аллелей локуса COI-COII мтДНК у среднерусских пчел Сибири

При изучении нуклеотидной последовательности вариантов PQQ и PQQQ локуса COI-COII у среднерусских пчел сибирских популяций были определены наиболее часто встречающиеся митотипы – M4 (PQQ) и M4' (PQQQ). В отличие от повтора Q1, размер которого 197 пн, повторы Q2 и Q3 идентичны между собой и имеют размер 195 пн. В Q2/Q3-повторах выявлены две делеции нуклеотида А в положении 34 и 149, а также замена Т→С в положении 4. Не установлено полного соответствия последовательностей локуса COI-COII мтДНК пчел сибирских популяций с референс-последовательностями (Genbank) и описанными вариантами, выделенными по наличию 1–2 SNP (M4a–M4n или M4'a) (Rortais et al., 2011; Pinto et al., 2014; Hassett et al., 2018). Вариант PQQ показал 99% идентичность с гаплотипами M4f (KF274629) и M4e (KF274628), описанными у пчел на территории Нидерландов и Ирландии, а вариант PQQQ – 99% идентичность с M4a' (KF274638), выявленным у пчел Шотландии и Ирландии. Различие как между вариантом PQQ и митотипами M4f/M4e, так и между вариантом PQQQ и M4a' связано именно с делециями нуклеотида А в Q2/Q3-повторах у пчел Сибири. Таким образом, варианты PQQ и PQQQ, выявленные у пчел сибирских популяций, – это новые митотипы, не описанные ранее у пчел *A. m. mellifera*. Вместе с тем, сходство (99%) установлено для пчел, обитающих в Сибири и на территории Северной Европы, то есть для пчел, обитающих в суровых природно-климатических условиях, что может свидетельствовать об адаптивной значимости этих вариантов мтДНК.

Генетическое разнообразие медоносных пчел Сибири по локусу *mrj3* и структура микросателлитного локуса *mrj3* у пчел разного происхождения

У пчел Сибири (включая завезенные из питомников семьи «южных» пород) выявлено 9 аллелей размером 390–530 пн, причем спектр аллелей у пчел разного происхождения (*A. m. mellifera*, *A. m. carpatica*, *A. m. carnica*, *A. m. caucasica*) был сходный, но частоты аллелей и преобладающий аллель различались. Так, аллель "529" более характерен для *A. m. mellifera*, тогда как аллели "406" и "518" – специфичны для «южных» пород (табл. 2, 3). Более низкие значения наблюдаемой гетерозиготности по сравнению с ожидаемой выявлены для всех групп пчел (кроме *A. m. caucasica*), но статистически значимые различия показаны только для томской выборки *A. m. mellifera* и *A. m. carnica* ($p < 0,001$).

Чтобы исследовать специфичность аллелей локуса *mrj3* у медоносных пчел сибирских популяций, проведено секвенирование аллелей "406", "437", "518" и "529" (внесены в GenBank: MN673344–MN673347) и сравнение нуклеотидных последовательностей с данным для других популяций. Выявлена ~99% идентичность изученных последовательностей референс-последовательностям, что указывает на консерватизм повторяющегося района гена *mrj3* у разных подвидов пчел (Островерхова и др., 2018; Ostroverkhova et al., 2018). У *A. m. mellifera* сибирских популяций преобладает аллель "529" локуса *mrj3*, поэтому данный локус может рассматриваться кандидатным маркером для оценки адаптационного потенциала медоносных пчел Сибири.

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ РАЗНООБРАЗИЯ ГИБРИДНЫХ СЕМЕЙ В ПОПУЛЯЦИЯХ СО СМЕШАННЫМ ПОРОДНЫМ СОСТАВОМ

Оценка процесса гибридизации пчел

Для изучения процесса гибридизации медоносных пчел на пасеках Томской области использовано три подхода: 1) проведена оценка соответствия вариантов мтДНК для среднерусской и «южных» пород стандартам по 3 экстерьерным признакам; 2) изучена представленность аллелей микросателлитных локусов, характерных для среднерусской и «южных» пород, у гибридов (оценка интрогрессии) (рис. 9); 3) охарактеризована динамика представленности вариантов микросателлитных локусов, характерных для разных пород в ряду поколений (рис. 10) (Островерхова и др., 2012–2016).

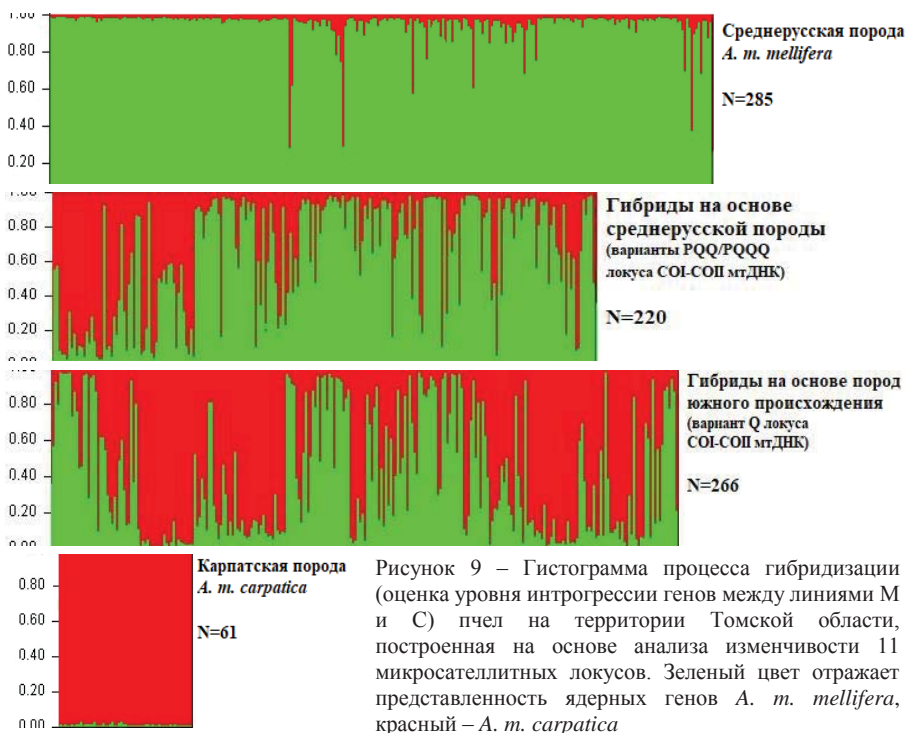


Рисунок 9 – Гистограмма процесса гибридизации (оценка уровня интрогрессии генов между линиями М и С) пчел на территории Томской области, построенная на основе анализа изменчивости 11 микросателлитных локусов. Зеленый цвет отражает представленность ядерных генов *A. m. mellifera*, красный – *A. m. carpatica*

Для гибридов наблюдалось несоответствие между значениями породопределяющих морфометрических признаков и вариантами локуса COI-COI мтДНК, характерными для соответствующих пород. Существенный вклад в дифференциацию групп с разными вариантами мтДНК вносит показатель «дискоидальное смещение», который является контрастным для выборок среднерусской и карпатской пород (дистанции между группами PQQ и Q равны $MD^2=4,73$; между PQQQ и Q – $MD^2=2,18$; между PQQ и PQQQ – $MD^2=0,93$).

Различия между гибридными семьями на основе карпатской породы, подразделенными в зависимости от представленности аллелей локуса *mrj3*, специфичных для карпатской ("406" и "518") и среднерусской ("529") пород, хорошо согласуются с данными морфометрического анализа. Так, семьи со следами гибридизации имели наименьший процент пчел с отрицательным дискоидальным смещением, характерным для *A. m. mellifera* (9,0–14,3%), тогда как у сильно гибридизованных семей только 10% пчел имели положительные значения показателя (что характерно для карпатской породы), и значительная доля (90%) пчел с отрицательными или нулевыми значениями. Эти данные указывает на информативность локуса *mrj3* для оценки следов гибридизации.

Данные по оценке интрогрессии генов линии С (южные породы) в М-линию (*A. m. mellifera*) по комплексу микросателлитных локусов у пчел, обитающих на пасеках Томской области, а также в гибридных семьях I и II поколений на основе семей карпатской породы (ранее завезенные в окр. г. Томска из питомника), наглядно иллюстрируют изменения в структуре ядерного генома у гибридов по сравнению с чистопородными пчелами (рис. 9, 10).

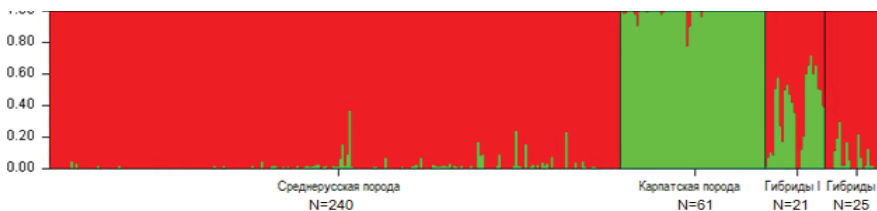


Рисунок 10 – Гистограмма процесса гибридизации (уровень интрогрессии генов), построенная на основе анализа варибельности 24 микросателлитных локусов, в пчелиных семьях – гибридах I и II поколения, являющихся потомками семей карпатской породы. Красный цвет отражает представленность ядерных генов, характерных для среднерусской породы, зеленый – для карпатской породы (пчелы от семей, завезенных в Томскую область).

Анализ уровня полиандрии у чистопородных пчел чистопородных и гибридных семей

Одним из возможных механизмов быстрого «вытеснения» «южных» генов «среднерусскими» генами у гибридов на основе «южных» пород, могут быть особенности биологии размножения медоносной пчелы (полиандрия). С целью анализа уровня полиандрии и оценки вклада разных трутней в генетическое разнообразие семей проведено изучение варибельности 3 локусов (A008, Ap049, AC117) у пчел от 7 семей разного происхождения (среднерусской и карпатской пород, гибридов), обитающих в Томской области (Островерхова и др., 2016). Доля привнесенных в семью аллелей по линии самцов в изученных семьях значительно варьировала (6,67–28,0%). Для гибридов характерно большее генетическое разнообразие (выявлено 25–28% особей, имеющих аллели от трутней других семей), что может быть следствием большего генетического разнообразия семей на гибридных пасеках в целом. Считается, что высокое генетическое разнообразие особей в пределах семьи увеличивает ее приспособленность – жизнеспособность, устойчивость к болезням и т.д. (Taru et al., 2015). Действительно, одна из гибридных семей показала высокое генетическое разнообразие и характеризовалась как сильная

продуктивная семья (что может быть следствием гетерозиса). Однако две другие гибридные семьи, при таком же уровне генетического разнообразия, характеризовались как слабые, с низкой зимостойкостью и продуктивностью, т.е. в данном случае гибридизация привела к неблагоприятным последствиям.

НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОДВИДОВ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

Информативность морфометрических показателей и вариантов мтДНК. В результате исследования медоносных пчел Сибирского региона было показано, что среди морфометрических признаков высоко информативными и минимально необходимыми для выяснения породной принадлежности являются 3 показателя крыла – кубитальный и гантельный индексы и дискоидальное смещение. Однако в некоторых случаях (при гибридизации или изоляции пчел), когда наблюдается несоответствие данных морфометрии стандартам соответствующих подвидов пчел, необходимо исследование дополнительных маркеров, например, вариабельности локуса COI-COI мтДНК. Несмотря на то, что анализ мтДНК позволяет оценить генетический вклад только по линии матки, использование комплексного подхода (морфометрический анализ 3-х показателей крыла и мтДНК-анализ) обеспечивает достаточно точную идентификацию подвидов (Конусова, Островерхова и др., 2016).

Информативность микросателлитных локусов и перспективы их использования. Как среди морфометрических показателей и вариантов мтДНК, так и среди 31 исследованного микросателлитного локуса не выявлено универсального маркера, позволяющего однозначно идентифицировать подвиды *A. mellifera*, но обнаружены локусы, характеризующиеся специфическим распределением частот аллелей у пчел разного происхождения и/или географической локализации, которые могут быть использованы в качестве породо- и/или эко-специфичных маркеров. В целом, среди исследованных локусов можно выделить 3 группы ДНК-маркеров.

1) Породо-специфичные локусы. Для этих локусов (A043, Ap081, A088, A028, A008, A113, K0711, *mrip3* и др.) идентифицированы преобладающие аллели у *A. m. mellifera*, которые могут быть рассмотрены как специфичные для эволюционной ветви М. У пчел эволюционной линии С (*A. m. carnica* и *A. m. carpatica*) эти аллели выявлены с более низкой частотой (табл. 2, 3).

2) Локусы, специфичные для разных экотипов *A. m. mellifera*. Для этих локусов (A008, A007, A088) показаны различные спектр и частоты аллелей у *A. m. mellifera* различных популяций России и Европы (табл. 4). Локус A008 представляет наибольший интерес не столько для дифференциации подвидов, сколько для дифференциации экотипов *A. m. mellifera*. Этот локус может быть рассмотрен как ДНК-маркер, ассоциированный с географическими или экологическими условиями (специфические адаптации к местным условиям окружающей среды). **3) Неспецифичные локусы.** Для данных локусов не выявлено особенностей в спектре и частоте аллелей у пчел разного происхождения и/или географической локализации.

В настоящее время существует ряд ограничений при использовании ДНК-маркеров ядерного генома, таких как отсутствие базы данных по варибельности маркеров у пчел разных популяций, референс-материалов по микросателлитным локусам и стандартов проведения молекулярно-генетических исследований (например, требований к размеру выборок для исследования). Тем не менее, как показано в настоящем исследовании, в некоторых случаях микросателлитные локусы являются высоко информативными, например, при оценке уровня интрогрессии генов, выявлении следов гибридизации и др.

Таким образом, несмотря на широкий арсенал применяемых методов, на данный момент не существует ни универсального метода, ни универсального морфометрического или ДНК-маркера для идентификации подвидов медоносной пчелы (табл. 5). Морфометрические и молекулярно-генетические маркеры взаимно дополняют друг друга, и каждый маркер вносит свой вклад в определение подвидовой принадлежности пчел/семей. Только комплексный подход с использованием морфометрических показателей, ДНК-маркеров как митохондриального, так и ядерного геномов, обеспечивает точную идентификацию подвидов *A. mellifera*, а также позволяет более полно описывать структуру популяций, генотипический состава семей, уровень интрогрессии генов линии С в М-линию и др. Такой подход позволил идентифицировать различные подвиды медоносной пчелы в Сибири, определить зоны гибридизации пчел, выявить популяции *A. m. mellifera*. Полученные результаты являются научной основой для проведения генетической паспортизации пчел и выявления значимых линий (экотипов) местных пчел, сохранения и рационального использования аборигенных рас, а в перспективе – селекционно-племенной работы по отбору семей с высокими хозяйственно-значимыми показателями.

Таблица 5 – Информативность морфометрического и молекулярно-генетического методов при идентификации подвидов *A. mellifera*

Подвид	Морфометрический метод				Молекулярно-генетический метод		
	Окраска тергитов	Кубитальный индекс, усл. ед.	Гантельный индекс, усл. ед.	Дискоидальное смещение	мтДНК (локус COI-COII)	Микросателлитный локус	
						универсальный	специфический
<i>A.m.mellifera</i> *	Темная	1,60	0,600–0,923	–	P2Q–P5Q	нет	A008, A043, A088, A028, Ap081, <i>mrjp3</i>
<i>A.m.carnica</i> *	Серая	2,65	≥0,925	+	Q	нет	A043, A088, A028, Ap081, <i>mrjp3</i>
<i>A.m.carpatica</i> *	Серая	2,65	≥0,925	+	Q	нет	Нет данных
<i>A.m.ligustica</i> #	Желтая	2,03–2,55	0,897–0,965	+	Q	нет	Нет данных
<i>A.m.caucasica</i> *#	Серая	1,90–2,00	0,682–1,017	–	Q	нет	Нет данных

Примечание. Морфометрические показатели представлены * – согласно стандартам породы (Россия); # – собственные данные (изучена линия кордован *A. m. ligustica*). Красным цветом выделены информативные маркеры; желтым – потенциальные ДНК-маркеры; остальные маркеры – неинформативные.

ЗАРАЖЕННОСТЬ ПЧЕЛИНЫХ СЕМЕЙ СИБИРСКОГО РЕГИОНА ПАРАЗИТАМИ И ПАТОГЕНАМИ

Характеристика эпизоотологического состояния пасек Томской области

На территории Томской области за период 2008–2017 гг. зарегистрированы следующие опасные заболевания медоносных пчел: варроатоз, нозематоз и грибковые инфекции. **Варроатоз**, вызываемый клещом *V. destructor*, широко распространен, но степень поражения пчелиных семей различна (Конусова, Островерхова и др., 2012; Попова, Островерхова и др., 2014). **Нозематоз**, вызываемый микроспоридиями *N. apis* Zander, 1909 (нозематоз типа А) и *N. ceranae* Fries, 1996 (нозематоз типа С), также широко распространен на пасеках области. До 2012 г. нозематоз в Томской области диагностировали исключительно как классический нозематоз типа А. Однако в 2013 г. с использованием молекулярно-генетических методов был зарегистрирован первый случай заражения пчелиной семьи спорами *N. ceranae* (Островерхова и др., 2014). **Грибковые инфекции** обнаружены на более, чем 90% исследованных пасек. Выявлены возбудители таких опасных микозов, как аскофероз (*Ascosphaera apis*) и аспергиллез (р. *Aspergillus*) в более чем 40% пасек и семей, причем выявлены три вида грибов р. *Aspergillus* (*A. niger*, *A. fumigatus* и *A. flavus*). **Бактериальные инфекции** регистрировались достаточно редко (описан единственный случай выявления парагнильца (возбудитель *Bacillus paraalvei*), в пробе с пасеки п. Аникино в 2013 г. Встречаются также условно патогенные возбудители (грибки *Penicillium sp.*, *Mucor*, бактерии *Citrobacter diversus*), которые могут ослаблять здоровье семьи, приводить к серьезным болезням, развитию вторичных инфекций, а в определенных условиях и к гибели семьи.

Степень зараженности семей и пасек основными болезнями изменялась в течение 2009–2017 гг., что может быть связано с особенностями погодных условий разных лет. Так, в 2017 г. зарегистрирован наиболее низкий уровень зараженности пасек основными болезнями (кроме нозематоза) за последние 5 лет (табл. 6). Однако, наиболее опасные микозы (аспергиллез и аскофероз) выявлялись ежегодно во многих семьях: в 2016 г. – на 46,15% пасек и 42,86% семей; в 2017 г. – на 43,33% пасек и в 37,50% семей от числа обследованных.

Таблица 6 – Динамика зараженности пчелиных семей и пасек основными болезнями за период 2016–2017 гг.

Заболевание	2016 г.		2017 г.	
	Кол-во изученных пасек/семей, шт.	Доля зараженных пасек/семей,%	Кол-во изученных пасек/семей, шт.	Доля зараженных пасек/семей, %
Варроатоз	5/20	60,00/60,00	31/41	25,81/ 21,95
Нозематоз	36/99	58,33/58,59	31/41	70,97/78,05
Микозы	13/28	92,31/96,43	30/40	73,33/57,50

В общем, эпизоотологическое состояние заболеваемости медоносных пчел в Томской области рассматривается относительно стабильным: отмечены единичные случаи осеннего слета пчел и гибели семей после зимовки в отличие от других территорий как России, так и мира, где массовая гибель пчелиных семей часто наблюдается на пасеках, начиная с 2000-х годов. Так, в 2016 г.

описаны случаи массовой гибели семей после зимовки на трех пасеках северных районов области (Молчановском и Тегульдетском). Течение заболевания характеризовалось как типичное для нозематоза типа А. Исследование пчел на варроатоз и нозематоз позволяет рассматривать наиболее вероятной причиной гибели семей нозематоз (показано наличие обоих возбудителей р. *Nosema*).

Зараженность микроспоридиями рода *Nosema* медоносных пчел на пасеках Сибирского региона

Многолетняя динамика зараженности. Начиная с 2013 года, когда впервые в Томской области выявлен нозематоз типа С, были зарегистрированы новые случаи заражения пчел микроспоридиями *N. ceranae* сначала в южных (в Томском, Шегарском, 2014–2016 гг.), а затем и в северных (в Молчановском и Тегульдетском, 2016 г.) районах области (Островерхова и др., 2014, 2016; Ostroverkhova et al., 2016). Зараженность как пчелиных семей, так и пасек возбудителями р. *Nosema* значительно возросла за последние два года (табл. 7), причем, если до 2016 г. на пасеках области преимущественно регистрировался возбудитель нозематоза *N. apis* (около 80%), то в 2016–2017 гг. *N. ceranae* был выявлен в большинстве исследованных семей (66–81%) и пасек (68–93%). Для значительного числа семей (37–41%) и пасек (32–73%) характерна ко-инвазия.

Таблица 7 – Зараженность пчелиных семей и пасек Томской области микроспоридиями *Nosema* за период 2012–2017 гг.

Период, гг.	Кол-во пасек/ семей, шт.	Кол-во зараженных, шт./(%)		Количество зараженных пасек/семей от общего числа зараженных, шт. (%) [#]		
		пасек	семей	<i>N. apis</i>	<i>N. ceranae</i>	ко-инвазия
2012–2015	68/132 [#]	24 (35,3)	40 (30,3)	18(75,0)/ 33(82,5)	2(8,3)/ 3(7,5)	4(16,7)/ 4(10,0)
2016	36/99* 15/41 [#]	21 (58,3)	58 (58,6)	1(6,7)/ 8(19,5)	3(20,0)/ 18(43,9)	11(73,3)/ 15(36,6)
2017	31/41 [#]	22 (71,0)	32 (78,0)	7(31,8)/ 11(34,4)	8(36,4)/ 8(25,0)	7(31,8)/ 13(40,6)

Примечание. Использован: * – метод световой микроскопии; # – метод ПЦР.

Неожиданным было выявление двух видов *Nosema* (с преобладанием *N. ceranae*) в большинстве изученных семей на трех изолированных пасеках Красноярского края. Так, из 11 исследованных семей в 9 семьях (81,8%) зарегистрирован *N. ceranae* в «чистом» виде или в форме ко-инвазии (30,0% и 60,0%, соответственно, от числа зараженных семей) (Островерхова и др., 2018). Эти данные позволяют предположить, что вид *N. ceranae* широко распространен в природе. В связи с этим, были проведены: 1) ретроспективный анализ зараженности семей и пасек Томской области в период 2008–2012 гг.; 2) изучение распространенности двух видов *Nosema* в различных экологических регионах Северной Азии; 3) анализ сезонной динамики зараженности семей микроспоридиями р. *Nosema* в 2017 г.; 4) поиск маркеров, ассоциированных с заболеваемостью/ устойчивостью к нозематозу, с целью выявления генетической компоненты в распространении видов *Nosema* в популяциях медоносной пчелы.

В ходе ретроспективного анализа зараженности медоносных пчел нозематозом типа С на пасеках Томской области (2008–2012 гг.) нозематоз был выявлен на 14 пасеках (77,8% из исследованных пасек) в 42 семьях (56,8%); возбудитель *N. ceranae* зарегистрирован на 72,2% изученных пасек в 76,2% зараженных семей (рис. 11). Только на одной из зараженных нозематозом пасек в одной из двух изученных семей обнаружен вид *N. apis*, на остальных пасеках – выявлены оба паразита (ко-инвазия). Из 42 зараженных нозематозом семей в 10 семьях (23,8%) выявлен только вид *N. apis*, в других 10 семьях (23,8%) – только вид *N. ceranae*, тогда как в большинстве случаев (22 семьи, 52,4%) – ко-инвазия. Таким образом, установлено, что паразит *N. ceranae* присутствовал в пчелосемьях на пасеках разных районов Томской области (в том числе и северных, где пчеловодство менее развито), как минимум, начиная с 2009 года; следовательно, можно предположить, что распространенность нозематоза типа С связана не только с завозом зараженных семей на незараженные территории, но и с естественным распространением возбудителя в природе (идентификация *N. ceranae* на изолированных пасеках Красноярского края).

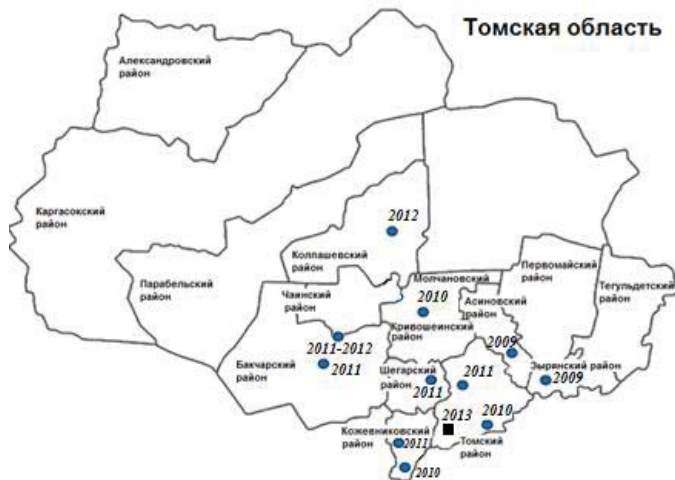


Рисунок 11 – Распространение *N. ceranae* на пасеках районов Томской области (указаны года сбора материала). Населенные пункты, расположенные на расстоянии менее 15 км, обозначены одной точкой. Пасека, где впервые в Томской области выявлен данный возбудитель (2013), отмечена квадратом.

Зараженность нозематозом пасек, расположенных в различных экологических регионах Северной Азии. Для изучения особенностей распространения двух видов *Nosema* в природе исследовано распределение видов *Nosema* на пасеках разных экологических регионов Северной Азии в течение 2016–2017 гг. Оба вида (*N. apis*, *N. ceranae*) были зарегистрированы в пчелосемьях на пасеках всех изученных экологических регионов (южной тайге, подтайге, лесостепи и горно-таежных лесах); наименее зараженными оказались пасеки в зоне лесостепи, наиболее зараженными – в подтайге (рис. 2, табл. 8). Вид *N. ceranae* наряду с *N. apis* широко распространен в районах, характеризующихся суровыми климатическими условиями с продолжительной холодной зимой. Во всех экологических регионах на исследованных пасеках преобладала микроспоридия *N. ceranae* в форме ко-инвазии (38,5–65,0% от числа зараженных пасек), но выпеснения паразита *N. apis* более агрессивным возбудителем *N. ceranae* не наблюдается.

Таблица 8 – Распределение двух видов *Nosema* на пасаках различных экологических регионов Северной Азии в 2016–2017 гг.

Экологический регион	Кол-во пасек	Количество пасек, шт (%)				Климат
		<i>Nosema</i> не выявлена	<i>Nosema</i> выявлена			
			<i>N.apis</i>	<i>N.ceranae</i>	<i>N. apis</i> и <i>N.ceranae</i>	
Южная тайга	21	8 (38,1)	4 (19,1)	4 (19,1)	5 (23,8)	Континентальный
Подтайга	27	7 (25,9)	5 (18,5)	2 (7,4)	13 (48,2)	
Лесостепь	18	9 (50,0)	2 (11,1)	3 (16,7)	4 (22,2)	Резко-континентальный
Горно-таежные леса	11	4 (36,4)	1 (9,1)	2 (18,2)	4 (36,4)	
Итого	77	28 (36,4)	12 (15,6)	11 (14,3)	26 (33,8)	

В последние два года отмечено резкое увеличение зараженности пасек на территории подтайги возбудителем *N. ceranae* в форме ко-инвазии: оба вида *Nosema* совместно сосуществуют на 48,2% исследованных пасек (табл. 9), что, возможно, связано с увеличением продолжительности и теплообеспеченности периода активной жизнедеятельности биологических объектов с 2013 по 2017 гг. Так, сумма температур за период со средней суточной температурой воздуха >10°C изменилась с 1587 в 2013 г. до 2217 в 2016 г. и 1912 в 2017 г.; продолжительность периода с активными температурами (средние суточные температуры свыше 10°C) увеличилась с 86 суток в 2013 г. до 124 суток в 2017 г.

Таблица 9 – Распределение двух видов *Nosema* на пасаках в зоне подтайги в 2012–2017 гг.

Период	Количество пасек	Доля зараженных пасек (%)			
		<i>Nosema</i> не обнаружена	<i>Nosema</i> выявлена		
			<i>N.apis</i>	<i>N.ceranae</i>	<i>N.apis</i> + <i>N.ceranae</i>
2012–2013	26	53,9	42,3	3,9	0
2014–2015	26	42,3	42,3	3,9	11,5
2016–2017	27	25,9	18,5	7,4	48,2
Итого	79	40,5	31,7	8,9	20,3

Не исключено, что изменение климата будет оказывать серьезное влияние на распространение в регионах Северной Азии микроспоридии *N. ceranae*, споры которой менее устойчивы к низким температурам, чем споры *N. apis*. Действительно, температура рассматривается одним из основных факторов, определяющих жизнеспособность спор *Nosema* (Fenoy et al., 2009; Gisder et al., 2010, 2017; Sánchez Collado et al., 2014). Считается, что вид *N. ceranae* размножается при более высоких температурах, обладает лучшими адаптациями для завершения своего жизненного цикла в широком диапазоне температур, характеризуется большим биотическим потенциалом по сравнению с *N. apis* и отнесен к эвритермному виду в отличие от стенотермного вида *N. apis*.

Паразито-хозяйинные и межвидовые взаимоотношения микроспоридий рода *Nosema*. С целью изучения межвидовых отношений микроспоридий рода *Nosema* (аспекты совместного существования, конкуренция) и выявления факторов, влияющих на развитие заболевания, был проведен анализ сезонной динамики доли зараженных нозематозом особей в пчелиных семьях на пасеке Томской области. Для анализа сезонной динамики зараженности видами *Nosema* пяти семей в течение пчеловодческого сезона 2017 гг. от каждой семьи

было отобрано 8 проб (по 20–30 особей в пробе) в период май–сентябрь (в среднем, один раз в две недели с 10 мая по сентябрь, но один раз в августе) и проведен анализ отдельно для каждой рабочей особи (индивидуальный анализ). Наблюдается определенная динамика зараженности семей с двумя пиками в конце июня (74% зараженных особей спорами *Nosema* без учета видовой принадлежности) и в конце августа (59% зараженных особей) (рис. 12, А). В конце мая зарегистрировано снижение числа зараженных особей, что может быть результатом лечения, проведенного 27.04.17; с середины июня до середины июля значительно возрастает число зараженных особей; к концу июля – вновь уменьшение, но в течение августа происходит рост числа зараженных особей, который прекращается, возможно, в результате очередного лечения семей.

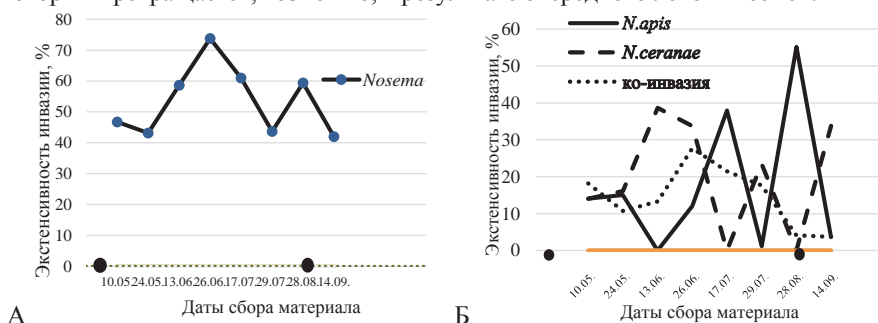


Рисунок 12 – Динамика зараженности особей пяти пчелиных семей с пасеки п. Заречный спорами *Nosema* в течение пчеловодческого сезона 2017 г.: А – общая зараженность; Б – зараженность разными видами *Nosema*. Точками обозначены даты лечения пчелиных семей (27.04.17 и 1.09.17 г.).

Интенсивность инвазии отдельных особей на протяжении всего периода наблюдения невысокая (10–100 спор в поле зрения микроскопа при увеличении $\times 200$), но полной гибели паразита не произошло; пчелы не болеют, но являются носителями болезни. Возможно, лечение семей обеспечило снижение зараженности пчел (за счет частичной гибели паразита), что не привело к вспышке заболевания.

Динамика экстенсивности инвазии пчел спорами разных видов (*N. ceranae*, *N. apis* и ко-инвазия) была однотипна во всех исследованных семьях. При этом регистрировалась разнонаправленная динамика зараженности медоносных пчел двумя паразитами: когда преобладали пчелы, зараженные *N. ceranae* (июнь), было выявлено минимальное количество пчел, зараженных *N. apis* (рис. 12, Б); и наоборот, когда преобладали пчелы, зараженные *N. apis* (июль, август), количество пчел, зараженных *N. ceranae*, снижалось практически до нуля.

С целью выявления факторов, которые могут определять противоположную динамику зараженности семей двумя видами *Nosema*, проведен анализ погодных условий, наблюдаемых в течение сезона 2017 г. Используются данные за период май–сентябрь (температура, влажность), полученные с ближайшей к пасеке метеостанции. Учитывались следующие показатели: средние значения среднесуточных температур и увлажнения за период, предшествующий взятию пробы. Анализировались как отдельно взятые показатели температуры и влажности,

так и интегральный показатель (гидротермический коэффициент, ГТК). Данные по первым двум периодам сбора проб не учитывались, чтобы исключить влияние химического препарата, использованного для лечения.

Выявлена зависимость общей зараженности особей в семьях спорами *Nosema* от температуры (рис. 13, А), тогда как распространение вида паразита, вероятно, определяется степенью увлажнения (рис. 13, Б, В). При снижении уровня увлажнения преобладал возбудитель *N. ceranae* и, наоборот, при увеличении уровня увлажнения преобладал паразит *N. apis*. Для случаев «ко-инвазии» характерны: 1) невысокое ($\leq 30\%$) количество зараженных особей; 2) динамика зараженности более близка к таковой у пчел, зараженных *N. ceranae* (рис. 12, Б). Возможно, вариант «ко-инвазии» является промежуточным состоянием, при котором в результате конкуренции двух видов *Nosema*, «выигрывает» тот вид, для которого в данный момент времени режим увлажнения (возможно и другие факторы) является оптимальным для развития.

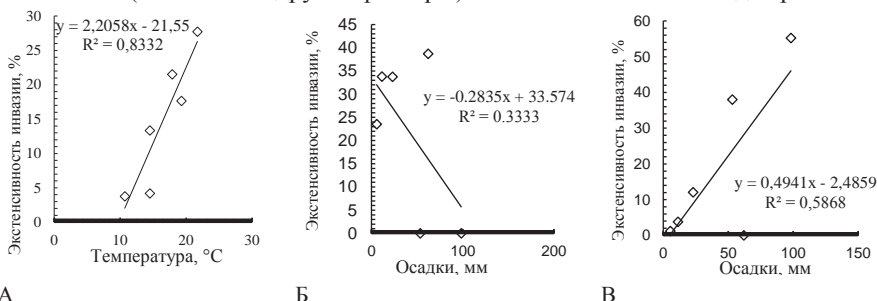


Рисунок 13 – Характеристика зараженности пчелосемей паразитами *Nosema* в зависимости от абиотических факторов: зависимость общей зараженности особей от температуры (А); зависимость зараженности особей *N. ceranae* (Б) и *N. apis* (В) от степени увлажнения.

ПОИСК ДНК-МАРКЕРОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПАРАМЕТРАМИ ПРОДУКТИВНОСТИ И УСТОЙЧИВОСТИ К ЗАБОЛЕВАНИЯМ У МЕДОНОСНЫХ ПЧЕЛ РАЗЛИЧНОЙ ПОРОДНОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Информативность локуса *mrjр3* для оценки пчелиных семей по продуктивности маточного молочка

Первоначально была проведена оценка значимости вариантов локуса *mrjр3* для определения **силы семьи** и **медопродуктивности** (учитывались также данные по вариабельности локуса *mrjр3* у разных подвидов пчел). Сравнительный анализ генетических особенностей семей среднерусской породы, различающихся по хозяйственно-значимым показателям, указывает на значимость локуса *mrjр3* скорее для определения породной принадлежности (позволяет оценивать принадлежность к *A. m. mellifera* и выявлять наличие следов гибридизации), чем маркера для детерминации хозяйственно-полезных признаков пчелиной семьи. Так, аллель "529", специфичный для среднерусских пчел, является «положительным» (возможно даже необходимым) для породы,

адаптированной к определенным природно-климатическим условиям, но «недостаточным» для формирования высоких хозяйственно-значимых показателей семьи: все пчелы в «слабой» семье имели генотип "529–529", т.е. потеря разнообразия пчел по данному локусу неблагоприятно сказывается на продуктивности пчелосемьи. Таким образом, если варианты локуса *mrjр3* и вносят вклад в определение продуктивности, то это не единственный показатель, определяющий хозяйственно-значимые признаки пчелосемей.

На втором этапе была изучена вариабельность локуса *mrjр* в выборках пчел от 7 гибридных семей, различающихся по продуктивности маточного молочка. Установлено, что включенные в исследование семьи происходили от «южных» пород по материнской линии (выявлен вариант Q локуса COI-COII), во внимание были приняты описанные ранее данные по генетическим особенностям «южных» пород (табл. 2, 3). Показано, что продуктивность маточного молочка зависела от суммарной частоты аллелей "406" и "518" локуса *mrjр3*, характерных для «южных» пород. Таким образом, с одной стороны, уровень продуктивности можно связать с наличием аллелей "406" и "518", а с другой, со степенью гибридизации (вытеснение генетических вариантов, характерных для «южных» пород). Возможно, данный маркер в большей степени определяет породность и, следовательно, по генетическим вариантам локуса *mrjр3* можно оценивать уровень гибридизации, которая, в свою очередь, может оказывать негативное влияние на продуктивность. Данные настоящего исследования не согласуются с таковыми, полученными при изучении ассоциированности вариантов локуса *mrjр3* с продуктивностью маточного молочка у африканизированных пчел (Baitala et al., 2010), что указывает на недопустимость в селекционной работе переносить результаты, полученные в одних географических регионах (природно-климатических условиях) на другие территории и популяции без их верификации (Ostroverkhova et al., 2018).

ДНК-маркеры, ассоциированные с заболеваемостью/ устойчивостью к нозематозу

Исследование зараженности микроспоридиями *Nosema* семей разного происхождения (на уровне отдельных особей) показало высокую степень заражения пчел всех пород, причем преобладал вид *N. ceranae* либо в «чистой» форме, либо в форме ко-инвазии (табл. 10).

Таблица 10 – Зараженность спорами *Nosema* особей в пчелосемьях различного происхождения

Кол-во особей	Заражено								Не заражено	
	Всего		<i>N. apis</i>		<i>N. ceranae</i>		ко-инвазия		шт	%
	шт	%	шт	%	шт	%	шт	%		
<i>Среднерусская порода A. m. mellifera</i> (28 семей)										
553	468	84,6	35	6,3	115	20,8	318	57,5	85	15,4
<i>Карпатская порода A. m. carpatica</i> (5 семей)										
148	99	66,9	6	4,15	45	30,4	48	32,4	49	33,1
<i>Карника A. m. carnica</i> (4 семьи)										
104	92	88,5	14	13,5	18	17,3	60	57,7	12	11,5
<i>Серая горная кавказская порода A. m. caucasica</i> (3 семьи)										
85	46	54,1	8	9,4	32	37,7	6	7,1	39	45,9

Гибели семей не отмечено, то есть семьи являются носителями заболевания. Такие паразито-хозяйинные отношения могут определяться генетическими особенностями медоносных пчел (семей). С целью поиска генетических вариантов, определяющих устойчивость пчел к нозематозу, проведен сравнительный анализ генетических особенностей пчел *A. m. mellifera*, а также *A. m. carnica* и *A. m. carnica* (в качестве дополнительных групп) с разными показателями экстенсивности заражения возбудителями *Nosema*.

Наиболее перспективными маркерами для определения устойчивости к нозематозу являются микросателлитные локусы AC117, Ap243 и SV185, аллели которых, вероятно, обладают протективными свойствами у пчел среднерусской породы: аллель "177" локуса AC117 ($OR=0,16$; 95% $CI=0,04-0,58$; $\chi^2/p=7,76/0,005$); аллель "263" локуса Ap243 ($OR=0,21$; 95% $CI=0,06-0,75$; $\chi^2/p=5,51/0,02$); аллель "269" локуса SV185 ($OR=0,44$; 95% $CI=0,21-0,93$; $\chi^2/p=4,68/0,03$) для групп незараженные – сильно зараженные особи. Особый интерес представляют локусы, являющиеся общими маркерами устойчивости к нозематозу для разных пород пчел. К их числу можно отнести: локус H110, аллель "162" которого снижает риск заражения нозематозом у пчел «южных» пород (карпатской ($OR=0,03$; 95% $CI=0,01-0,06$; $\chi^2/p=127,53/0,00$) и карники ($OR=0,04$; 95% $CI=0,01-0,15$; $\chi^2/p=37,42/0,00$)); локус Ap243, аллельные варианты которого показали ассоциации с нозематозом у пчел среднерусской и карпатской пород (аллель "255" – $OR=0,29$; 95% $CI=0,10-0,84$; $\chi^2/p=6,87/0,0088$). Таким образом, как сами локусы, показавшие ассоциации с нозематозом у пчел среднерусской породы и пород южного происхождения, так и хромосомные регионы их локализации можно рассматривать как потенциально значимые для оценки риска заражения нозематозом.

АЛГОРИТМ ПРОВЕДЕНИЯ СЕЛЕКЦИОННОЙ РАБОТЫ ПО ОТБОРУ И РАЗВЕДЕНИЮ СЕМЕЙ, АДАПТИРОВАННЫХ К ОПРЕДЕЛЕННЫМ ПРИРОДНО-КЛИМАТИЧЕСКИМ УСЛОВИЯМ И ОБЛАДАЮЩИХ ВЫСОКИМИ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЗНАЧИМЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ

На основании проведенного морфометрического и молекулярно-генетического анализа медоносных пчел и семей с пасек Сибирского региона, а также пчел «южных» пород, разработана и апробирована система анализа чистопородности семей (как элемента паспортизации пчел) при проведении селекционных работ в питомнике с использованием диагностических морфометрических и молекулярно-генетических маркеров (табл. 11). После определения породной принадлежности может проводиться отбор семей по биологическим и хозяйственно-значимым признакам медоносных пчел (медопродуктивность, зимостойкость, плодовитость, устойчивость к болезням) (Конусова, Островерхова и др., 2010). Комплексный анализа лежит в основе отбора племенных пчелиных семей и управления селекционным процессом.

Алгоритм проведения мониторинговых исследований пасек Томской области по зараженности пчелиных семей паразитами и патогенами

В настоящем исследовании установлено распространение на пасеках Томской области таких заболеваний медоносных пчел, как нозематоз, варроатоз и грибковые

инфекции. В связи с тем, что нозематоз типа С первоначально рассматривался как новое (завезенное) заболевание пчел в Сибири, акцент был сделан на изучении пространственно-временных характеристик нозематоза, а также выявлении возможных причин распространения болезни.

Таблица 11 – Система анализа чистопородности пчелиных семей с использованием диагностических морфометрических и ДНК-маркеров

ЭТАП 1. мтДНК-АНАЛИЗ. Определение происхождения семьи по материнской линии (изучение вариантов локуса COI-COII). Исследуется 5 пчел от семьи.			
Вариант PQQ, PQQQ ↓ Среднерусская порода	Вариант Q ↓ «Южная» порода	Оба варианта ↓ Семья выбраковывается	
ЭТАП 2. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ. Определение происхождения семьи с учетом вклада обоих полов (линия матки и линия трутней). Исследуется 30 пчел от семьи.			
Кубитальный индекс, %			
60–65	33–43	Несоответствие стандарту	
Гантельный индекс, усл.ед.			
0,600–0,923	Не ниже 0,925	Несоответствие стандарту	
Дискоидальное смещение			
"-" (96–100% особей) ↓ Среднерусская порода	"+" (96–100% особей) ↓ Карпатская порода	Несоответствие стандарту ↓ Помесь. Семья выбраковывается	
ЭТАП 3. МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ. Определение чистопородности пчелиных семей и уровня интрогрессии генов. Исследуется 10–30 пчел от семьи.			
A43	Генотип особей "128–128", аллель "128"	Генотип особей "140–140", аллель "140"	Наличие обоих аллелей (>5%). До 5% – следы гибридизации
mpj3	Наличие у большинства особей аллеля "529"	Наличие у большинства пчел аллелей "406", "518"	Наличие разных аллелей в пчелиной семье
AI13	Преобладают аллели "218" и "220", реже аллели >220	У пчел преобладает аллель "212"	Наличие разных аллелей в пчелиной семье
A8	Преобладание «легких» аллелей (154–170 пн)	Преобладание аллелей размером >173 пн	Наличие разных аллелей в пчелиной семье
Ap49	Наличие у большинства пчел семьи аллеля "127"	Наличие у большинства пчел аллелей "130", "139"	Наличие разных аллелей в пчелиной семье
A24	Наличие у большинства особей аллелей (90–96 пн)	Наличие у большинства пчел аллелей >100 пн	Наличие разных аллелей в пчелиной семье
↓ Среднерусская порода		↓ Карпатская порода	↓ Помесь. Процесс интрогрессии. Семья выбраковывается
Определение экотипа <i>Apis mellifera mellifera</i>			
A8	Генотип большинства пчел "162–162"	В семье частота аллеля "154" преобладает	В семье частота аллеля "148" преобладает
↓ Сибирский экотип		↓ Уральский экотип	↓ Европейский экотип

Полученные данные (волнообразное течение болезни, наличие «промежуточного» состояния ко-инвазии двух паразитов, опосредованное влияние климатических факторов на развитие болезни и др.) указывают на важность изучения различных аспектов и для других болезней (например, вирусных инфекций). Предлагаемый алгоритм разработан не только для верификации полученных результатов, но и для мониторинга эпизоотологической ситуации на пасаках Томской области.

Порядок мониторинговых мероприятий определяется, прежде всего, особенностями биологии возбудителей болезни, характером взаимодействия медоносной пчелы с паразитами и патогенами и включает следующие этапы: 1) определение очагов заболеваний на основе данных по распространению опасных болезней пчел на пасаках; 2) изучение условий содержания пасек, выявление возможных источников заражения и распространения инфекции; 3) отбор проб минимум с 3–5 пасек, расположенных в очагах болезней перед, во время и после зимовки, в течение пчеловодческого сезона; 4) исследование пчело семей на нозематоз, варроатоз и грибковые инфекции; 5) рекомендации пчеловоду при выявлении заболевания по проведению лечебных мероприятий (Острроверхова и др., 2016). Несмотря на большой объем материала, длительность и масштаб планируемых исследований, которые должны охватывать разные территории, природно-климатические условия и временные аспекты, необходимость и важность таких исследований не вызывает сомнения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе представлены результаты комплексного изучения биологического разнообразия медоносных пчел, обитающих в Сибири (как чистопородных пчел, так и гибридов) по комплексу молекулярно-генетических маркеров митохондриального и ядерного геномов. Анализ специфичности пород и семей гибридного происхождения по изученным генетическим локусам позволил оценить уровень интрогрессии генов С-линии в М-линию и выявить ДНК-маркеры, потенциально значимые для адаптации к природно-климатическим условиям. Эти данные являются основой для дальнейших мониторинговых исследований состояния биологического разнообразия и адаптационного потенциала пород и экотипов, обитающих в Сибири и других регионах. С использованием комплекса микросателлитных локусов детально охарактеризованы популяции медоносной пчелы, соответствующие стандартам *A. mellifera* по данным морфометрии и вариантам локуса COI-COI мтДНК. Выявлены пчелосемьи среднерусской породы, наиболее перспективные для дальнейшего разведения в пчелопитомниках.

Изучение зараженности пчелиных семей и пасек паразитами и патогенами показало, что наиболее распространенными болезнями на пасаках Сибири являются варроатоз, нозематоз и грибковые инфекции. Установлено, что возбудитель нозематоза типа С – *N. ceranae*, который первоначально рассматривался как новый (недавно завезенный в Сибирь) паразит медоносной пчелы, широко распространен в природе (присутствует на пасаках Томской области как минимум с 2009 г., а также длительно изолированных пасаках

Красноярского края), но вытеснения им паразита *N. apis* не наблюдается. Выявлена прямая зависимость общей зараженности особей в пчелиных семьях спорами *Nosema* от температуры, а зараженность разными видами возбудителя – от влажности. При снижении уровня увлажнения преобладал вид *N. ceranae* и, наоборот, при увеличении уровня увлажнения преобладал вид *N. apis*.

Сравнительный анализ генетических особенностей семей, различающихся по продуктивности и устойчивости к болезням, позволил определить информативность ряда ДНК-маркеров для оценки продуктивности, силы семьи, устойчивости к нозематозу, а также для дальнейшего их использования в селекционно-племенной работе по разведению семей с преимущественными признаками. Данное комплексное исследование, включающее характеристику биологического разнообразия и адаптационного потенциала медоносной пчелы *A. mellifera* Сибири, в конечном итоге, направлено на создание научно-обоснованного подхода (алгоритма) проведения селекционно-племенной работы по отбору и разведению семей, адаптированных к определенным природно-климатическим условиям и обладающих высокими полезными хозяйственно-значимыми показателями. Разработаны научные основы сохранения популяций и генофонда уникального подвида *A. m. mellifera*, в том числе система оценки качества семей для проведения генетической паспортизации и создания племенного ядра в питомниках среднерусской породы на территории Сибири.

По результатам комплексного исследования медоносных пчел Сибири можно сделать следующие **выводы**:

1. Большинство пчелиных семей (около 60%) представлено гибридами между среднерусской породой (выявлены варианты PQQ и PQQQ мтДНК) и южных (преимущественно карпатской) пород согласно результатам комплексного анализа медоносных пчел Сибири, включающего анализ мтДНК (вариабельность локуса COI-COII) и данные по морфометрической изменчивости трех показателей крыла (кубитальный и гантельный индексы, дискоидальное смещение).

2. На территории Сибири в процессе гибридизации у медоносных пчел происходит «вытеснение» генов карпатской породы генами среднерусской пчелы согласно данным анализа изменчивости 11 микросателлитных локусов (A008, Ap049, AC117, A113, Ap243, A024, A043, H110, SV185, K0820 и *mrj3*) у медоносных пчел среднерусской и карпатской пород, а также их гибридов.

3. В результате исследования разнообразия пчел среднерусской породы (темной лесной пчелы), а также подвидов пчел южного происхождения (*A. m. carpatica*, *A. m. carnica*) по 31 микросателлитному локусу, определены породоспецифичные (локусы A043, Ap081, A088, A028, A008, A113, K0711, *mrj3*) и/или эко-специфичные (локусы A008, A007, A088) ДНК-маркеры, среди которых наиболее информативными являются локусы A043, A008, A028, A088.

4. Обитающая в различных географических регионах России и Европы медоносная пчела *A. m. mellifera* различается по генетическому разнообразию, оцененному по совокупности микросателлитных локусов. Варианты локусов A008 (аллель "162"), A088 (аллель "140") и A007 (аллель "107") определяют формирование сибирского экотипа темной лесной пчелы.

5. В условиях межпородной гибридизации у медоносной пчелы для выделения чистопородных семей и корректной дифференциации подвидов необходимо использовать комплексный подход, включающий анализ вариабельности локуса COI-COII мтДНК и данные по морфометрической изменчивости, среди которых необходимой высокой информативностью обладают три показателя крыла (кубитальный и гантельный индекс, дискоидальное смещение); оценка степени гибридизации и уровень интрогрессии между подвидами медоносной пчелы возможна на основании комплексного анализа изменчивости микросателлитных локусов.

6. На пасеках Томской области широко распространен нозематоз типа А и типа С (присутствует на территории области как минимум с 2009 года), варрооз и грибковые инфекции. Причиной массовой гибели пчелиных семей после зимовки 2016 года рассматривается ко-инвазия двух видов *Nosema*.

7. Возбудитель *Nosema ceranae* выявлен в различных экологических регионах Северной Азии (южной тайге, подтайге, лесостепи и горно-таежных лесах), преимущественно в форме ко-инвазии. В течение периода 2012–2017 гг. в зоне подтайги отмечено увеличение зараженности пчелиных семей спорами *Nosema* с 46% до 74%. Замещения *N. apis* возбудителем *N. ceranae* на пасеках Сибири не наблюдается.

8. Установлена разнонаправленная динамика зараженности медоносных пчел микроспоридиями *N. apis* и *N. ceranae* в течение пчеловодческого сезона согласно данным сравнительного анализа зараженности медоносных пчел разными возбудителями; выявлена зависимость общей зараженности особей в семьях спорами *Nosema* от температуры; а зараженность видами *Nosema* определяется степенью увлажнения: при снижении уровня увлажнения с большей частотой регистрируется возбудитель *N. ceranae*, при увеличении уровня увлажнения – возбудитель *N. apis*.

9. Микросателлитный локус *mrjр3* является информативным для определения породной принадлежности медоносных пчел: выявлено преобладание аллеля "529" у пчел *A. m. mellifera* сибирских популяций, аллели "406" и "518" чаще регистрируются у пчел южного происхождения. Хозяйственно-полезные признаки (сила семьи, продуктивность, количество маточного молочка), ассоциированы не с вариантами локуса *mrjр3*, а с уровнем гибридизации: более низкие значения хозяйственно-полезных признаков наблюдаются при снижении в семье доли пороодо-специфичных аллелей локуса *mrjр3*, а также при снижении уровня разнообразия по данному локусу.

10. Аллельным вариантам ряда микросателлитных локусов (AC117, Ap243, SV185, H110 и другие) характерна ассоциация с устойчивостью к нозематозу у медоносных пчел Сибирского региона.

11. Разработанный научно-обоснованный алгоритм проведения селекционной работы по отбору и разведению семей, адаптированных к определенным природно-климатическим условиям, включает определение чистопородности с использованием диагностических морфометрических и молекулярно-генетических маркеров, анализ зараженности семей паразитами и патогенами и оценку хозяйственно-значимых показателей.

Список опубликованных работ по теме диссертации

Статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук:

1. **Островерхова Н. В.** Оценка гибридных популяций медоносной пчелы / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов, Е. А. Белых, А. А. Воротов // Пчеловодство. – 2012. – № 3. – С. 14–17. – 0,27 / 0,05 а.л.

2. Конусова О. Л. Пчеловодство Томской области / О. Л. Конусова, **Н. В. Островерхова**, Ю. Л. Погорелов, Е. С. Попова, Т. Н. Киреева // Пчеловодство. – 2012. – № 9. – С. 8–9. – 0,18 / 0,04 а.л.

3. **Островерхова Н. В.** Популяционно-генетическая структура медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) в районе д. Леботер Чаинского района Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, А. Н. Кучер, Ю. Л. Погорелов, Е. А. Белых, А. А. Воротов // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2013. – № 1 (21). – С. 161–172. – 0,64 / 0,11 а.л.

4. **Островерхова Н. В.** Популяционно-генетическая характеристика пчел Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов, Т. Н. Киреева, А. А. Воротов, Е. А. Белых // Пчеловодство. – 2014. – № 3. – С. 16–18. – 0,26 / 0,04 а.л.

5. **Островерхова Н. В.** Первый случай диагностики *Nosema ceranae* на пасеке Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов, Т. Н. Киреева, М. Ю. Салик, Е. П. Голубева // Пчеловодство. – 2014. – № 9. – С. 28–30. – 0,23 / 0,04 а.л.

6. **Островерхова Н. В.** Генетическое разнообразие локуса COI-COII мтДНК медоносной пчелы *Apis mellifera* L. в Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, А. Н. Кучер, Т. Н. Киреева, А. А. Воротов, Е. А. Белых // Генетика. – 2015. – Т. 51, № 1. – С. 89–100. – DOI: 10.7868/S0016675815010105. – 0,94 / 0,16 а.л.

в переводной версии журнала, индексируемой Web of Science Core Collection:

Ostroverkhova N. V. Genetic Diversity of the Locus COI-COII of Mitochondrial DNA in Honeybee Populations (*Apis mellifera* L.) from the Tomsk Region / N. V. Ostroverkhova, O. L. Konusova, A. N. Kucher, T. N. Kireeva, A. A. Vorotov, E. A. Belikh // Russian Journal of Genetics. – 2015. – Vol. 51, № 1. – P. 80–90. – DOI: 10.1134/S102279541501010X.

7. Конусова О. Л. От Москвы-реки до Оби: две передвижные выставки / О. Л. Конусова, **Н. В. Островерхова**, Ю. Л. Погорелов // Пчеловодство. – 2015. – № 7. – С. 64–67. – 0,25 / 0,08 а.л.

8. **Островерхова Н. В.** Исследование полиандрии у медоносной пчелы (*Apis mellifera*) с использованием микросателлитных локусов / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, А. Н. Кучер, Т. Н. Киреева // Зоологический журнал. – 2016. – Т. 95, № 3. – С. 307–313. – DOI: 10.7868/S0044513416030119. – 0,59 / 0,15 а.л.

Web of Science Core Collection:

Ostroverkhova N. V. Investigation of polyandry in honey bees (*Apis mellifera*) using microsatellites / N. V. Ostroverkhova, O. L. Konusova, A. N. Kucher, T. N. Kireeva // Zoologicheskyy zhurnal. – 2016. – Vol. 95, is. 3. – P. 307–313. – DOI: 10.7868/S0044513416030119.

на англ. яз. (Springer):

Ostroverkhova N. V. Investigation of Polyandry in Honey Bees (*Apis mellifera*) Using Microsatellites / N. V. Ostroverkhova, O. L. Konusova, A. N. Kucher, T. N. Kireeva // Entomological Review. – 2016. – Vol. 96 (4). – P. 389–394. – DOI: 10.1134/S0013873816040011.

9. **Островерхова Н. В.** Зараженность семей медоносной пчелы (*Apis mellifera*) микроспоридиями рода *Nosema* (Microsporidia) на пасеках Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, А. Н. Кучер, А. В. Симакова, Е. П. Голубева, Т. Н. Киреева, И. В. Шарахов // Паразитология. – 2016. – Т. 50, № 3. – С. 197–210. – 1 / 0,14 а.л.

PubMed:

Ostroverkhova N. V. Infestation of honeybee (*Apis mellifera*) families by microsporidians of the genus *Nosema* in Tomsk province / N. V. Ostroverkhova, O. L. Konusova, A. N. Kucher, A. V. Simakova, E. P. Golubeva, T. N. Kireeva, I. V. Sharakhov // *Parazitologiya*. – 2016. – Vol. 50, is. 3. – P. 197–210. – PMID: 29115110.

10. Конусова О. Л. Характеристика морфометрической изменчивости медоносных пчел *Apis mellifera* L., отличающихся вариантами локуса COI-COII мтДНК / О. Л. Конусова, **Н. В. Островерхова**, А. Н. Кучер, Д. В. Курбатский, Т. Н. Киреева // *Вестник Томского государственного университета. Биология*. – 2016. – № 1 (33). – С. 62–81. – DOI: 10.17223/19988591/33/5. – 1,1 / 0,22 а.л.

11. **Островерхова Н. В.** Нозематоз типа С в Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, А. Н. Кучер, Е. П. Голубева, Т. Н. Киреева, Ю. Л. Погорелов // *Пчеловодство*. – 2016. – № 8. – С. 30–32. – 0,32 / 0,05 а.л.

12. **Ostroverkhova N. V.** Genetic diversity of honeybees in different geographical regions of Siberia / N. V. Ostroverkhova, A. N. Kucher, O. L. Konusova, T. N. Kireeva, I. V. Sharakhov // *International Journal of Environmental Studies*. – 2017. – Vol. 74, № 5. – P. 771–781. – DOI: 10.1080/00207233.2017.1283945. – 0,79 / 0,16 а.л. (*Scopus*)

13. **Островерхова Н. В.** Нозематоз типа С в Сибири: ретроспективный анализ / Н. В. Островерхова, Е. П. Голубева, Е. А. Бадмажапова, А. Н. Кучер, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов // *Пчеловодство*. – 2018. – № 1. – С. 32–34. – 0,3 / 0,05 а.л.

14. **Островерхова Н. В.** Характеристика нуклеотидной последовательности микросателлитного локуса *mrip3* у медоносных пчел разного происхождения / Н. В. Островерхова, А. Н. Кучер, Н. П. Бабушкина, О. Л. Конусова // *Генетика*. – 2018. – Т. 54, № 3. – С. 335–341. – DOI: 10.7868/S0016675818030062. – 0,59 / 0,15 а.л.

в переводной версии журнала, входящей в Web of Science Core Collection:

Ostroverkhova N. V. Sequence of the *mrip3* Microsatellite Locus in Honeybees of Different Origin / N. V. Ostroverkhova, A. N. Kucher, N. P. Babushkina, O. L. Konusova // *Russian Journal of Genetics*. – 2018. – Vol. 54, № 3. – P. 322–327. – DOI: 10.1134/S1022795418030109.

15. **Ostroverkhova N. V.** The *mrip3* microsatellite marker: determination of honeybee subspecies or / and royal jelly productivity of bee colony / N. V. Ostroverkhova, A. N. Kucher, O. L. Konusova, I. V. Sharakhov // *Far Eastern Entomologist*. – 2018. – № 353. – P. 24–28. – DOI: 10.25221/fee.353.3. – 0,35 / 0,09 а.л. (*Scopus*).

16. **Ostroverkhova N. V.** Variability and Structure of the Repetitive Region of the Major Royal Jelly Protein gene *mrip3* in Honeybee *Apis mellifera* of Different Evolutionary Branches / N. V. Ostroverkhova, A. N. Kucher, N. P. Babushkina, O. L. Konusova, I. V. Sharakhov // *Journal of Molecular Biology Research*. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 122–131. – DOI: 10.5539/jmbr.v8n1p122. – 0,92 / 0,18 а.л. (*Web of Science Core Collection*).

Монографии:

17. Роль биоразнообразия пчелиных в поддержании гомеостаза экосистем : монография. – Киров: НИИСХ Северо-Востока, 2017. – 308 с. – 19,25 / 0,07 а.л.

Авторская часть Н. В. Островерховой:

Киреева Т. Н. Генетическое разнообразие медоносных пчел с пасек Томской области по комплексу микросателлитных локусов / Т. Н. Киреева, Е. С. Гушина, **Н. В. Островерхова**, А. Н. Кучер. – С. 55–59.

Островерхова Н. В. Современное состояние популяций медоносной пчелы в Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, А. Н. Кучер, Ю. Л. Погорелов, Е. А. Бадмажапова. – С. 63–68.

18. Selected Studies in Biodiversity. – InTechOpen, 2018. – 483 p. – 30,2 / 0,19 а.л.

Авторская часть Н. В. Островерховой:

Ch. 9: **Ostroverkhova N. V.** Dark-Colored Forest Bee *Apis mellifera* in Siberia, Russia: Current State and Conservation of Populations / N. V. Ostroverkhova, A. N. Kucher, O. L. Konusova, E. S. Gushchina, V. V. Yartsev, Y. L. Pogorelov. – P. 157–180. – DOI: 10.5772/intechopen.71603.

в том числе монография, входящая в Web of Science Core Collection:

19. Beekeeping and Bee Conservation – Advances in Research. – ITexLi, 2016. – 251 p. – 15,7 / 0,44 а.л.

Авторская часть Н. В. Островерховой:

Ch. 1: **Ostroverkhova N. V.** A Comprehensive Characterization of the Honeybees in Siberia (Russia) / N. V. Ostroverkhova, O. L. Konusova, A. N. Kucher, I. V. Sharakhov. – P. 1–37. – DOI: 10.5772/62395.

Статьи в научных журналах:

20. Конусова О. Л. Биологическая и хозяйственная оценка семей медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) в некоторых районах Томской области / О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов, **Н. В. Островерхова**, С. А. Рассейкина, А. О. Нечипуренко, А. А. Воротов, Е. А. Климова, А. С. Прокопьев // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2010. – № 1 (9). – С. 29–41. – 0,78 / 0,10 а.л.

21. Конусова О. Л. Пчеловодство Томской области: прошлое и настоящее / О. Л. Конусова, **Н. В. Островерхова**, Ю. Л. Погорелов // Пчеловодство. – 2010. – № 4. – С. 60–61. – 0,22 / 0,07 а.л.

22. Конусова О. Л. Медоносная пчела и пчеловодство в Томской области: прошлое, настоящее и будущее / О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов, **Н. В. Островерхова**, А. О. Нечипуренко, А. А. Воротов, Е. А. Климова, А. С. Прокопьев // Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2009. – № 4 (8). – P. 15–28. – 0,82 / 0,12 а.л.

23. Кучер А. Н. Изучение генетического разнообразия медоносных пчел: некоторые проблемы и пути их решения / А. Н. Кучер, **Н. В. Островерхова**, О. Л. Конусова, Т. Н. Киреева, Д. В. Курбатский // Биомика. – 2016. – Т. 8, № 2. – С. 128–141. – 1 / 0,2 а.л.

24. **Островерхова Н. В.** К вопросу о мониторинге пчелиных семей на территории России / Н. В. Островерхова, А. Н. Кучер, О. Л. Конусова, Т. Н. Киреева, Ю. Л. Погорелов // Биомика. – 2016. – Т. 8, № 2. – С. 178–181. – 0,36 / 0,07 а.л.

25. **Островерхова Н. В.** Популяционно-генетическая структура медоносной пчелы на территории Сибири / Н. В. Островерхова, А. Н. Кучер, О. Л. Конусова // Принципы экологии. – 2016. – Т. 5, № 3 (19). – С. 118. – 0,11 / 0,04 а.л.

в переводной версии журнала, входящей в Web of Science Zoological Record:

Ostroverkhova N. V. Population genetic structure of honeybees in Siberia / N. V. Ostroverkhova, A. N. Kucher, O. L. Konusova // Principles of the ecology. – 2016. – Vol. 5, № 3 (19). – P. 120.

Статья в сборнике научных трудов:

26. Салик М. Ю. Исследование зараженности медоносных пчел нозематозом на пасеках Томской области / М. Ю. Салик, **Н. В. Островерхова**, О. Л. Конусова, Т. Н. Киреева, Е. П. Голубева // Труды / Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова; Центр паразитологии. – М., 2014. – Т. XLVIII : Систематика и экология паразитов. – С. 280–282. – 0,13 / 0,03 а.л.

Публикации в сборниках материалов конференций:

27. **Островерхова Н. В.** Характеристика митохондриального генома медоносной пчелы *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) в популяциях Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов, Е. А. Климова, А. А. Воротов // II Симпозиум стран СНГ по

перепончатокрылым насекомым и 8-й Коллоквиум Российской секции Международного союза исследователей общественных насекомых (IUSSI) : программа и тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 18–19 сентября 2010 г. – СПб., 2010. – С. 110. – 0,06 / 0,01 а.л.

28. Конусова О. Л. Условия медосбора и некоторые физико-химические показатели меда, получаемого на территории Томской области / О. Л. Конусова, **Н. В. Островерхова**, Ю. Л. Погорелов, А. С. Прокопьев, С. А. Рассейкина // Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования : сборник материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Нижний Тагил, 01–05 марта 2010 г. – Нижний Тагил, 2010. – Ч. 1. – С. 312–316. – 0,27 / 0,05 а.л.

29. **Островерхова Н. В.** Характеристика популяций медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) в некоторых районах Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, А. А. Воротов, Е. А. Климова // Энтомологические исследования в Северной Азии : материалы VIII Межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока с участием зарубежных ученых. – Новосибирск, 04–07 октября 2010 г. – Новосибирск, 2010. – С. 160–161. – 0,23 / 0,06 а.л.

30. Конусова О. Л. Оценка современного состояния популяций медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) в Томской области / О. Л. Конусова, **Н. В. Островерхова** // Видовые популяции и сообщества в антропогенно трансформированных ландшафтах: состояние и методы его диагностики : материалы XI Международной научно-практической экологической конференции. – Белгород, 20–25 сентября 2010 г. – Белгород, 2010. – С. 164–165. – 0,1 / 0,05 а.л.

31. Конусова О. Л. Биологическая и хозяйственная оценка семей медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) на севере Томской области / О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов, **Н. В. Островерхова** // Пчелопродукты – здоровье нации. Современные технологии производства и переработки меда : труды V Международного научно-практического форума по пчеловодству. Краснообск, 14–18 сентября 2010 г. – Новосибирск, 2010. – С. 14–16. – 0,2 / 0,07 а.л.

32. **Островерхова Н. В.** Современное состояние и перспективы развития пчеловодства в Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, А. А. Воротов // Актуальные проблемы науки : сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции. Тамбов, 27 сентября 2011 г. – Тамбов, 2011. – Ч. 6. – С. 123–125. – 0,14 / 0,05 а.л.

33. **Островерхова Н. В.** Медоносная пчела (*Apis mellifera* L.) в Томской области / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова // Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований в области зоологии беспозвоночных : сборник материалов III Всероссийской школы-семинара с международным участием, посвященной 120-летию со дня рождения Р. П. Бережкова (1891–1961). Томск, 24–27 октября 2011 г. – Томск, 2011. – С. 148–153. – 0,34 / 0,17 а.л.

34. Конусова О. Л. Томское пчеловодство: перспективы развития / О. Л. Конусова, А. В. Лодяев, **Н. В. Островерхова**, Ю. Л. Погорелов, С. А. Россейкина, В. А. Шалимов // Пути развития пчеловодства в России через успешный опыт регионов России, стран СНГ и Дальнего Зарубежья : сборник материалов международной научно-практической конференции. Ярославль, 06–11 октября 2011 г. – М., 2011. – С. 28–30. – 0,18 / 0,03 а.л.

35. **Островерхова Н. В.** Медоносная пчела как объект генетических исследований / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова // Генетика животных и растений – фундаментальные проблемы и современные экспериментальные подходы: материалы Международной молодежной конференции в рамках Фестиваля науки. Томск, 24–27 сентября 2012 г. – Томск, 2012. – С. 90–99. – 0,39 / 0,2 а.л.

36. Попова Е. С. К изучению распространения клеща *Varroa destructor* Anderson et Trueman на пасаках Томской области / Е. С. Попова, О. Л. Конусова, **Н. В. Островерхова**, Е. П. Голубева // Современные проблемы зоологии и паразитологии : материалы VI

Международной научной конференции «Чтения памяти проф. И. И. Барабаш-Никифорова». Воронеж, 25 марта 2014 г. – Воронеж, 2014. – С. 137–140. – 0,21 / 0,05 а.л.

37. **Острове́рхова Н. В.** Характеристика генетического разнообразия медоносных пчел (*Apis mellifera* L.) Томской популяции по комплексу ДНК-маркеров / Н. В. Острове́рхова, О. Л. Конусова, А. Н. Кучер, Т. Н. Киреева, Р. Т.-о. Багиров // Чтения памяти А. И. Куренцова. Владивосток, 04–05 марта 2015 г. – 2015. – Вып. XXVI. – С. 227–240. – 0,8 / 0,16 а.л.

38. Голубева Е. П. Зараженность микозами медоносных пчел на пасеках Томской области / Е. П. Голубева, **Н. В. Острове́рхова**, О. Л. Конусова // Биотехнологические аспекты развития современного пчеловодства : сборник материалов II Международной научно-практической конференции. Киров, 03–04 марта 2015 г. – Киров, 2015. – С. 40–44. – 0,21 / 0,07 а.л.

39. Киреева Т. Н. Оценка перспективности развития некоторых пасек Томской области с использованием ДНК-маркеров / Т. Н. Киреева, **Н. В. Острове́рхова**, О. Л. Конусова // Биотехнологические аспекты развития современного пчеловодства : материалы II Международной научно-практической конференции. Киров, 03–04 марта 2015 г. – Киров, 2015. – С. 60–63. – 0,2 / 0,07 а.л.

40. **Острове́рхова Н. В.** Характеристика пчелосемей среднерусской породы медоносной пчелы по комплексу микросателлитных локусов / Н. В. Острове́рхова, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов // Современное состояние и перспективы развития пчеловодства в Сибири : сборник материалов региональной научно-практической конференции. Красноярск, 26 марта 2015 г. – Красноярск, 2015. – С. 30–35. – 0,31 / 0,10 а.л.

41. **Острове́рхова Н. В.** Морфометрическая и молекулярно-генетическая характеристика пчелосемей Томской области, зараженных нозематозом / Н. В. Острове́рхова, О. Л. Конусова, Ю. Л. Погорелов // Современное состояние и перспективы развития пчеловодства в Сибири : материалы региональной научно-практической конференции. Красноярск, 26 марта 2015 г. – Красноярск, 2015. – С. 36–42. – 0,33 / 0,11 а.л.

42. Голубева Е. П. К вопросу о диагностике микроспоридий рода *Nosema* у медоносных пчел / Е. П. Голубева, **Н. В. Острове́рхова**, О. Л. Конусова // Новые знания о паразитах : сборник материалов V Межрегиональной конференции «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке». Новосибирск, 14–16 сентября 2015 г. – Новосибирск, 2015. – С. 31–32. – 0,18 / 0,06 а.л.

43. Голубева Е. П. Зараженность медоносных пчел паразитами и патогенами на пасеках Томской области / Е. П. Голубева, **Н. В. Острове́рхова**, О. Л. Конусова // Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных : сборник материалов IV Международной конференции. Томск, 26–28 октября 2015 г. – Томск, 2015. – С. 241–246. – 0,36 / 0,12 а.л.

44. Киреева Т. Н. Морфометрический и молекулярно-генетический анализ медоносных пчел (*Apis mellifera* L.) на пасеках Томской области / Т. Н. Киреева, **Н. В. Острове́рхова**, О. Л. Конусова, А. Н. Кучер, И. В. Шарахов // Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных : сборник материалов IV Международной конференции. Томск, 26–28 октября 2015 г. – Томск, 2015. – С. 254–260. – 0,46 / 0,09 а.л.

45. **Острове́рхова Н. В.** Медоносная пчела *Apis mellifera* L.: научные и прикладные аспекты / Н. В. Острове́рхова, О. Л. Конусова, А. Н. Кучер, И. В. Шарахов // Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных : сборник материалов IV Международной конференции. Томск, 26–28 октября 2015 г. – Томск, 2015. – С. 275–282. – 0,5 / 0,13 а.л.

46. Тен Д. А. Сравнительная морфометрическая характеристика медоносных пчел, отличающихся вариантами локуса COI-COI мтДНК / Д. А. Тен, Т. Н. Киреева, **Н. В. Островерхова**, О. Л. Конусова // Концептуальные и прикладные аспекты научных исследований и образования в области зоологии беспозвоночных : сборник материалов IV Международной конференции. Томск, 26–28 октября 2015 г. – Томск, 2015. – С. 289–293. – 0,29 / 0,07 а.л.

47. **Островерхова Н. В.** Оценка генетического разнообразия медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) с использованием микросателлитов / Н. В. Островерхова, О. Л. Конусова, Т. Н. Киреева // Евроазиатский симпозиум по перепончатокрылым насекомым (III симпозиум стран СНГ) : тезисы докладов. Нижний Новгород, 06–12 сентября 2015 г. – Н. Новгород, 2015. – С. 142–143. – 0,06 / 0,02 а.л.

48. **Островерхова Н. В.** Популяционно-генетическая характеристика медоносной пчелы (*Apis mellifera* L.) Сибирского региона / Н. В. Островерхова, А. Н. Кучер, О. Л. Конусова, Т. Н. Киреева // 50 лет ВОГиС: успехи и перспективы : сборник тезисов всероссийской конференции с международным участием. Москва, 08–10 ноября 2016 г. – Москва, 2016. – С. 249. – 0,06 / 0,02 а.л.

49. **Островерхова Н. В.** Популяционно-генетическая характеристика медоносной пчелы Красноярского края / Н. В. Островерхова, А. Н. Кучер, О. Л. Конусова, Е. С. Гущина // Генетика популяций: прогресс и перспективы : материалы Международной научной конференции, посвященной 80-летию со дня рождения академика Ю. П. Алтухова и 45-летию лаборатории популяционной генетики ИОГен РАН. Звенигород, 17–21 апреля 2017 г. – М., 2017. – С. 202–203. – 0,1 / 0,03 а.л.

50. **Островерхова Н. В.** Информативность морфологического и молекулярно-генетического подходов в систематике насекомых (на примере медоносной пчелы *Apis mellifera* L.) / Н. В. Островерхова, А. Н. Кучер, О. Л. Конусова // XV съезд Русского энтомологического общества : материалы съезда. Новосибирск, 31 июля – 07 августа 2017 г. – Новосибирск, 2017. – С. 375–376. – 0,1 / 0,03 а.л.

51. Голубева Е. П. Распространение нозематоза в пчелиных семьях на пасеках Томской области / Е. П. Голубева, **Н. В. Островерхова**, О. Л. Конусова, Е. А. Бадмажапова // XV съезд Русского энтомологического общества : материалы съезда. Новосибирск, 31 июля – 07 августа 2017 г. – Новосибирск, 2017. – С. 125–126. – 0,09 / 0,02 а.л.

52. **Ostroverkhova N. V.** Genetic Diversity of Honeybees in Siberia (Russia) / N. V. Ostroverkhova, O. L. Konusova, A. N. Kucher, Y. L. Pogorelov // 45th Apimondia International Apicultural Congress : abstract book. Istanbul, Turkey, September 29 – October 04, 2017. – Istanbul, 2017. – Abstract number 0332. – P. 190. – 0,06 / 0,02 а.л.

Учебное пособие:

53. Конусова О. Л. Основы пчеловодства (избранные главы) : учебное пособие / О. Л. Конусова, **Н. В. Островерхова**. – Томск: Томский государственный университет, 2015. – 108 с. – 5,8 / 2,9 а.л.

Ноу-хау:

54. Ноу-хау «Способ оценки породности пчелосемей по экстерьеру рабочих пчел и трутней» (Томский государственный университет, 2012 г.).

55. Ноу-хау «Способ оценки породной принадлежности пчелиных семей по комплексу микросателлитных локусов как элемент ДНК-диагностикума» (ООО «АпиМастер», 2016 г.).

Международная база данных Генбанка (Genbank):

В международную базу данных Генбанка (Genbank) депонированы нуклеотидные последовательности четырех аллелей микросателлитного локуса *mjrp3* под номерами MN673344–MN673347 (2018).

Издание подготовлено в авторской редакции.

Подписано в печать 25.09.2018 г. Уч.-изд. л. 2,2.
Отпечатано на оборудовании Издательского Дома Томского государственного университета,
634050, г. Томск, пр. Ленина, 36, тел. (3822) 531-528, 529-849. E-mail: rio.tsu@mail.ru
Заказ 3392. Тираж 100 экз.