

**ВИДА ХРИСТОВА ГЕОРГИЕВА**

**Генетично характеризирание на *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*)  
– обект на Националната програма за развъждане на медоносните  
пчели в България**



**АВТОРЕФЕРАТ**  
**на**  
**ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

за получаване на образователна и научна степен “доктор”  
в Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика,  
Професионално направление: 4.3. Биологични науки, Докторска програма: Генетика

Научни ръководители:  
**Проф. д-р Евгения Нешова Иванова**  
**Проф. д-р Пламен Павлов Петров**

Пловдив 2016

Дисертационният труд съдържа 136 страници, 17 таблици, 42 фигури, 7 приложения и 154 литературни източници.

Експерименталната работа по дисертационния труд е проведена в Научната лаборатория по Генетика на катедра «Биология на развитието» при Биологически факултет на Пловдивски университет «Паисий Хилендарски».

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на катедра «Биология на развитието» при Биологически факултет на ПУ «Паисий Хилендарски», проведено на 04. 07. 2016 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 10. 10. 2016 г. от 10.30 ч. в 15 аудитория на Биологическия факултет – гр. Пловдив, ул. «Тодор Самодумов» №2 на открито заседание на петчленно Научно жури в състав:

1. Проф. дн Дияна Лилова Светлева
2. Проф. дн Лилян Крумов Сотиров
3. Проф. д-р Евгения Нешова Иванова
4. Доц. д-р Петя Павлова Иванова
5. Доц. д-р Теодора Атанасова Стайкова

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в катедра «Биология на развитието», Биологически факултет при ПУ «Паисий Хилендарски».

**Автор:** Вида Христова Георгиева

**Заглавие:** Генетично характеризирание на *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*) – обект на Националната програма за развъждане на медоносните пчели в България

Университетско издателство «Паисий Хилендарски», 2016  
ISBN

## УВОД

Нашият народ практикува от дълбока древност пчеларство, което и до момента не е загубило огромното си значение. Модернизиранието му започва в края на XIX в. и днес, в подобрен вариант, то вече играе важна роля в цялостния икономически напредък на страната ни.

Развитието на пчеларството е свързано с получаването на ценни стопански продукти като пчелен мед, восък, пчелен клей, пчелно млечице, пчелна отрова и цветен пращец. Освен реални производители на посочените продукти, медоносните пчели са основните опрашители в живата природа, като особено важно е значението им при опрашването на ентомофилните растения.

В годините до 1978 селекцията на медоносните пчели в България е водена стихийно, като през 1978 г. е утвърдена Програма за развъдно-подобрителна работа с тях. Племенната работа е провеждана в две насоки – чистопородно развъждане и кръстосване. В периода 1980 – 1987 г. са изпитвани и внедрявани в селекционната практика в различни райони на страната дву-, три- и четирипородни кръстоски на местната пчела с италианска, сива планинска кавказка и карника.

През 1987 – 1990 г. е проведено морфо-етологично изследване на територията на утвърдените резервати за местна пчела и в различни зоогеографски райони на България, което показва, че използването на майки-кръстоски води до унищожаване чистотата на много локални популации на българската медоносна пчела (Petrov, 1990).

След политическите промени в страната ни през 1990 г., селекционният процес е прекъснат, като до 1999 остава да функционира само едно стопанство за производство на пчелни майки. Всичко това налага разработването на нова научно-обоснована система и организация на развъждане в пчеларството. От 1995 г. Аграрният Университет в Пловдив започва да работи по съставянето ѝ. Така през 1999 г. е разработена и утвърдена от Министерството на Земеделието и Горите (МЗГ) нова, актуализирана и детайлна Програма за селекционна работа с пчелите и за организация на майкопроизводството в България (Петров и др., 1999).

Понастоящем дейностите по селекция и репродукция в пчеларството на територията на България се извършват от Националната Развъдна Асоциация по Пчеларство (НРАП), която реализира Националната програма по селекция на пчелите на базата на морфо-етологичен анализ за расовата им принадлежност и продуктивните им качества (Петров, 1990; 1993; 1995; 1996; 1997; Петров и Петкова, 1996; 1997;).

В България се провеждат и биохимико-генетични изследвания на полиморфизма по някои протеинови и изоензимни системи, както и проучвания, базирани на митохондриален и микросателитен ДНК анализи (Ivanova et al., 2007; 2010; 2011; 2012; Ivanova, 2010; Nikolova, 2011; Uzunov et al., 2014a; Francis et al., 2014). Обединяването на различните подходи е с цел изясняване на расовия статут и генетичната чистота на местните медоносни пчели.

Към настоящия момент, целенасочени генетични проучвания, базирани върху популационно-генетичен ензимен анализ на местни медоносни пчели от типа *rodopica*, обект на сега действащата Национална селекционна програма, не са провеждани, което определя актуалността и значимостта на планираното проучване.

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Литературният обзор е структуриран тематично в четири основни части, както следва: кратък исторически преглед на пчеларството в България (от създаването на българската държава до наши дни); класификация, разпространение и значение на медоносните пчели (еволюционни клонове, таксономично място на *Apis mellifera*,

разпространение на подвидовете); състояние на изследванията върху изменчивостта на медоносните пчели в България; методични подходи, използвани за проучване на медоносните пчели – морфометрични и етологични показатели, популационно-генетични изследвания.

Прегледът на литературните данни за периода от 30-те години на XX век до 2015 г. показва, че макар наличието на разнообразни проучвания, свързани с изучаване биологичното разнообразие на българските медоносни пчели, към настоящия момент, целенасочени генетични проучвания, базирани върху популационно-генетичен ензимен анализ на местните медоносни пчели от типа *rodopica*, обект на сега действащата Национална селекционна програма, не са провеждани, което определя актуалността и значимостта на планираното проучване.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

**Целта на настоящия дисертационен труд е на базата на популационно-генетичен анализ, базиран на ензимни маркери да се характеризират особеностите на генетичния полиморфизъм в подложени на селекционен контрол български популации *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), които са обект на Националната програма за развъждане на медоносните пчели в България.**

Осъществяването на тази цел е свързано с решаването на следните конкретни задачи:

1. Изследване на полиморфизма по малатдехидрогенази (MDH), малат ензими (ME), фосфоглюкомутази (PGM), хексокинази (HK), неспецифични естерази (EST) и алкални фосфатази (ALP), посредством нативна електрофореза в полиакриламиден гел;
2. Изучаване особеностите на генетично детерминирания полиморфизъм в популации *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), подложени на селекционен контрол и характеризиране степента на генетична диференциация и консолидация на базата на избраните ензимни системи;
3. Сравнителен анализ на популации, представлящи селекционни бази – производителки на пчелни майки и бази – производителки на пчелни рояци;
4. Сравнителен анализ на генетичния полиморфизъм в популации *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), подложени на селекционен контрол и селекционно контролирани популации на *Apis mellifera carnica* по референтни данни;
5. Установяване на генетични ензимни показатели за характеризиране селекционния потенциал на *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*) като обект на Националната програма за развъждане на медоносните пчели в България.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В настоящото проучване за нуждите на популационно-генетичния изоензимен анализ бяха използвани популации пчели, намиращи се под селекционния контрол на Националната Развъдна Асоциация по Пчеларство (НРАП). В изследването бяха включени 21 популации от различни бази на НРАП, с различни местообитания на територията на страната (Фигура 1).

На електрофоретичен анализ за периода на проучването (2013 – 2015 г.), бяха подложени общо 851 индивидуални тотални екстракти от пчели-работнички, събрани на случаен принцип от по 10 пчелни семейства за всяка от включените в изследването развъдни бази.

Допълнително за сравнителния анализ бяха използвани и линии *Apis mellifera carnica* с произход Косово.

Индивидите бяха доставяни живи в лабораторията и съхранявани при температура  $-20^{\circ}\text{C}$ , до използването им в електрофоретичния експеримент.

Подготовката на пробите започваше с хомогенизиране на материала във видалови епруветки с екстрахиращ разтвор (трис-фосфатен буфер с рН 6.7, разреден с дестилирана вода в отношение 1:7). Времето за екстрахиране беше 18 часа при  $4^{\circ}\text{C}$ . Центрофугирането се провеждаше при 5000 об./мин. за 15 минути при  $4^{\circ}\text{C}$ . От надутаечната течност се отделяха по  $10\mu\text{l}$  от всяка проба за анализ.



**Фигура 1.** Местоположения на изследваните популации

За популационно-генетичното характеризирание на популациите бяха подбрани следните изоензимни групи:

1. MDH – Malate dehydrogenase, EC 1.1.1.37;
2. ME – Malic enzyme, EC 1.1.1.40;
3. PGM – Phosphoglucomutase, EC 5.4.2.2;
4. HK – Hexokinase, EC 2.7.1.1;
5. EST – Esterase, EC 3.1.1;
6. ALP – Alkaline phosphatase, EC 3.1.3.1.

За целите на проучването бе използвана електрофореза в полиакриламиден гел (ПААГ).

Съобразно със заложените цели, в хода на експерименталната работа използвахме нативна електрофореза по метода на Daevis (1964) за изследване на полиморфизма по шест алоензимни групи.

Използвахме концентриращ (едропорест), 3.3%-ен с рН 6.7 и разделящ (ситнопорест), 7.7%-ен с рН 8.9 гел, като капацитетът на гелната плака бе 23 проби. Полимеризацията на гела протичаше в трис-хлоридна с рН 8.9 и трис-фосфатна с рН 6.7 буферни системи. Електрофоретичното разделяне провеждахме в трис-глицинов буфер с рН 8.3.

Електрофорезата протичаше при температура 4°C за около 3 часа. До преминаването на фронта през концентриращия гел силата на тока беше 100 mA при напрежение 200 V, а след това – 150 mA при напрежение 300 V.

След приключване на електрофорезата, гелните плаки поставяхме в инкубационен разтвор, който представлява буфер с определено рН в зависимост от проявяваната ензимна система. Към буфера добавяхме специфични субстрати, коензими и активатори, съгласно определен протокол. Всички гелове промивахме и фотографирахме, след което съхранявахме в 7%-ен разтвор на оцетна киселина.

Статистическият анализ беше проведен чрез използване на софтуерния пакет GenAIEx v.6.501 (Peakall and Smouse, 2006).

За анализиране на получените резултати от алоензимното проучване бяха изчислени алелни честоти и среден брой алели за локус и характеризирани ниво на полиморфизъм и хетерозиготност, генотипно разнообразие, фиксационния индекс (характеризиращ степента на вътрепопулационна и междупопулационна изменчивост), равновесието по закона на Харди-Вайнберг и генетична дистанция ( $D_s$ ), по Nei (1972).

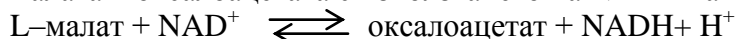
Асигнационният тест бе приложен за изчисляване на логаритмичната вероятност за принадлежност и степента на принадлежност на всеки индивид (съобразно установения му генотип) към популацията. Чрез PHYLIP софтуерния продукт (Felsenstein, 1993), на базата на изчислените генетични дистанции по Nei (1972) бяха построени UPGMA – Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Sneath and Sokal, 1973) и Neighbour-Joining – NJ (Saitou and Nei, 1987) филогенетични схеми.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### I. Полиморфизъм по анализираните ензимни локуси

#### **NAD – зависима малатдехидрогеназа (MDH, L-Малат: NAD-оксиредуктаза, EC 1.1.1.37)**

Малатдехидрогеназата е ензим, който катализира взаимното превръщане на L-малата и оксалоацетата с използването на NAD в качеството на кофактор.



Тази реакция играе ключова роля в малат/аспартат совалковата система през митохондриалната мембрана и цикъла на трикарбоновите киселини в митохондриалния матрикс.

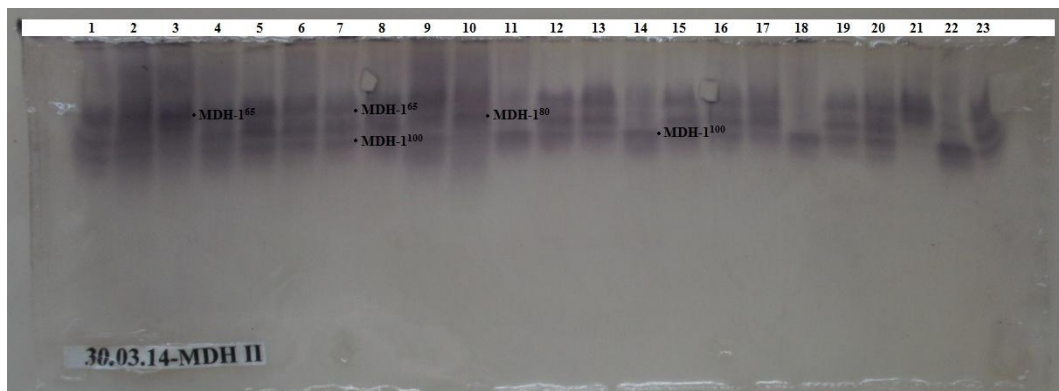
Ензимът се среща в две основни форми, кодирани от различни гени: едната е в разтворимата фракция на цитоплазмата (s-MDH), а другата – в митохондриите (m-MDH). Данни от различни проучвания сочат, че двете форми се различават по структурни и функционални свойства (Корочкин и др., 1977).

В повечето организми (всички еукариоти и при повечето бактериални видове), те са хомодимерни молекули, в резултат на което при хетерозиготните индивиди, при електрофорезата се наблюдава спектър от три компонента. Това е в съответствие с биохимичните данни за димерната структура на ензима (Фридрих, 1986).

Малатдехидрогеназният ензим със своите изоформи, съдържащи се в цитозола, участва в основния метаболизъм при пчелите. Литературните проучвания сочат, че той се приема за един от най-информативните изоензимни маркери в популационно-генетичните изследвания на медоносните пчели и се използва широко при проучване на полиморфизма сред пчелните популации (Del Lama 1982). Анализът на биохимичния му полиморфизъм се прилага за характеризиране на три от основните еволюционни клонове на *Apis mellifera* (Ruttner et al. 1978).

Алелните продукти на MDH-1 локуса се използват като надеждни биохимико-генетични маркери за характеризиране на пчелните популации (Contel et al. 1977). Причината за това е добре проучената им електрофоретична изява в хода на всички стадии от онтогенезата на медоносните пчели, както и възможността отчетливо да се характеризира разпределянето на малатдехидрогеназните алелни варианти съгласно Менделовите закони (Contel et al. 1977; Nunamarker and Wilson 1980; Del Lama et al. 1985; Иванова 1996). При анализа на алоензимния полиморфизъм по този локус е установено наличие на 2, 3, 4 или 5 алела в проучвани пчелни популации на територията на Европа и Близкия Изток (Gardside 1980; Nunamaker et al. 1984; Badino et al. 1983; 1985; 1988; Sheppard 1988; Sheppard and Berlocher 1984; 1985; Sheppard and McPheron 1986; Lobo et al. 1989; Meixner et al. 1994; Kandemir and Kence 1995; Dedej et al. 1996; Kandemir et al. 2000; Bouga et al. 2005b; Ivanova 2010).

В хода на настоящото проучване и при характеризиране особеностите на полиморфизма в изследваните общо 21 популации, намиращи се под селекционния контрол на Националната Развъдна Асоциация по Пчеларство, по MDH-1 локуса беше констатирано присъствието на 3 алелни варианта. Проучването на електрофоретичните спектри показва наличието на алоензимните продукти на алелите MDH<sup>65</sup>, MDH<sup>80</sup> и MDH<sup>100</sup>, които бяха комбинирани в разнообразни хомо- и хетерозиготни комбинации, както следва: MDH-1<sup>65</sup>/MDH-1<sup>65</sup>; MDH-1<sup>100</sup>/MDH-1<sup>100</sup>; MDH-1<sup>65</sup>/MDH-1<sup>100</sup>; MDH-1<sup>65</sup>/MDH-1<sup>80</sup>; MDH-1<sup>80</sup>/MDH-1<sup>80</sup>; MDH-1<sup>80</sup>/MDH-1<sup>100</sup> (Фигура 2).



**Фигура 2.** Електрофоретичен спектър на алоензимните форми на MDH-1 при популации медоносни пчели в България: 1-11 популация Мало Конаре; 12-23 популация Васил Левски – генотипни комбинации: индивиди №1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 20 и 23 – MDH-1<sup>65</sup>/MDH-1<sup>100</sup>; №3 и 21 – MDH-1<sup>65</sup>/MDH-1<sup>65</sup>; №10 – MDH-1<sup>80</sup>/MDH-1<sup>80</sup>; №11, 14, 18 и 22 – MDH-1<sup>100</sup>/MDH-1<sup>100</sup>

Установените три малатдехидрогеназни алела бяха наблюдавани едновременно в генофонда на популациите Каварна, Генерал Киселово, Селище, Ябланово, Еленово, Мало Конаре, Татари и Руец като и шестте възможни генотипни комбинации бяха констатирани при характеризиране генотипната структура на популацията от Селище.

Беше констатирано, че в генофонда на по-голямата част от изследваните популации (общо 16) MDH-1<sup>100</sup> е по-често или най-често срещаният алел. По отношение на този алел бе изчислена най-висока честота на срещане в генофонда на популация Кърджали (0.714) и най-ниска – в генофонда на популация Монтана (0.412).

Алелът MDH-1<sup>65</sup> бе по-често срещан в 4 от изследваните популации. Най-висока честота на срещане на MDH-1<sup>65</sup> бе изчислена за генофонда на популация Монтана (0.588) и най-ниска – за генофонда на популация Генерал Киселово (0.265).

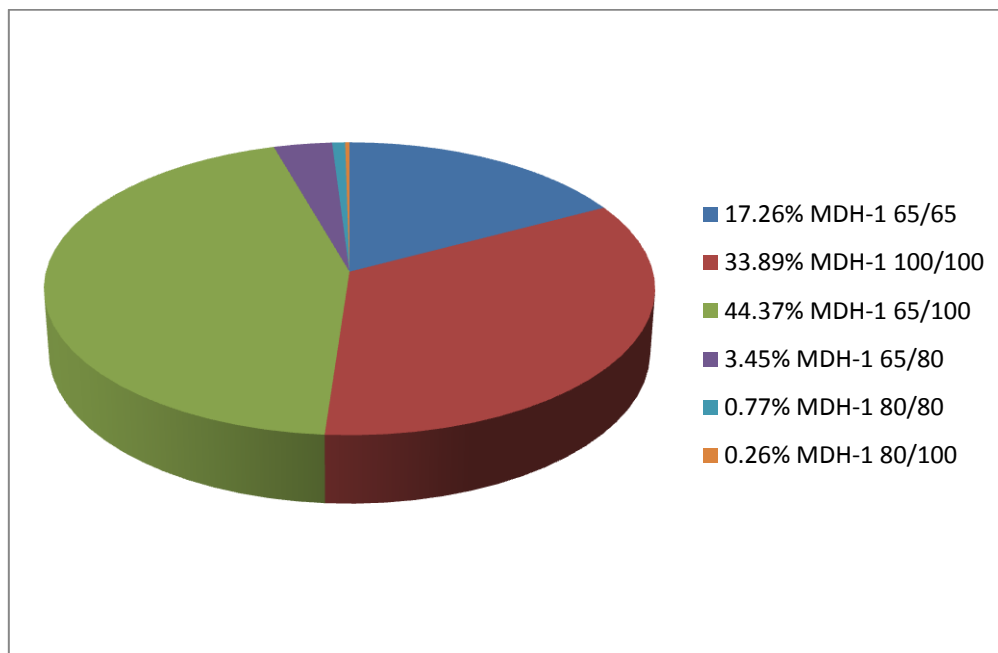
Двата алела – MDH-1<sup>65</sup> и MDH-1<sup>100</sup> – бяха с еднаква честота на срещане (0.5) в генофонда на пчелната популация от Винаца.

В генофонда на осем от анализирани популации беше установено присъствието и на трети алел – MDH-1<sup>80</sup> (Каварна, Генерал Киселово, Селище, Ябланово, Еленово, Мало Конаре, Татари и Руец). Същият бе с най-висока честота на срещане в популация Каварна (0.143) и с най-ниска – в популация Еленово (0.014).

Подробни данни относно наличните алелни варианти в генофонда на проучваните популации са представени на Фигура 14.

По отношение генофонда и генотипната структура на популациите Петко Каравелово, Винаца, Бъзовец, Монтана, Вехтово, Торос, Васил Левски и Пловдив бе установен двуалелен полиморфизъм с присъствие на алелите MDH-1<sup>65</sup> и MDH-1<sup>100</sup> в следните генотипни комбинации: MDH-1<sup>65</sup>/MDH-1<sup>65</sup>, MDH-1<sup>100</sup>/MDH-1<sup>100</sup>, MDH-1<sup>65</sup>/MDH-1<sup>100</sup>.

Хомозиготите от типа MDH-1<sup>100</sup>/MDH-1<sup>100</sup> преобладаваха в генотипната структура на популациите Генерал Киселово, Кърджали, Сливен, Димовци и Селище, а хетерозиготите от типа MDH-1<sup>65</sup>/MDH-1<sup>100</sup> бяха с по-голяма честота в популациите Печковец, Ралево, Каварна, Ябланово, Петко Каравелово, Бъзовец, Монтана, Вехтово, Мало Конаре, Васил Левски, Татари и Руец. Процентното разпределение на генотиповете в проучваните популации е представено на Фигура 3.



**Фигура 3.** Процентно разпределение на малатдехидрогеназните генотипове в проучваните популации

Наблюдаваната хетерозиготност ( $H_o$ ) по MDH-1 локуса в изследваните популации варираше от 0.257 при популация Димовци до 0.674 при популация Татари. Констатирана бе средна стойност на наблюдавана хетерозиготност за изследваните популации от порядъка на 0.476 (Таблица 1).

Очакваната хетерозиготност ( $H_e$ ) по анализирания MDH-1 locus беше в диапазона от 0.408 при популация Кърджали до 0.606 при популация Каварна. Изчислената средна стойност на очакваната хетерозиготност за включените в изследването популации бе 0.495 (Таблица 1).

**NADP-зависима малатдехидрогеназа (Malic enzyme EC 1.1.1.40.-ME) L-малат: NADP – оксидоредуктаза**

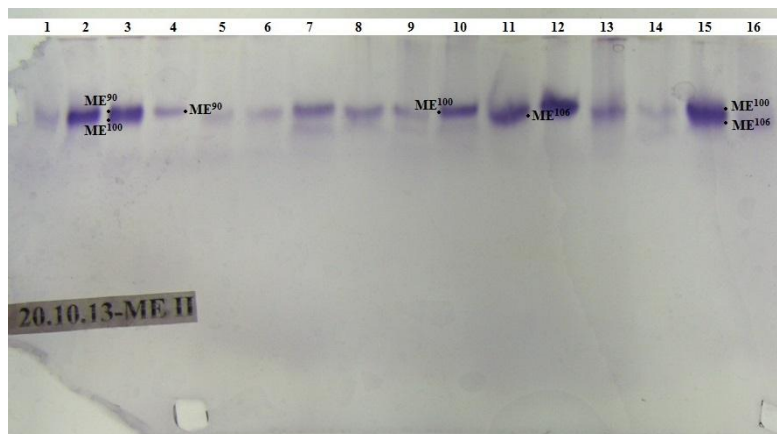


Малат ензимът катализира окислителното декарбоксилиране на малата до пируват и CO<sub>2</sub> и редукцията на кофактора NAD(P)<sup>+</sup> до NAD(P)H в следната реакция:  

$$L\text{-malate} + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{pyruvate} + \text{CO}_2 + \text{NADPH}$$

NADP-зависимата малатдеhidрогеназа се среща в две основни форми в зависимост от локализацията си (Henderson, 1966, 1968). Едната е характерна за митохондриите – m-форма, а другата се намира в разтворимите фракции на цитоплазмата – s-форма. Алозимните варианти на малат ензима са подходящи за характеризирани на популационно-генетичните особености на пчелните популации и се използват при детайлни проучвания на полиморфизма им. Различни проучвания представят данни, както за наличие на дву- и триалелен полиморфизъм, така и за инвариантност по този локус (Sheppard, Berlocher 1984; 1985; Sheppard, McPheron 1986; Kandemir et al. 2000; 2005; Dedej et al. 1996; Bouga et al. 2005b; Ivanova et al. 2010; 2011).

В настоящото проучване бяха установени продукти от експресията на три алела на ME локуса, именувани съобразно подвижността им спрямо най-често срещаната фракция като ME<sup>90</sup>, ME<sup>100</sup> и ME<sup>106</sup>. Трите алела бяха открити в различни комбинации (Фигура 4) в генотипните структури на проучваните популации (ME<sup>90</sup>/ME<sup>90</sup>, ME<sup>90</sup>/ME<sup>100</sup>, ME<sup>100</sup>/ME<sup>100</sup>, ME<sup>100</sup>/ME<sup>106</sup> и ME<sup>106</sup>/ME<sup>106</sup>). Данни относно присъстващите в генофонда алели и честотите им на срещане са представени на Фигура 14.



**Фигура 4.** Електрофоретичен спектър на алозимните форми на малат ензима (ME) при популации медоносни пчели в България: 1-16 популация Ралево – Генотипни комбинации: индивиди № 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 и 16 – ME<sup>100</sup>/ME<sup>100</sup>; № 3 – ME<sup>90</sup>/ME<sup>100</sup>; № 4 – ME<sup>90</sup>/ME<sup>90</sup>; № 11 – ME<sup>106</sup>/ME<sup>106</sup>; № 15 – ME<sup>100</sup>/ME<sup>106</sup>

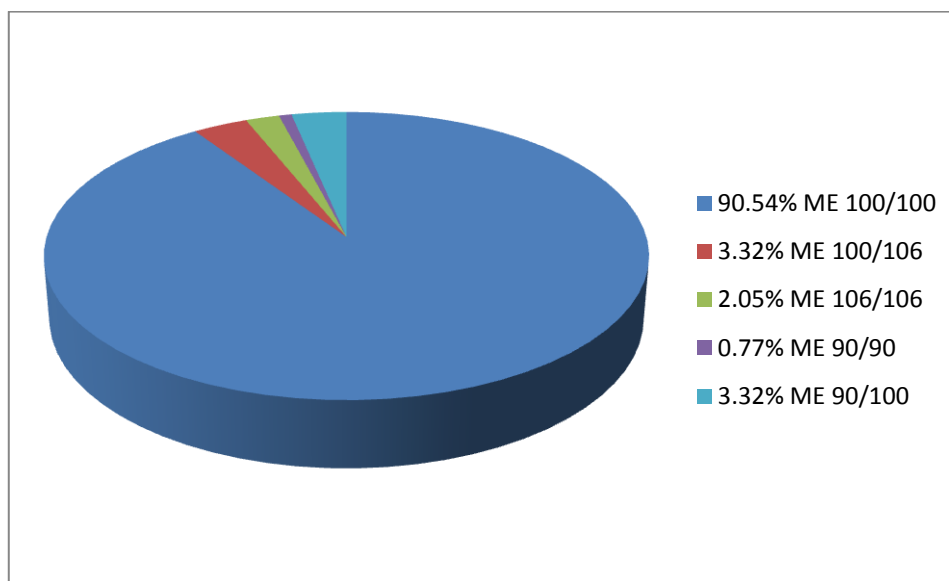
Всичките три установени алела присъстваха в генофонда на популациите Печковец, Ралево, Каварна, Генерал Киселово, Кърджали, Димовци, Еленово, Винаца и Татари. За генотипната структура на популациите Еленово и Ралево бяха отчетени и петте възможни генотипни комбинации.

Двуалелен полиморфизъм по малатензимния локус с присъствие на алелите ME<sup>90</sup> и ME<sup>100</sup> бе установен за популациите Торос, Сливен, Бъзвец, Мало Конаре и Васил Левски. Наблюдаваните генотипове се характеризираха с хомозиготност по ME<sup>100</sup> алела (ME<sup>100</sup>/ME<sup>100</sup>), хетерозиготност от типа ME<sup>90</sup>/ME<sup>100</sup> и по-рядко – с хомозиготната комбинация ME<sup>90</sup>/ME<sup>90</sup> (популация Торос).

Алелните варианти ME<sup>100</sup> и ME<sup>106</sup> в хомо- и хетерозиготни комбинации ME<sup>100</sup>/ME<sup>100</sup>, ME<sup>100</sup>/ME<sup>106</sup> и ME<sup>106</sup>/ME<sup>106</sup> бяха установени в генотипната структура на пчелните популации Петко Каравелово, Монтана, Вехтово, Селище, Ябланово, Руец и Пловдив.

В генотипната структура на всички изследвани популации с най-висока честота на срещане беше хомозиготната комбинация от типа ME<sup>100</sup>/ME<sup>100</sup>.

Процентното разпределение на малатензимните генотипове в проучваните популации е представено на Фигура 5.



**Фигура 5.** Процентно разпределение на малатензимните генотипове в проучваните популации

Получените в настоящото изследване резултати показваха, че ME<sup>100</sup> алелът бе най-често срещаният се алел в генофонда на всички проучвани популации. Същият беше с най-висока честота на срещане (0.986) в генофонда на популацията Васил Левски и с най-ниска честота (0.843) в генофонда на популацията Еленово. По отношение на ME<sup>90</sup> алела, изчислената честота варираше от 0.011 в генофонда на Татари до 0.114 – в Еленово. Алелът ME<sup>106</sup> се срещаше с най-висока честота в популацията от Пловдив (0.141) и с най-ниска – в Печковец и Руец (0.022).

Наблюдаваната хетерозиготност (H<sub>o</sub>) варираше от 0.029 в популациите Каварна, Димовци, Селище, Мало Конаре и Васил Левски до 0.265 в популацията от Винаца. При популация Руец стойността ѝ бе 0.0. Средната изчислена стойност за наблюдавана хетерозиготност по отношение на всички изследвани пчелни популации беше 0.070 (Таблица 1).

Очакваната хетерозиготност (H<sub>e</sub>) по анализирания ME locus беше в границите от 0.028 за Васил Левски и 0.029 за Мало Конаре до 0.275 за популация Еленово. Средната ѝ стойност бе 0.113(Таблица 1).

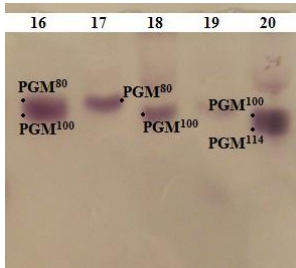
### **Фосфоглюкомутаза (Phosphoglucumutase, EC 5.4.2.2. PGM)**

Фосфоглюкомутазата е ключов ензим в гликолизата. Той е повсеместно разпространен металоензим, широко изследван както при гръбначни така и при безгръбначни видове. PGM катализира взаимното превръщане на глюкозо -1- фосфат и глюкозо -6- фосфат в присъствие на глюкозо -1, 6-дифосфат и Mg<sup>2+</sup> и играе основна роля в синтеза и разграждането на гликогена (Ray and Roscelli, 1964).

Литературните данни сочат, че при много от изследваните пчелни популации PGM locusът е мономорфен (Mestriner and Contel 1972; Brueckner 1974; Contel et al. 1977; Nunamaker and Wilson 1980; Badino et al. 1983; Sheppard and Berlocher 1985). Наличие на полиморфизъм с дву- и триалелна система на унаследяване по

фосфоглюкомутазния локус е констатирано от Del Lama et al. (1985), Meixner et al. (1994), Ivanova et al. (2010) за популации в Бразилия и Европа.

Данните от настоящото проучване показваха, че в електрофоретичните спектри на този ензим по отношение на изследваните популации присъстват алоензимни продукти от експресията на три алела на PGM-локуса ( $PGM^{80}$ ,  $PGM^{100}$  и  $PGM^{114}$ ), които бяха комбинирани в хомо- и хетерозиготни генотипни комбинации, както следва:  $PGM^{100}/PGM^{100}$ ;  $PGM^{80}/PGM^{100}$ ;  $PGM^{80}/PGM^{80}$ ;  $PGM^{100}/PGM^{114}$  и  $PGM^{114}/PGM^{114}$



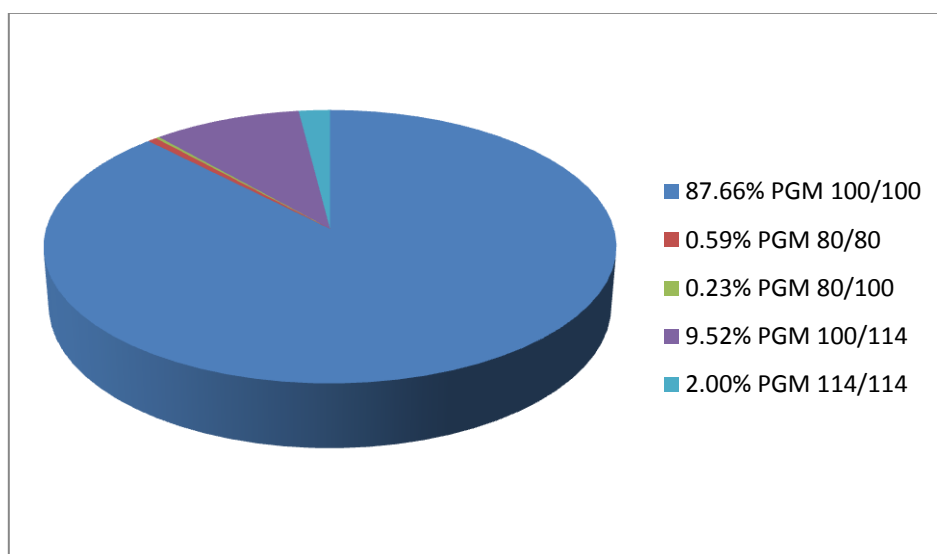
(Фигура 6).

**Фигура 6.** Електрофоретичен спектър на алоензимните форми на PGM при популации медоносни пчели в България: 16-20 популация Печковец – генотипни комбинации: индивиди № 16 –  $PGM^{80}/PGM^{100}$ ; № 17 –  $PGM^{80}/PGM^{80}$ ; № 18 и 19 –  $PGM^{100}/PGM^{100}$ ; № 20 –  $PGM^{100}/PGM^{114}$ ;

Наличието и на трите алела наблюдавахме в генофонда на популациите Печковец, Ябланово и Руец. За генофонда на останалите популации бе характерно присъствието на алелите  $PGM^{100}$  и  $PGM^{114}$ , комбинирани в хомо- и хетерозиготни комбинации.

Най-висока честота на срещане във всички изследвани популации бе характерна за  $PGM^{100}$  алела. Стойностите ѝ варираха от 0.848 в генофонда на популация Руец до 0.985 – в Селище и 0.986 – в Кърджали. Данните от проучването сочат, че честотата на срещане на  $PGM^{114}$  алела варираше от 0.014 в генофонда на популация Кърджали и 0.015 в генофонда на популация Селище до 0.129 – в популацията Вехтово. Третият установен алел  $PGM^{80}$  се срещаше в генофонда на три от изследваните популации, подложени на селекционен контрол, с честота 0.029, 0.043 и 0.065 за Ябланово, Руец и Печковец, съответно. Подробни данни относно наличните алелни варианти в генофонда на проучваните популации са представени на Фигура 14.

Обобщените данни за генотипното разнообразие в изследваните популации показваха, че хомозиготната комбинация  $PGM^{100}/PGM^{100}$  е с най-голяма честота на срещане (87.66%). Остаталите хомо- и хетерозиготни генотипни варианти  $PGM^{100}/PGM^{114}$ ,  $PGM^{114}/PGM^{114}$ ,  $PGM^{80}/PGM^{80}$  и  $PGM^{80}/PGM^{100}$  се срещаша с честоти 9.52%, 2%, 0.59% и 0.23%, съответно.



**Фигура 7.** Процентно разпределение на фосфоглюкомутазните генотипове в проучваните популации

Процентното разпределение на фосфоглюкомутазните генотипове в проучваните популации е представено на Фигура 7.

Наблюдаваната хетерозиготност (Ho) варираше от 0.029 при популациите Каварна, Кърджали, Селище и Ябланово до 0.235 в Монтана като при популацията Генерал Киселово стойността ѝ бе 0.0. Средната отчетена стойност за Ho за всички изследвани популации беше 0.097 (Таблица 1).

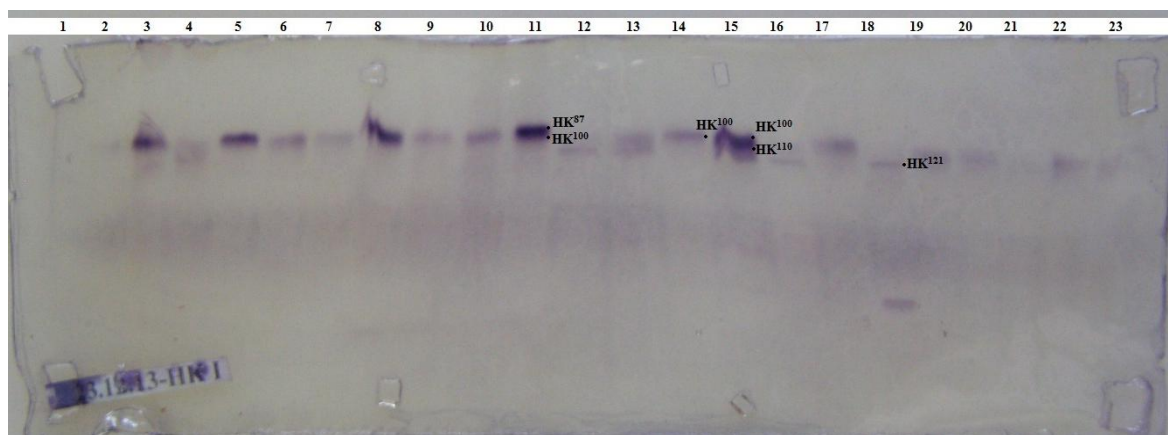
Очакваната хетерозиготност (He) варираше в границите от 0.028 и 0.029 в популациите Кърджали и Селище до 0.267 в популация Руец със средна стойност 0.133 (Таблица 1).

### Хексокиназа (Hexokinase, EC 2.7.1.1. НК)

Хексокиназата е ензим, катализиращ фосфорилирането на глюкоза в организма.

Алозимните му варианти при медоносните пчели са проучени по-късно, като първоначално е описана липса на полиморфизъм по този локус в различни европейски популации (Sheppard and McPheron, 1986; Vadino et al., 1988; Del Lama et al., 1990). Присъствие на два до пет хексокиназни алела в проучвани популации на *Apis mellifera* от Бразилия, Турция и Европа е съобщено и дискутирано от Del Lama et al. (1988, 1990), Kandemir&Kence (1995), Kandemir et al. (2000), Ivanova et al. (2010).

В хода на настоящото проучване, в изследваните популации бяха констатирани алоензимни продукти от експресията на четири хексокиназни алела – НК<sup>87</sup>, НК<sup>100</sup>, НК<sup>110</sup> и НК<sup>121</sup>. В анализирания електрофоретични спектри, те се наблюдаваха в различни хомо- и хетерозиготни генотипни комбинации – НК<sup>100</sup>/НК<sup>100</sup>, НК<sup>100</sup>/НК<sup>110</sup>, НК<sup>110</sup>/НК<sup>110</sup>, НК<sup>87</sup>/НК<sup>87</sup>, НК<sup>87</sup>/НК<sup>100</sup>, НК<sup>100</sup>/НК<sup>121</sup> и НК<sup>121</sup>/НК<sup>121</sup> (Фигура 8).



**Фигура 8.** Електрофоретичен спектър на алоензимните форми на НК при популации медоносни пчели в България: 1-11 – популация Торос; 12-23 – популация Каварна. Генотипни комбинации: индивиди № 1-3, 5- 10, 14, 17, 21 и 23 – НК<sup>100</sup>/НК<sup>100</sup>; № 13, 15 – НК<sup>100</sup>/НК<sup>110</sup>; № 16, 18 – НК<sup>121</sup>/НК<sup>121</sup>; № 12, 19, 20 и 22 – НК<sup>110</sup>/НК<sup>110</sup>; № 11 – НК<sup>87</sup>/НК<sup>100</sup>; № 4 – НК<sup>100</sup>/НК<sup>121</sup>

В електрофоретичните спектри на пробите от Кърджали, Димовци, Селище, Петко Каравелово, Еленово, Винаца, Бъзовец, Монтана и Вехтово се наблюдаваха продукти от експресията на два хексокиназни алела – НК<sup>100</sup> и НК<sup>110</sup>.

Двуалелна система на унаследяване по НК локус, с присъствие на алелите НК<sup>100</sup> и НК<sup>87</sup> установихме в генофонда на популациите Руец, Татари и Пловдив.

В генофонда на популациите Печковоц, Ралево, Генерал Киселово, Сливен, Ябланово и Мало Конаре установихме присъствие на три хексокиназни алела – НК<sup>87</sup>, НК<sup>100</sup> и НК<sup>110</sup>.

Интересен е фактът, че в генофонда на три от изследваните популации (Каварна, Васил Левски и Торос) бе констатирано присъствието и на четвъртия алел – НК<sup>121</sup>.

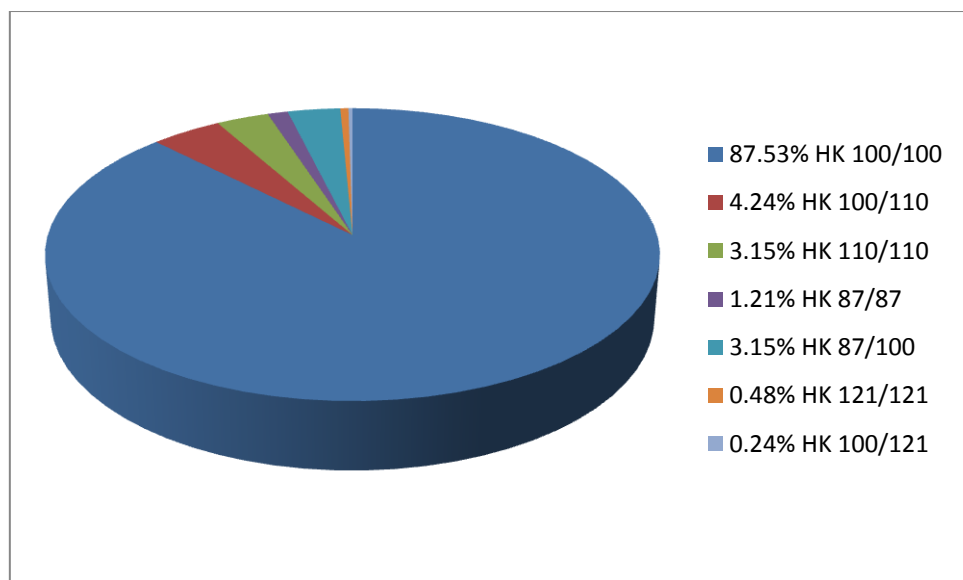
Данните от настоящото проучване сочат, че във всички изследвани пчелни популации най-често срещаният алел беше НК<sup>100</sup>. Неговата честота варираше от 0.776 в генофонда на популация Каварна до 0.971 – в генофонда на популация Вехтово.

Бе изчислено, че честотата на срещане на НК<sup>110</sup> алела е в диапазона от 0.015 в генофонда на Мало Конаре до 0.118 в генофонда на Винаца. Този алел не бе открит в генофонда на популациите Руец, Татари и Пловдив.

Честотата на срещане на хексокиназният алел НК<sup>87</sup> варираше в границите от 0.009 при популация Торос до 0.098 при Руец. Този алел не бе открит в генофонда на популациите Кърджали, Димовци, Селище, Петко Каравелово, Еленово, Винаца, Бъзовец, Монтана, Вехтово и Васил Левски.

Изчислената честота на срещане за алела НК<sup>121</sup> беше 0.043 в генофонда на популация Васил Левски, 0.052 – в Каварна и 0.009 в Торос. По-детайлна информация относно наличните алелни варианти в генофонда на проучваните популации е представена на Фигура 14.

Обобщените данни за генотипното разнообразие по отношение на НК locus в изследваните популации показва, че хомозиготната комбинация НК<sup>100</sup>/НК<sup>100</sup> е с най-голяма честота на срещане (87.53%). Генотипни комбинации НК<sup>100</sup>/НК<sup>110</sup>, НК<sup>110</sup>/НК<sup>110</sup>, НК<sup>87</sup>/НК<sup>100</sup>, НК<sup>87</sup>/НК<sup>87</sup>, НК<sup>121</sup>/НК<sup>121</sup> и НК<sup>100</sup>/НК<sup>121</sup> се срещаха с честоти в диапазона от 4.24% до 0.24%. Процентното разпределение на хексокиназните генотипове в проучваните пчелни популации, подложени на селекционен контрол, е представено на Фигура 9.



**Фигура 9.** Процентно разпределение на хексокиназните генотипове в проучваните популации

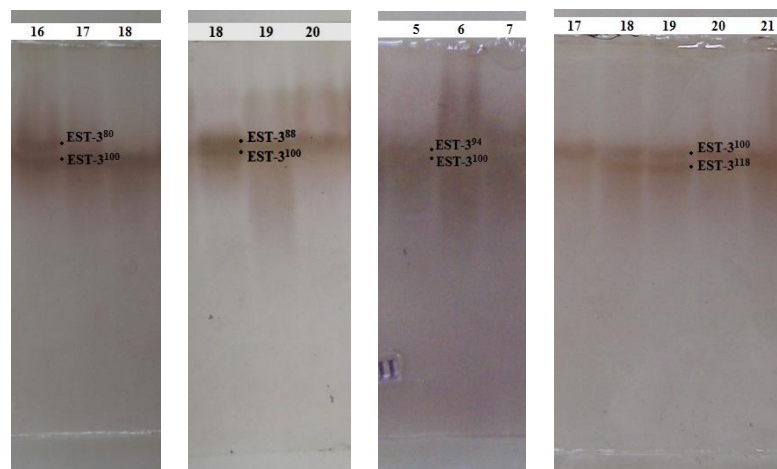
Наблюдаваната хетерозиготност (Н<sub>о</sub>) по отношение на анализирания НК locus в изследваните популации варираше от 0.029 (Петко Каравелово, Еленово, Бъзовец и Васил Левски до 0.176 (Сливен). При популациите Печковоц и Монтана стойността ѝ

беше нула. Изчислената средна стойност за Но за всички проучвани популации беше 0.075. Очакваната хетерозиготност (He) варираше в границите от 0.056 при популация Вехтово до 0.380 в популация Каварна със средна стойност за всички проучвани популации 0.159 (Таблица 1).

### Неспецифични естерази (Esterases EC 3.1.1.1. EST)

Ензимната група на естеразите е една от най-активните при насекомите и участва в реализирането на много метаболитни процеси. Има данни, че контролът на изоензимните форми на неспецифичните естерази при пчелите се осъществява от 7 естеразни локуса (Иванова 1996) като полиморфизмът по EST-3 е предпочитан за популационно-генетични проучвания на популации *Apis mellifera* с различен произход. В тази връзка, литературните проучвания сочат наличие на три алела по този локус в генофонда на популации, населяващи територията на бивша Чехословакия (Sheppard and McPheron 1986), Централна Анадолия (Kandemir and Kence 1995), Гърция (Bouga et al. 2005b) и части от Балканския полуостров (Ivanova 2010; Ivanova et al. 2010).

При проучването на EST-3 локуса в генофонда на изследваните популации медоносни пчели, подложени на селекционен контрол, бе установено наличието на общо пет алела – EST-3<sup>80</sup>, EST-3<sup>88</sup>, EST-3<sup>94</sup>, EST-3<sup>100</sup> и EST-3<sup>118</sup>. Същите бяха комбинирани в различни генотипни комбинации, както следва: EST-3<sup>80</sup>/EST-3<sup>100</sup>; EST-3<sup>100</sup>/EST-3<sup>100</sup>; EST-3<sup>88</sup>/EST-3<sup>100</sup>; EST-3<sup>94</sup>/EST-3<sup>100</sup>; EST-3<sup>100</sup>/EST-3<sup>118</sup>; EST-3<sup>118</sup>/EST-3<sup>118</sup>; EST-3<sup>94</sup>/EST-3<sup>94</sup> (Фигура 10).



**Фигура 10.** Електрофоретичен спектър на алоензимните форми на EST-3 при различни популации медоносни пчели в България

Получените резултати сочат, че алелът EST-3<sup>100</sup> е с най-висока честота на срещане в генофонда на всички анализирани пчелни популации. В три от популациите – Печковец, Вехтово и Васил Левски този алел бе фиксиран (честота 1.0). В останалите 18 популации честотата му варираше в границите от 0.871 (популация Кърджали) до 0.989 (в популация Руец).

Алелът EST-3<sup>80</sup> беше констатиран в генофонда на популациите Ралево, Торос, Кърджали, Сливен, Виница, Бъзовец, Монтана и Руец с честота на срещане от порядъка на 0.011 (Руец) до 0.100 (Кърджали).

В генофонда на четири от изследваните пчелни популации беше наблюдавано присъствие на EST-3<sup>88</sup> алела като честотата му на срещане бе в диапазона 0.015 (популации Торос и Селище) и 0.029 (популации Каварна и Ябланово).

В генофонда на три от проучваните популации беше установен алелът EST-3<sup>94</sup> с честота на срещане 0.015 (популация Сливен) и 0.029 (популации Кърджали и Димовци).

Алелът EST-3<sup>118</sup> присъстваше в генофонда на популациите Генерал Киселово, Димовци, Селище, Ябланово, Петко Каравелово, Еленово, Винаца, Бъзовец, Мало Конаре, Татари и Пловдив с честота на срещане от порядъка на 0.014 (Бъзовец) до 0.065 (Пловдив).

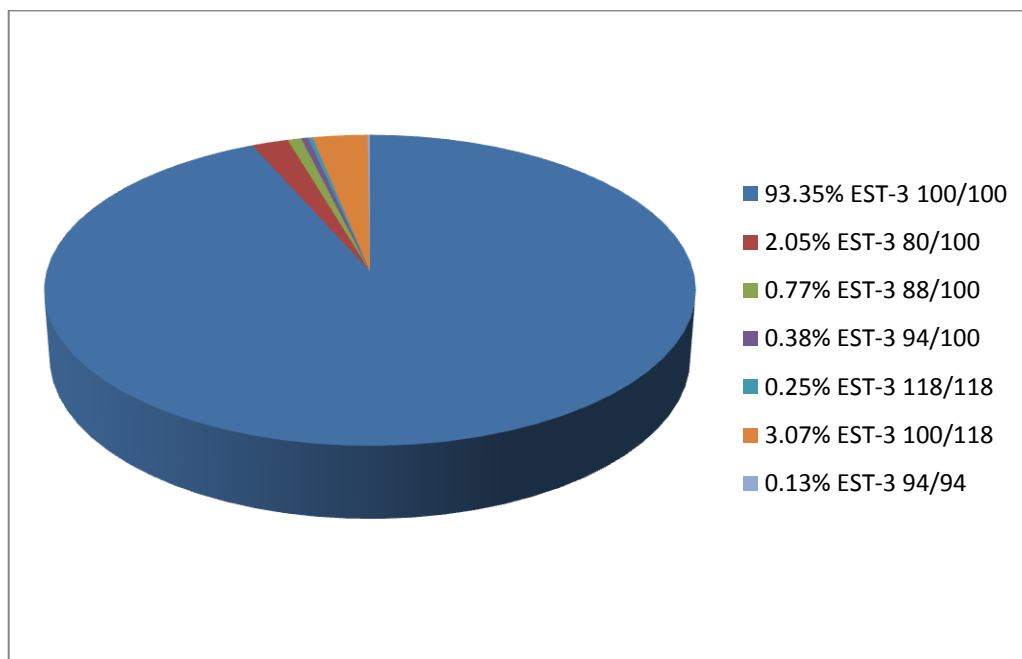
В десет от проучваните популациите наблюдавахме полиморфизъм с двуалелна система на унаследяване. За популациите Ралево, Монтана и Руец това бяха алелите EST-3<sup>80</sup> и EST-3<sup>100</sup>, за Каварна – EST-3<sup>88</sup> и EST-3<sup>100</sup>, а за Генерал Киселово, Петко Каравелово, Еленово, Мало Конаре, Татари и Пловдив – алелите EST-3<sup>100</sup> и EST-3<sup>118</sup>.

При проведения анализ, за някои от изследваните популации бе установен и триалелен полиморфизъм с присъствие на естеразни алели, както следва: за Торос – EST-3<sup>80</sup>, EST-3<sup>88</sup> и EST-3<sup>100</sup>; за Кърджали и Сливен – EST-3<sup>80</sup>, EST-3<sup>94</sup> и EST-3<sup>100</sup>; за Димовци – EST-3<sup>94</sup>, EST-3<sup>100</sup> и EST-3<sup>118</sup>; за Селище и Ябланово – EST-3<sup>88</sup>, EST-3<sup>100</sup> и EST-3<sup>118</sup> и за Винаца и Бъзовец – EST-3<sup>80</sup>, EST-3<sup>100</sup> и EST-3<sup>118</sup>.

Данните за алелното присъствие и честотите на срещане на описаните естеразни алели са представени на Фигура 14.

При направения анализ бе констатирано, че най-често срещаната комбинация от алели в генотипната структура на изследваните пчелни популации е EST-3<sup>100</sup>/EST-3<sup>100</sup> – 93.35%. Останалите генотипни комбинации се срещат с обща честота от 0.13% до 3.07%.

По-пълна информация относно процентното разпределение на естеразните генотипни комбинации в проучваните популации е представена на Фигура 11.



**Фигура 11.** Процентно разпределение на естеразните генотипове в проучваните популации

Наблюдаваната хетерозиготност ( $H_o$ ) беше в границите от 0.022 (Руец) до 0.257 (Кърджали). Средната стойност на наблюдаваната хетерозиготност за всички проучвани популации бе 0.063 (Таблица 1).

Стойностите на очакваната хетерозиготност ( $H_e$ ) варираха от 0.022 (Руец) до 0.230 (Кърджали). Установената средна стойност на очакваната хетерозиготност за всички проучвани популации бе 0.068 (Таблица 1).

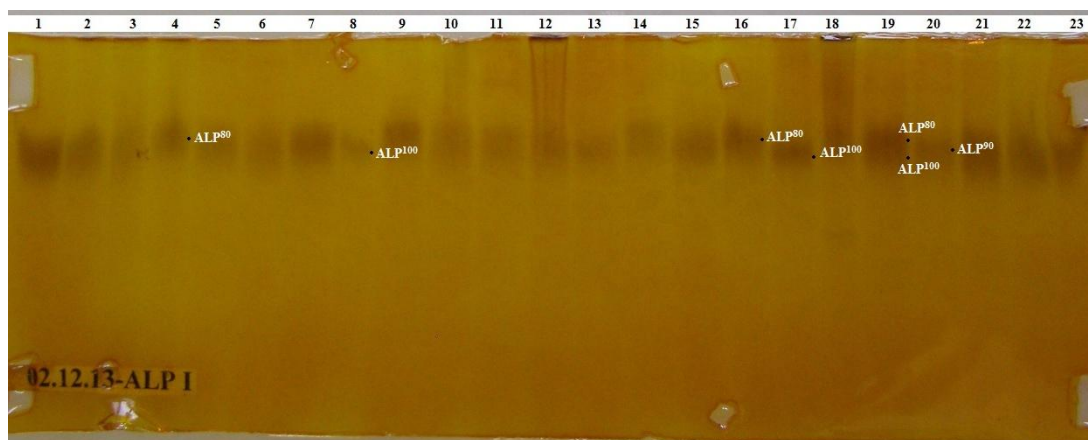
### Алкални фосфатази (Alkaline phosphatase EC 3.1.3.1. ALP)

Алкалната фосфатаза е цинк съдържащ металоензим с димерна структура. Алкалната фосфатаза е ензим-хидролаза, който катализира хидролизата на различни фосфатни групи от фосфорилирани съединения, улеснявайки транспорта през клетъчните мембрани и предоставяйки на клетката източник на неорганичен фосфат.

При насекомите, ALP е описана за пръв път от Nakamura (1940), който открива изява на ензима в ларвен стадий от онтогенезата на копринената пеперуда *Bombux mori*. При по-нататъшни изследвания на тъканни екстракти, Drilhon and Busnel (1945) установяват наличието на този ензим в гастроинтестиналния тракт на десет вида насекоми, включително и при пчели (Drilhon and Busnel 1945; Rockstein and Herron 1951).

Sylvester (1986) съобщава, че при *Apis mellifera*, ALP-локусът е мономорфен, но при последващи проучвания се установява дву- и триалелен полиморфизъм по този локус (Bouga et al. 2005b; Ivanova et al. 2007; 2011; 2012).

В генофонда на изследваните от нас популации медоносни пчели бе констатирано наличието на три алела по ALP локуса –  $ALP^{80}$ ,  $ALP^{90}$  и  $ALP^{100}$ . При анализиране на генотипните структури се установи, че трите алела се срещат както в хомозиготни, така и в хетерозиготни комбинации –  $ALP^{100}/ALP^{100}$ ,  $ALP^{80}/ALP^{100}$ ,  $ALP^{80}/ALP^{80}$ ,  $ALP^{90}/ALP^{90}$ ,  $ALP^{90}/ALP^{100}$ ,  $ALP^{80}/ALP^{90}$  (Фигура 12).



**Фигура 12.** Електрофоретичен спектър на алоензимните форми на алкалните фосфатази при популации медоносни пчели в България: 1-23 популация Винаца. Генотипни комбинации: индивиди № 8, 13, 15, 17, 23 –  $ALP^{100}/ALP^{100}$ ; № 4, 9, 11, 14, 16, 18 –  $ALP^{80}/ALP^{80}$ ; № 20 –  $ALP^{90}/ALP^{90}$ ; № 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 12, 19, 21, 22 –  $ALP^{80}/ALP^{100}$

В генотипната структура на всички изследвани популации с най-висока честота се срещаше генотипът  $ALP^{80}/ALP^{100}$ . Генотипната структура на популациите Каварна и Еленово се характеризираше с наличието и на шестте, описани по-горе генотипни комбинации.

Двуалелна система на унаследяване по ALP локуса, с присъствие на алелите  $ALP^{80}$  и  $ALP^{100}$  наблюдавахме в генофонда на популациите Печковец, Ралево, Торос,



Генерал Киселово, Кърджали, Димовци, Селище, Ябланово, Петко Каравелово, Монтана, Вехтово, Мало Конаре, Васил Левски, Татари, Руец и Пловдив.

Присъствие на алела  $ALP^{90}$  бе констатирано в генофонда на популациите Каварна, Сливен, Еленово, Винаца и Бъзовец. Честотата му варираше от 0.029 (популация Винаца) до 0.266 (популация Каварна).

Честотата на алела  $ALP^{80}$  варираше от 0.351 в популация Каварна до 0.588 в популациите Генерал Киселово и Петко Каравелово.

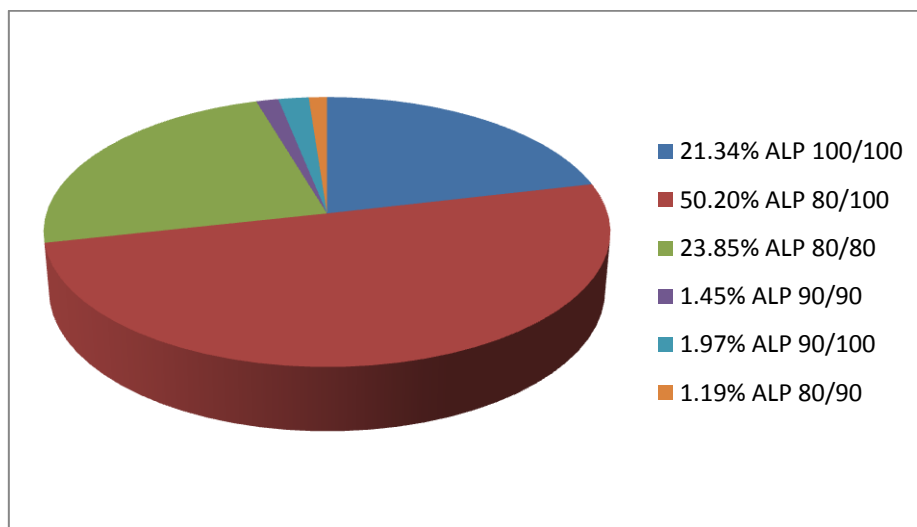
Честотата на срещане на  $ALP^{100}$  алела беше в границите от 0.383 (популация Каварна) до 0.574 (популация Сливен).

Подробни данни относно изявените алелни варианти и техните честоти са представени на Фигура 14.

Разнообразието от генотипни комбинации на алелите на ALP локуса показва, че с най-висока честота на срещане в анализирани популации е генотипът  $ALP^{80}/ALP^{100}$  – 50.20%. Генотипните варианти  $ALP^{80}/ALP^{80}$  и  $ALP^{100}/ALP^{100}$  бяха с честоти на срещане 23.85% и 21.34%, съответно. Останалите генотипи бяха с честоти 1.19% ( $ALP^{80}/ALP^{90}$ ), 1.45% ( $ALP^{90}/ALP^{90}$ ) и 1.97% ( $ALP^{90}/ALP^{100}$ ).

Процентното разпределение на генотипните комбинации по ALP локуса в проучваните популации е представено на Фигура 13.

Наблюдаваната хетерозиготност ( $H_o$ ) по отношение на ALP локуса в изследваните популации варираше от 0.314 при популация Вехтово до 0.674 при популация Татари. Средната ѝ стойност за всички, включени в проучването популации бе 0.528 (Таблица 1).



**Фигура 13.** Процентно разпределение на генотипните комбинации по ALP локуса в проучваните пчелни популации

Очакваната хетерозиготност ( $H_e$ ) беше в границите от 0.484 при популациите Петко Каравелово и Генерал Киселово до 0.659 в популация Каварна. Установена бе средна стойност на очакваната хетерозиготност за всички изследвани популации от порядъка на 0.514 (Таблица 1).

## II. Сравнителен популационно-генетичен анализ

При анализа на пробите от изследваните пчелни популации, подложени на селекционен контрол и използвани в Националната програма за селекция на

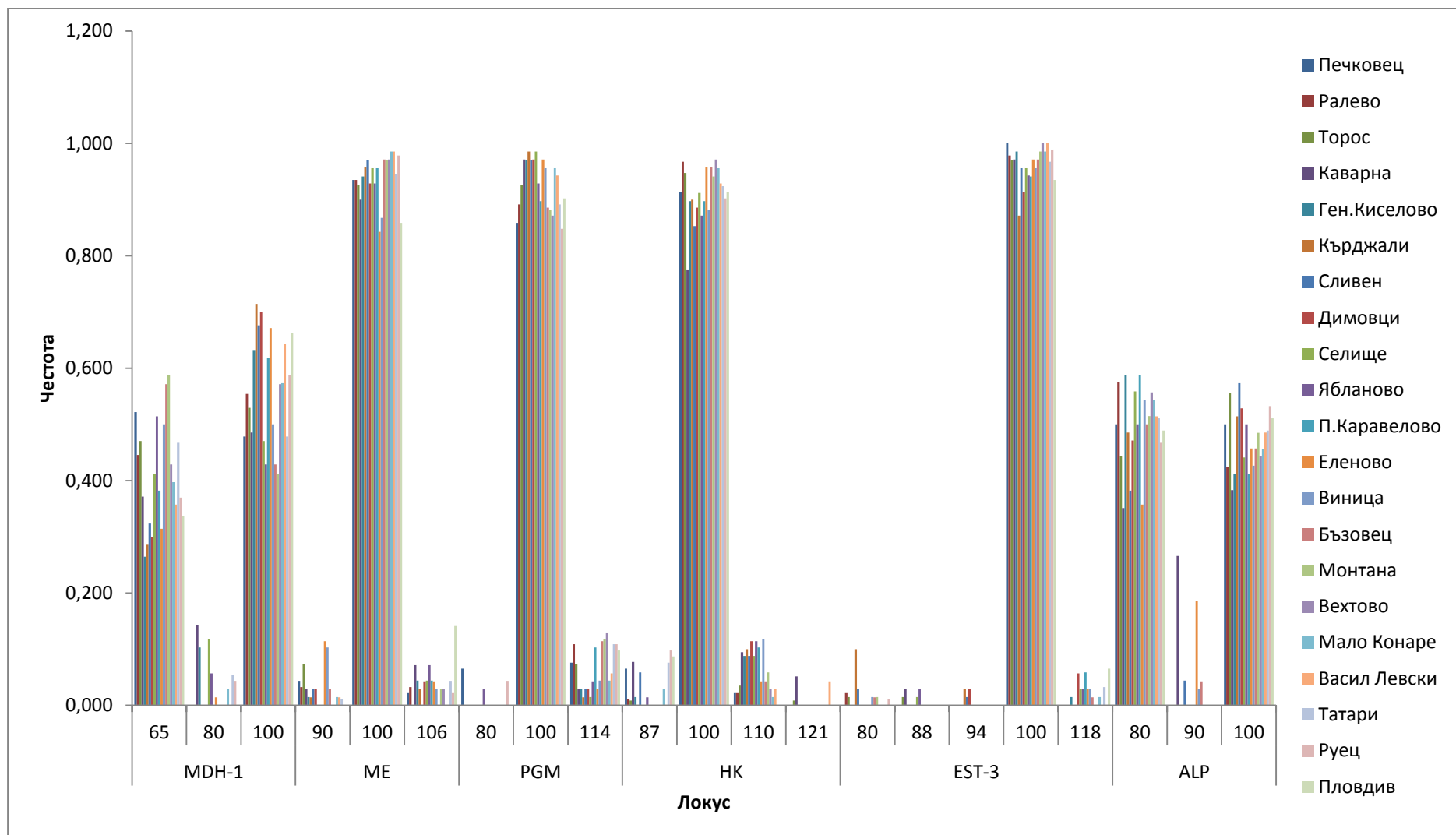
медоносните пчели в България бе констатирано наличието на общо 21 алелни варианта по 6-те проучвани ензимни локуси. Най-голям брой алели – 5 – бе диагностиран по отношение на EST-3 локуса. Четири алела бяха описани по НК локуса. Три алела бяха установени за MDH-1, ME, PGM и ALP локусите. Най-голям брой алели бе констатиран в генофонда на популация Каварна – общо 17, а най-малък (11) – в популация Вехтово. В настоящото проучване средният брой алели за локус варираше от 2.143 (за PGM) до 2.524 (за НК) и от 1.833 по всички локуси за популация Вехтово до 2.833 по всички локуси за популация Каварна. При направения статистически анализ не бе констатирано наличие на частни алели (алелите, които се срещат само и единствено в конкретна популация), което е доказателство за сходство и консолидация по отношение на генетичното разнообразие в изследваните пчелни популации, подложени на селекционен контрол и използвани в Националната селекционна програма. Обобщените сравнителни данни относно констатирания полиморфизъм по локуси и честотите на установените алелни варианти при шестте ензимни локуси за всяка от изследваните популации са представени на Фигура 14. Обобщени данни относно установения брой алели (общо и за отделните популации) и нива на хетерозиготност в изследваните популации и по отделните анализирани локуси, както и усреднени данни с включена статистическа грешка, информация относно броя изследвани индивиди, броя отчетени алели и броя ефективни алели, индекса на Шанон за вариации в изследваните популации, наблюдавана, очаквана и относителна очаквана хетерозиготност  $((2N / (2N-1) * H_e)$ , както и фиксационен индекс (F) за шестте проучвани локуса при всички изследвани популации и средните стойности на проучваните популационни параметри са представени в Таблицы 2, 3 и на Фигура 15.

Общата средна стойност на наблюдаваната хетерозиготност ( $H_o$ ) за всички изследвани популации бе 0.218. Най-ниско ниво на хетерозиготност (0.157) бе отчетено в популация Димовци, а най-високо (0.301) – за популация Татари. Най-ниска наблюдавана хетерозиготност 0.063 бе отчетена по отношение на EST-3 локуса, а най-висока – 0.528 за ALP локуса. Очакваната хетерозиготност бе с обща средна стойност 0.247 и варираше от 0.205 в популацията Васил Левски до 0.323, в популация Каварна и от 0.068 за EST-3 до 0.514 при ALP (Таблицы 1, 2, 3).

Отклонения от закона на Харди-Вайнберг бяха констатирани при всичките шест анализирани ензимни локуси. Информацията относно стойностите на нулевата хипотеза, степените на свобода и установената вероятност с данни за незначителни и значителни отклонения показва, че вероятността  $P$  е в следния диапазон:  $P < 0.05$ , 0.01 и 0.001.

Бяха отчетени 28 (22.22%) отклонения с  $P < 0.001$  от общо 126 комбинации за изследваните локуси и популации. В 74 от тях (58.73%) отклоненията бяха незначителни, а в останалите 24 (19.05%) – стойностите на вероятността  $P$  бяха удовлетворителни, в границите  $0.001 < P < 0.01$ . Анализът на данните показва, че болшинството отклонения са били в полза на хетерозиготите.

Нивото на хетерозиготност между индивидите в отделните субпопулации ( $F_{IS}$ ), на индивидите в общата популация ( $F_{IT}$ ) и степента на генетична диференциация между отделните субпопулации в общата популация ( $F_{ST}$ ) са представени в Таблица 3. От таблицата е видно, че изчислените  $F_{ST}$  стойности за шестте проучвани локуса варират от 0.022 за ALP до 0.037 за MDH-1 със средна стойност 0.029, което демонстрира ниско ниво на генетична диференциация. Изчислените на базата на шестте ензимни локуса стойности за потока на гени ( $Nm$ ) между популациите, включени в настоящото проучване, варираха от 6.522 за MDH-1 до 11.246 за ALP, със средна стойност 8.514 (Таблица 3). Стойност по-голяма от 2, показва ниска степен на генетична диференциация.



**Фигура 14.** Сравнителни данни относно изявения полиморфизъм по шестте проучвани ензимни локуси – констатирани алели и алелни честоти

**Таблица 1.** Брой изследвани индивиди (N), брой алели (Na), брой ефективни алели (Ne), индекс на Шанон (I), наблюдавана (Ho), очаквана (He), относителна очаквана хетерозиготност (uHe) и фиксационен индекс (F) по локуси за изследваните популации

Популация		MDH-1	ME	PGM	HK	EST-3	ALP
<b>Печковец</b>	N	46	46	46	46	46	46
	Na	2	3	3	3	1	2
	Ne	1.996	1.141	1.338	1.193	1.000	2.000
	I	0.692	0.283	0.505	0.344	0.000	0.693
	Ho	0.478	0.043	0.109	0.000	0.000	0.609
	He	0.499	0.124	0.253	0.162	0.000	0.500
	uHe	0.505	0.125	0.255	0.163	0.000	0.505
	F	0.042	0.649	0.570	1.000		-0.217
<b>Ралево</b>	N	46	46	46	46	46	46
	Na	2	3	2	3	2	2
	Ne	1.977	1.142	1.240	1.068	1.044	1.955
	I	0.687	0.286	0.344	0.164	0.105	0.682
	Ho	0.500	0.043	0.043	0.065	0.043	0.630
	He	0.494	0.124	0.194	0.064	0.043	0.488
	uHe	0.500	0.125	0.196	0.064	0.043	0.494
	F	-0.012	0.650	0.776	-0.026	-0.022	-0.291
<b>Торос</b>	N	34	34	68	57	34	45
	Na	2	2	2	4	3	2
	Ne	1.993	1.158	1.158	1.112	1.061	1.976
	I	0.691	0.263	0.263	0.252	0.153	0.687
	Ho	0.353	0.088	0.088	0.070	0.059	0.489
	He	0.498	0.136	0.136	0.101	0.058	0.494
	uHe	0.506	0.138	0.137	0.102	0.058	0.499
	F	0.292	0.352	0.352	0.306	-0.023	0.010
<b>Каварна</b>	N	35	35	70	58	35	47
	Na	3	3	2	4	2	3
	Ne	2.536	1.226	1.059	1.614	1.059	2.936
	I	0.997	0.385	0.130	0.772	0.130	1.087
	Ho	0.457	0.029	0.029	0.138	0.057	0.596
	He	0.606	0.184	0.056	0.380	0.056	0.659
	uHe	0.614	0.187	0.056	0.384	0.056	0.666
	F	0.245	0.845	0.485	0.637	-0.029	0.096
<b>Ген.Киселово</b>	N	34	34	34	34	34	34
	Na	3	3	2	3	2	2
	Ne	2.081	1.126	1.061	1.230	1.030	1.940
	I	0.876	0.257	0.133	0.374	0.077	0.677
	Ho	0.529	0.059	0.000	0.147	0.029	0.412
	He	0.519	0.112	0.057	0.187	0.029	0.484

	uHe	0.527	0.114	0.058	0.190	0.029	0.492
	F	-0.019	0.475	1.000	0.215	-0.015	0.150
<b>Кърджали</b>	N	35	35	35	35	35	35
	Na	2	3	2	2	3	2
	Ne	1.690	1.090	1.029	1.220	1.298	1.998
	I	0.598	0.204	0.075	0.325	0.452	0.693
	Ho	0.400	0.086	0.029	0.086	0.257	0.514
	He	0.408	0.083	0.028	0.180	0.230	0.500
	uHe	0.414	0.084	0.029	0.183	0.233	0.507
	F	0.020	-0.034	-0.014	0.524	-0.119	-0.029
<b>Сливен</b>	N	34	34	34	34	34	34
	Na	2	2	2	3	3	3
	Ne	1.778	1.061	1.061	1.354	1.093	2.096
	I	0.630	0.133	0.133	0.517	0.209	0.824
	Ho	0.412	0.059	0.059	0.176	0.088	0.500
	He	0.438	0.057	0.057	0.261	0.085	0.523
	uHe	0.444	0.058	0.058	0.265	0.086	0.531
	F	0.059	-0.030	-0.030	0.325	-0.036	0.044
<b>Димовци</b>	N	35	35	35	35	35	35
	Na	2	3	2	2	3	2
	Ne	1.724	1.156	1.059	1.254	1.190	1.993
	I	0.611	0.305	0.130	0.355	0.347	0.692
	Ho	0.257	0.029	0.057	0.057	0.000	0.543
	He	0.420	0.135	0.056	0.202	0.160	0.498
	uHe	0.426	0.137	0.056	0.205	0.162	0.506
	F	0.388	0.789	-0.029	0.718	1.000	-0.089
<b>Селище</b>	N	34	34	34	34	34	34
	Na	3	2	2	2	3	2
	Ne	2.470	1.092	1.030	1.192	1.093	1.973
	I	0.972	0.181	0.077	0.298	0.209	0.686
	Ho	0.441	0.029	0.029	0.118	0.088	0.529
	He	0.595	0.084	0.029	0.161	0.085	0.493
	uHe	0.604	0.086	0.029	0.163	0.086	0.500
	F	0.259	0.651	-0.015	0.269	-0.036	-0.074
<b>Ябланово</b>	N	35	35	35	35	35	35
	Na	3	2	3	3	3	2
	Ne	2.215	1.153	1.156	1.294	1.123	2.000
	I	0.869	0.257	0.305	0.429	0.259	0.693
	Ho	0.571	0.086	0.029	0.086	0.114	0.600
	He	0.549	0.133	0.135	0.227	0.109	0.500
	uHe	0.557	0.135	0.137	0.231	0.111	0.507
	F	-0.042	0.354	0.789	0.623	-0.045	-0.200
<b>П.Каравелово</b>	N	34	34	34	34	34	34
	Na	2	2	2	2	2	2
	Ne	1.895	1.092	1.227	1.227	1.125	1.940

	I	0.665	0.181	0.331	0.331	0.224	0.677
	Ho	0.529	0.088	0.088	0.029	0.118	0.647
	He	0.472	0.084	0.185	0.185	0.111	0.484
	uHe	0.479	0.086	0.187	0.187	0.112	0.492
	F	-0.121	-0.046	0.522	0.841	-0.063	-0.336
<b>Еленово</b>	N	35	35	35	35	35	35
	Na	3	3	2	2	2	3
	Ne	1.819	1.379	1.059	1.089	1.059	2.695
	I	0.692	0.527	0.130	0.177	0.130	1.038
	Ho	0.486	0.200	0.057	0.029	0.057	0.543
	He	0.450	0.275	0.056	0.082	0.056	0.629
	uHe	0.457	0.279	0.056	0.083	0.056	0.638
	F	-0.079	0.272	-0.029	0.652	-0.029	0.137
<b>Виница</b>	N	34	34	34	34	34	34
	Na	2	3	2	2	3	3
	Ne	2.000	1.308	1.092	1.262	1.093	2.089
	I	0.693	0.461	0.181	0.362	0.209	0.798
	Ho	0.353	0.265	0.088	0.118	0.088	0.559
	He	0.500	0.236	0.084	0.208	0.085	0.521
	uHe	0.507	0.239	0.086	0.211	0.086	0.529
	F	0.294	-0.123	-0.046	0.433	-0.036	-0.072
<b>Бъзовец</b>	N	35	35	35	35	35	35
	Na	2	2	2	2	3	3
	Ne	1.960	1.059	1.254	1.089	1.059	2.170
	I	0.683	0.130	0.355	0.177	0.150	0.839
	Ho	0.514	0.057	0.114	0.029	0.057	0.400
	He	0.490	0.056	0.202	0.082	0.056	0.539
	uHe	0.497	0.056	0.205	0.083	0.057	0.547
	F	-0.050	-0.029	0.435	0.652	-0.022	0.258
<b>Монтана</b>	N	34	34	34	34	34	34
	Na	2	2	2	2	2	2
	Ne	1.940	1.061	1.262	1.125	1.030	1.998
	I	0.677	0.133	0.362	0.224	0.077	0.693
	Ho	0.471	0.059	0.235	0.000	0.029	0.324
	He	0.484	0.057	0.208	0.111	0.029	0.500
	uHe	0.492	0.058	0.211	0.112	0.029	0.507
	F	0.029	-0.030	-0.133	1.000	-0.015	0.352
<b>Вехтово</b>	N	35	35	35	35	35	35
	Na	2	2	2	2	1	2
	Ne	1.960	1.059	1.289	1.059	1.000	1.974
	I	0.683	0.130	0.384	0.130	0.000	0.687
	Ho	0.514	0.057	0.200	0.057	0.000	0.314
	He	0.490	0.056	0.224	0.056	0.000	0.493
	uHe	0.497	0.056	0.227	0.056	0.000	0.501
	F	-0.050	-0.029	0.107	-0.029		0.363

<b>Мало Конаре</b>	<b>N</b>	34	34	34	34	34	34
	<b>Na</b>	3	2	2	3	2	2
	<b>Ne</b>	2.051	1.030	1.092	1.093	1.030	1.985
	<b>I</b>	0.789	0.077	0.181	0.209	0.077	0.689
	<b>Ho</b>	0.500	0.029	0.088	0.088	0.029	0.500
	<b>He</b>	0.513	0.029	0.084	0.085	0.029	0.496
	<b>uHe</b>	0.520	0.029	0.086	0.086	0.029	0.504
	<b>F</b>	0.024	-0.015	-0.046	-0.036	-0.015	-0.008
<b>Васил Левски</b>	<b>N</b>	35	35	35	35	35	35
	<b>Na</b>	2	2	2	3	1	2
	<b>Ne</b>	1.849	1.029	1.121	1.156	1.000	1.998
	<b>I</b>	0.652	0.075	0.219	0.305	0.000	0.693
	<b>Ho</b>	0.543	0.029	0.114	0.029	0.000	0.571
	<b>He</b>	0.459	0.028	0.108	0.135	0.000	0.500
	<b>uHe</b>	0.466	0.029	0.109	0.137	0.000	0.507
	<b>F</b>	-0.182	-0.014	-0.061	0.789		-0.144
<b>Татари</b>	<b>N</b>	46	46	46	46	46	46
	<b>Na</b>	3	3	2	2	2	2
	<b>Ne</b>	2.222	1.116	1.240	1.164	1.067	1.999
	<b>I</b>	0.867	0.238	0.344	0.269	0.144	0.693
	<b>Ho</b>	0.674	0.065	0.217	0.109	0.065	0.674
	<b>He</b>	0.550	0.104	0.194	0.141	0.063	0.500
	<b>uHe</b>	0.556	0.105	0.196	0.142	0.064	0.505
	<b>F</b>	-0.226	0.371	-0.122	0.227	-0.034	-0.348
<b>Руец</b>	<b>N</b>	46	46	46	46	46	46
	<b>Na</b>	3	2	3	2	2	2
	<b>Ne</b>	2.070	1.044	1.365	1.214	1.022	1.992
	<b>I</b>	0.817	0.105	0.518	0.320	0.060	0.691
	<b>Ho</b>	0.565	0.000	0.174	0.065	0.022	0.587
	<b>He</b>	0.517	0.043	0.267	0.177	0.022	0.498
	<b>uHe</b>	0.523	0.043	0.270	0.178	0.022	0.503
	<b>F</b>	-0.093	1.000	0.350	0.631	-0.011	-0.179
<b>Пловдив</b>	<b>N</b>	46	46	46	46	46	46
	<b>Na</b>	2	2	2	2	2	2
	<b>Ne</b>	1.808	1.320	1.214	1.189	1.139	1.999
	<b>I</b>	0.639	0.407	0.320	0.295	0.241	0.693
	<b>Ho</b>	0.457	0.065	0.196	0.087	0.130	0.543
	<b>He</b>	0.447	0.243	0.177	0.159	0.122	0.500
	<b>uHe</b>	0.452	0.245	0.178	0.161	0.123	0.505
	<b>F</b>	-0.022	0.731	-0.108	0.452	-0.070	-0.087
<b>Средни стойности и стандартна грешка</b>							
		<b>MDH-1</b>	<b>ME</b>	<b>PGM</b>	<b>HK</b>	<b>EST-3</b>	<b>ALP</b>
<b>N</b>	<b>Mean</b>	37.238	37.238	40.524	39.429	37.238	38.333
	<b>SE</b>	1.100	1.100	2.333	1.700	1.100	1.218

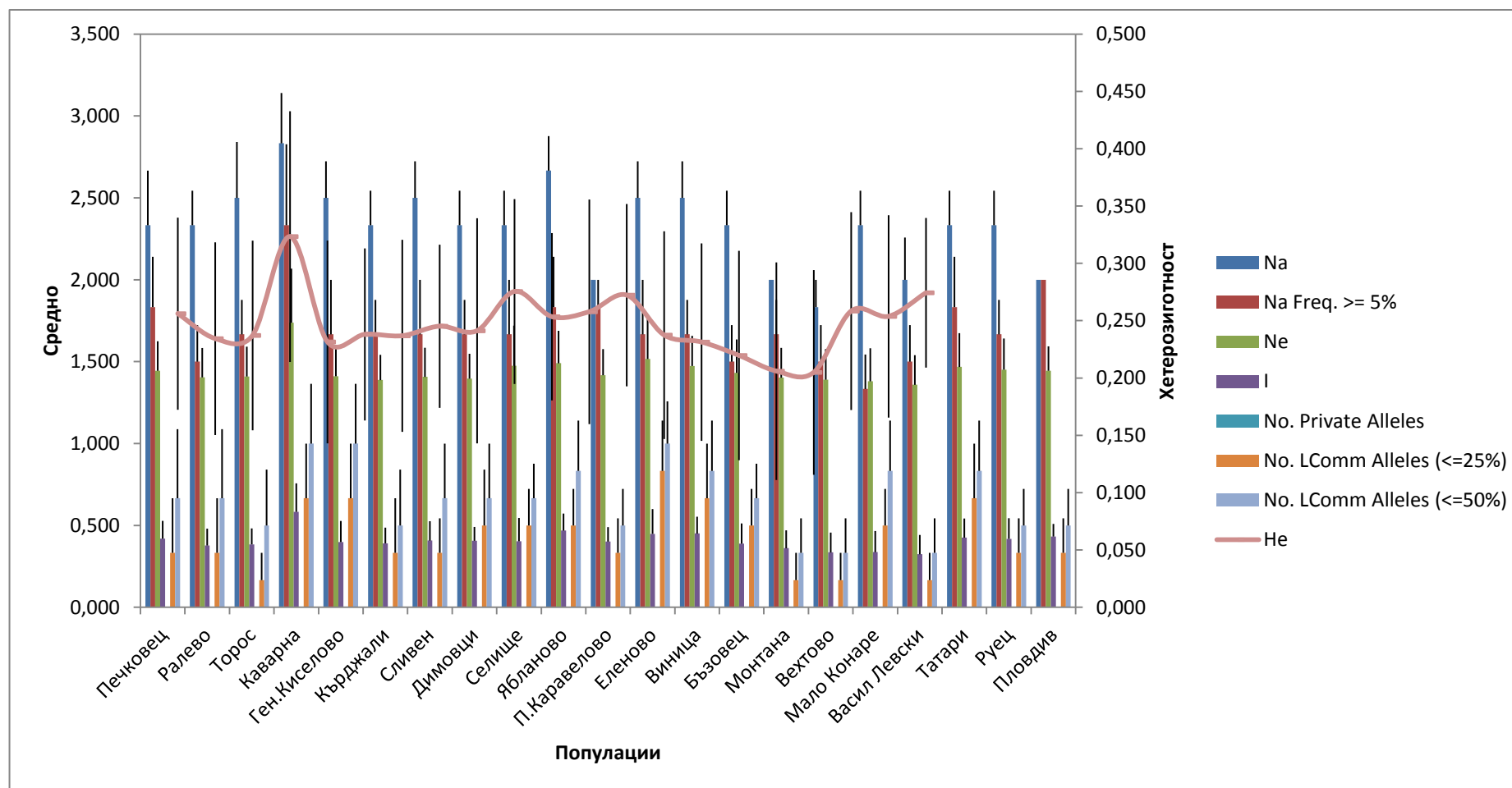
<b>Na</b>	<b>Mean</b>	2.381	2.429	2.143	2.524	2.238	2.238
	<b>SE</b>	0.109	0.111	0.078	0.148	0.153	0.095
<b>Ne</b>	<b>Mean</b>	2.002	1.135	1.162	1.200	1.077	2.081
	<b>SE</b>	0.048	0.021	0.023	0.027	0.015	0.055
<b>I</b>	<b>Mean</b>	0.737	0.239	0.258	0.316	0.155	0.743
	<b>SE</b>	0.026	0.027	0.029	0.031	0.025	0.025
<b>Ho</b>	<b>Mean</b>	0.476	0.070	0.097	0.075	0.063	0.528
	<b>SE</b>	0.020	0.013	0.015	0.010	0.013	0.021
<b>He</b>	<b>Mean</b>	0.495	0.113	0.133	0.159	0.068	0.514
	<b>SE</b>	0.011	0.015	0.017	0.016	0.012	0.010
<b>uHe</b>	<b>Mean</b>	0.502	0.115	0.134	0.161	0.069	0.521
	<b>SE</b>	0.011	0.016	0.017	0.017	0.013	0.010
<b>F</b>	<b>Mean</b>	0.036	0.323	0.226	0.486	0.021	-0.032
	<b>SE</b>	0.036	0.079	0.077	0.068	0.054	0.045



**Таблица 2.** Средни стойности за брой изследвани индивиди (N), брой отчетени алели (Na), брой ефективни алели (Ne), индекс на Шанон (I), наблюдавана (Ho), очаквана (He), относителна очаквана хетерозиготност (uHe) и фиксационен индекс (F) за шестте проучвани локуса по отношение на изследваните популации

Средни стойности и средна грешка									
Рор		N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
Печковец	Mean	46.000	2.333	1.445	0.420	0.207	0.256	0.259	0.409
	SE	0.000	0.333	0.180	0.109	0.109	0.084	0.085	0.200
Ралево	Mean	46.000	2.333	1.404	0.378	0.221	0.234	0.237	0.179
	SE	0.000	0.211	0.180	0.103	0.110	0.084	0.085	0.175
Торос	Mean	45.333	2.500	1.410	0.385	0.191	0.237	0.240	0.215
	SE	5.875	0.342	0.182	0.098	0.075	0.083	0.084	0.071
Каварна	Mean	46.667	2.833	1.738	0.583	0.218	0.323	0.327	0.380
	SE	6.004	0.307	0.330	0.174	0.101	0.109	0.111	0.137
Генерал Киселово	Mean	34.000	2.500	1.411	0.399	0.196	0.232	0.235	0.301
	SE	0.000	0.224	0.192	0.129	0.090	0.088	0.090	0.158
Кърджали	Mean	35.000	2.333	1.388	0.391	0.229	0.238	0.242	0.058
	SE	0.000	0.211	0.155	0.096	0.080	0.075	0.076	0.095
Сливен	Mean	34.000	2.500	1.407	0.407	0.216	0.237	0.240	0.055
	SE	0.000	0.224	0.178	0.119	0.079	0.084	0.085	0.056
Димовци	Mean	35.000	2.333	1.396	0.407	0.157	0.245	0.249	0.463
	SE	0.000	0.211	0.153	0.085	0.086	0.071	0.072	0.184
Селище	Mean	34.000	2.333	1.475	0.404	0.206	0.241	0.245	0.176
	SE	0.000	0.211	0.246	0.142	0.090	0.098	0.100	0.113
Ябланово	Mean	35.000	2.667	1.490	0.469	0.248	0.276	0.280	0.246
	SE	0.000	0.211	0.199	0.104	0.108	0.081	0.082	0.165
Петко Каравелово	Mean	34.000	2.000	1.417	0.402	0.250	0.254	0.257	0.133
	SE	0.000	0.000	0.160	0.089	0.109	0.073	0.074	0.183
Еленово	Mean	35.000	2.500	1.517	0.449	0.229	0.258	0.262	0.154
	SE	0.000	0.224	0.265	0.152	0.094	0.098	0.099	0.113

<b>Виница</b>	<b>Mean</b>	34.000	2.500	1.474	0.451	0.245	0.272	0.276	0.075
	<b>SE</b>	0.000	0.224	0.184	0.103	0.077	0.080	0.081	0.094
<b>Бъзовец</b>	<b>Mean</b>	35.000	2.333	1.432	0.389	0.195	0.237	0.241	0.207
	<b>SE</b>	0.000	0.211	0.204	0.124	0.085	0.091	0.092	0.119
<b>Монтана</b>	<b>Mean</b>	34.000	2.000	1.402	0.361	0.186	0.231	0.235	0.200
	<b>SE</b>	0.000	0.000	0.182	0.110	0.077	0.086	0.087	0.173
<b>Вехтово</b>	<b>Mean</b>	35.000	1.833	1.390	0.335	0.190	0.220	0.223	0.072
	<b>SE</b>	0.000	0.167	0.187	0.122	0.080	0.091	0.093	0.071
<b>Мало Конаре</b>	<b>Mean</b>	34.000	2.333	1.380	0.337	0.206	0.206	0.209	-0.016
	<b>SE</b>	0.000	0.211	0.202	0.130	0.094	0.095	0.096	0.010
<b>Васил Левски</b>	<b>Mean</b>	35.000	2.000	1.359	0.324	0.214	0.205	0.208	0.077
	<b>SE</b>	0.000	0.258	0.181	0.119	0.110	0.089	0.091	0.165
<b>Татари</b>	<b>Mean</b>	46.000	2.333	1.468	0.426	0.301	0.258	0.261	-0.022
	<b>SE</b>	0.000	0.211	0.206	0.117	0.120	0.086	0.087	0.112
<b>Руец</b>	<b>Mean</b>	46.000	2.333	1.451	0.418	0.236	0.254	0.257	0.283
	<b>SE</b>	0.000	0.211	0.190	0.126	0.110	0.088	0.089	0.190
<b>Пловдив</b>	<b>Mean</b>	46.000	2.000	1.445	0.433	0.246	0.274	0.277	0.149
	<b>SE</b>	0.000	0.000	0.149	0.077	0.083	0.065	0.066	0.145
<b>Обобщени средни стойности и средно отклонение за локуси и популации</b>									
		<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>I</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>uHe</b>	<b>F</b>
<b>Общо</b>	<b>Mean</b>	38.333	2.325	1.443	0.408	0.218	0.247	0.250	0.181
	<b>SE</b>	0.609	0.049	0.041	0.024	0.019	0.017	0.018	0.030



**Фигура 15.** Данни за наблюдаван брой алели и обща честота на срещане в популациите, индекс на Шанон и нива на хетерозиготност: Na – брой алели; Na (Freq  $\geq 5\%$ ) – брой алели с честота  $\geq 5\%$ ; Ne – брой ефективни алели; I – индекс на Шанон; No – брой частни алели; No. LComm Alleles ( $\leq 25\%$ ) – брой алели, които се срещат в по-малко от 25% от популациите; No. LComm Alleles ( $\leq 50\%$ ) – брой алели, които се срещат в по-малко от 50% от популациите; He – хетерозиготност

**Таблица 3.** Средни стойности на очакваната ( $H_e$ ) и наблюдаваната ( $H_o$ ) хетерозиготност за отделните изследвани локуси,  $F_{IS}$  статистика и поток на гени  $Nm$  за всички изследвани популации

Локус	Средна $H_e$	Средна $H_o$	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$Nm$
<b>MDH-1</b>	0.495	0.476	0.038	0.073	0.037	6.522
<b>ME</b>	0.113	0.070	0.385	0.404	0.031	7.782
<b>PGM</b>	0.133	0.097	0.267	0.287	0.027	9.054
<b>HK</b>	0.159	0.075	0.527	0.541	0.030	8.007
<b>EST-3</b>	0.068	0.063	0.065	0.092	0.029	8.474
<b>ALP</b>	0.514	0.528	-0.026	-0.004	0.022	11.246
<b>Средни стойности</b>	0.247	0.218	0.209	0.232	0.029	8.514
<b>SE</b>	0.017	0.019	0.090	0.087	0.002	0.646

Изчислените  $Nm$  стойности за всички популационни двойки демонстрират ниска степен на генетична диференциация (в границата от 7.926 за двойката популации Кърджали и Монтана до 117.403 за двойката популации Бъзовец и Монтана).

Изчислените нива на полиморфизъм бяха между 83.33% при популациите Печковец, Вехтово и Васил Левски и 100% в останалите. Средната изчислена стойност за полиморфизма в проучваните пчелни популации беше значително висока – 97.62%. Данните относно изчислените нива на полиморфизъм в проучваните пчелни популации са представени в Таблица 4.

**Таблица 4.** Процент на полиморфните локуси (липса на полиморфизъм при фиксиран алел)

Популация	%P	Популация	%P
<b>Печковец</b>	83.33%	<b>Еленово</b>	100.00%
<b>Ралево</b>	100.00%	<b>Виница</b>	100.00%
<b>Торос</b>	100.00%	<b>Бъзовец</b>	100.00%
<b>Каварна</b>	100.00%	<b>Монтана</b>	100.00%
<b>Г. Киселово</b>	100.00%	<b>Вехтово</b>	83.33%
<b>Кърджали</b>	100.00%	<b>М.Конаре</b>	100.00%
<b>Сливен</b>	100.00%	<b>В.Левски</b>	83.33%
<b>Димовци</b>	100.00%	<b>Татари</b>	100.00%
<b>Селище</b>	100.00%	<b>Руец</b>	100.00%
<b>Ябланово</b>	100.00%	<b>Пловдив</b>	100.00%
<b>П. Каравелово</b>	100.00%		
<b>Средна стойност</b>	97.62%		
<b>SE</b>	1.30%		

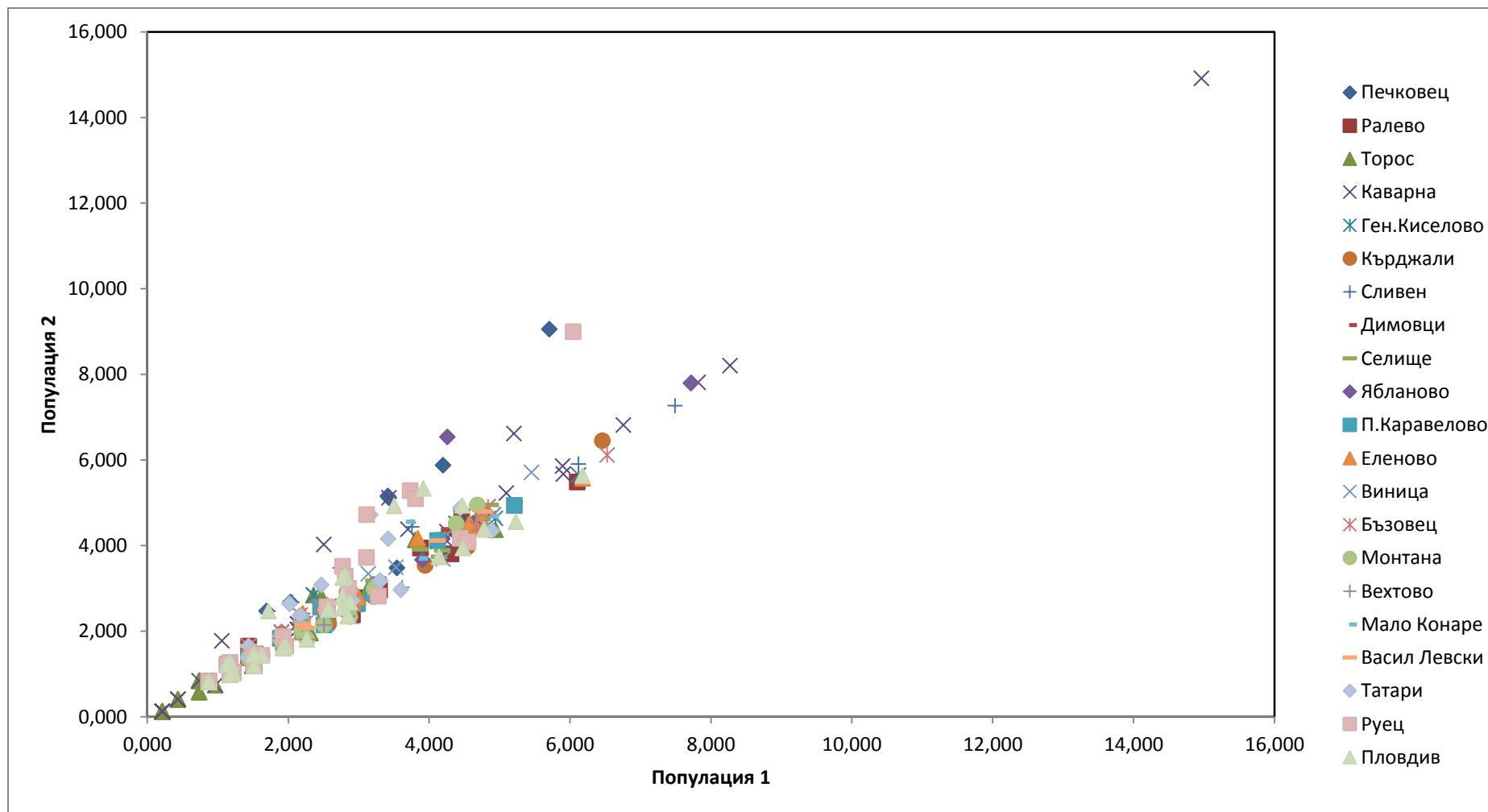
Получените данни сочат ниски стойности на генетична дистанция по Nei (1972) между изследваните пчелни популации – от 0.001 (между Вехтово и Ралево, Монтана и Бъзовец, Васил Левски и Мало Конаре) до 0.028 (между Монтана и Еленово). Стойности за генетична идентичност варират между 0.999 и 0.973.

За сравнително характеризиране нивото на принадлежност и сходство на индивидите от проучваните популации помежду им, беше използван асигнационен тест. Процентът на коректно разпределените индивиди във всяка популация е представен в Таблица 5, от която е видно, че принадлежност към същата популация е характерна за общо 14% от индивидите. Най-нисък процент на коректно разпределение бе констатиран в популациите Ралево (2.2%), Сливен и Бъзовец (2.9%), а най-висок процент – в популациите Мало Конаре (35.3%) и Монтана (29.4%).

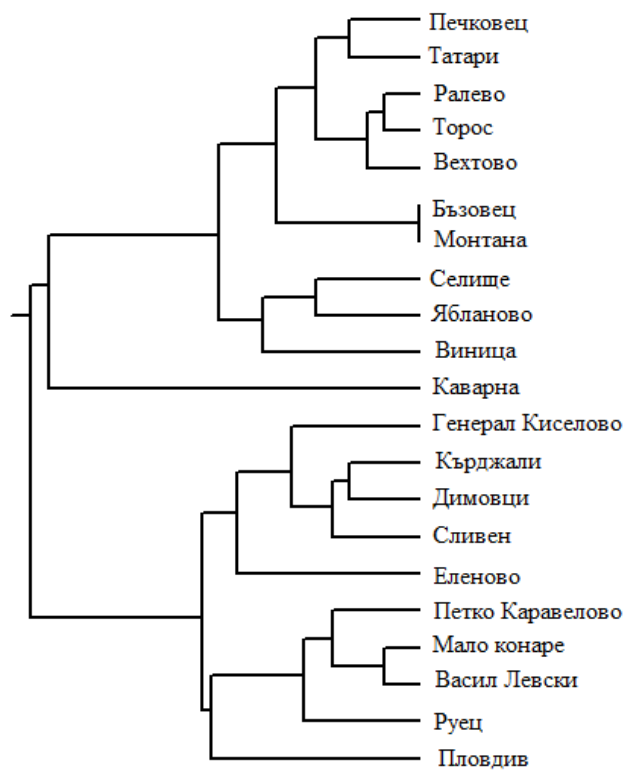
Обобщено графично изображение на получените резултати за разпределение на индивидите сред анализирани популации е представено на Фигура 16, а филогенетичните UPGMA и NJ зависимости между тях са представени на Фигури 17 и 18.

**Таблица 5.** Коректно разпределение на индивидите в популациите – принадлежност към същата и към друга популация

Популация	Брой и % на индивидите с принадлежност към същата популация	Брой и % на индивидите с принадлежност към друга популация	Общ брой
Печковец	3 (6.5%)	43 (93.5%)	46
Ралево	1 (2.2%)	45 (97.8%)	46
Торос	5 (7.4%)	63 (92.6%)	68
Каварна	13 (18.6%)	57 (81.4%)	70
Ген.Киселово	4 (11.8%)	30 (88.2%)	34
Кърджали	7 (20%)	28 (80%)	35
Сливен	1 (2.9%)	33 (97.1%)	34
Димовци	5 (14.3%)	30 (85.7%)	35
Селище	6 (17.6%)	28 (82.4%)	34
Ябланово	4 (11.4%)	31 (88.6%)	35
П.Каравелово	5 (14.7%)	29 (85.3%)	34
Еленово	8 (23.5%)	27 (76.5%)	34
Виница	6 (17.6%)	28 (82.4%)	34
Бъзовец	1 (2.9%)	34 (97.1%)	35
Монтана	10 (29.4%)	24 (70.6%)	34
Вехтово	4 (11.4%)	31 (88.6%)	35
Мало Конаре	12 (35.3%)	22 (64.7%)	34
Васил Левски	6 (17.1%)	29 (82.9%)	35
Татари	3 (6.5%)	43 (93.5%)	46
Руец	5 (10.9%)	41 (89.1%)	46
Пловдив	7 (15.2%)	39 (84.8%)	46
<b>Общо</b>	<b>116 (14%)</b>	<b>735 (86%)</b>	<b>851</b>



**Фигура 16.** Обобщено графично изображение на разпределението на индивидите сред анализираниите пчелни популации



Фигура 17. UPGMA дендрограма на изследваните български популации



Фигура 18. NJ дендрограма на изследваните български популации

Получените след прилагане на асигнационния тест резултати сочат изключително високо ниво на консолидация на изследваните пчелни популации. Това е резултат от продължителния и перманентен селекционен контрол на който са били подложени през годините. Такъв консолидиран селекционен материал е подходяща база за Националната програма за развъждане на местните медоносни пчели *Apis mellifera macedonoca* (тип *rodopica*).

Независимо от значимата консолидация на изследвания материал, изготвените филогенетични схеми сочат по-детайлно групирането на популациите. И двата типа дендрограми (UPGMA и NJ) демонстрират наличието на два основни кластера, първият обединяващ популациите Генерал Киселово, Кърджали, Димовци, Сливен, Еленово, Петко Каравелово, Мало Конаре, Васил Левски, Руец и Пловдив и вторият, обединяващ популациите Печковец, Татари, Ралево, Торос, Вехтово, Бъзовец, Монтана, Селище, Ябланово, Винаца и Каварна (Фигури 17 и 18).

Обобщените данни относно нивата на генетична диференциация, характеризирани чрез стойностите на фиксационните индекси, установените показатели за хетерозиготност и поток от гени, както и данните за генетична дистанция и генетична близост по отношение на включените в настоящото изследване пчелни популации потвърждават коментираните вече високи нива на консолидация.

### **Сравнителен анализ на развъдни бази, специализирани в производство на пчелни майки и на пчелни рояци**

Изследваните популации, подложени на селекционен контрол, представят бази на НРАП, специализирани за производство на пчелни майки и на пчелни рояци. Към първата група (производство на пчелни майки) се отнасят популациите Печковец, Ралево, Торос, Генерал Киселово, Кърджали, Димовци, Селище, Петко Каравелово, Винаца, Мало Конаре, Руец и Пловдив, а към втората (производство на пчелни рояци) – популациите Каварна, Сливен, Ябланово, Еленово, Бъзовец, Монтана, Вехтово, Васил Левски и Татари. Сравнителното проучване на популационно-генетичните показатели при тези две групи показва близки стойности. Би могло да се обобщи, че установеният среден брой алели за локус, средният брой на ефективните алели, средните стойности на наблюдаваната и очаквана хетерозиготност при пчелните популации от развъдните бази, специализирани в производство на пчелни майки, са по-високи от изчислените за базите – производителки на рояци (Таблица 6), което макар и в слаба степен, демонстрира и по-висок селекционен потенциал по отношение на майкопроизводителните бази. При всички изследвани популации (с изключение на Татари), стойностите на очакваната хетерозиготност бяха по-високи от тези на наблюдаваната, което е резултат от селекционните мероприятия, провеждани сред тях. Не бе констатирана значима разлика между средния брой алели за локус (2.296 и 2.278) и броя ефективни алели (1.461 - 1.414). Броят ефективни алели се определя от броя алели с еднакви честоти ( $Ne = 1/(1-H_{exp})$ ). Следва да се има предвид, че алелите с ниски честоти рядко са част от групата на ефективните алели, така че несъответствието между показателите  $N_a$  и  $N_e$  на практика дава информация за присъствието на алели с по-ниска честота на срещане в популацията.

F статистиката за двете сравнявани групи показва по-ниски стойности за  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  и  $F_{ST}$  при пчелните популации от развъдните бази, специализирани в производство на рояци, за разлика от установените за базите – производителки на пчелни майки (Таблица 7). Стойностите на инбридинг коефициента  $F_{IS}$  не са високи (0.226 и 0.164) и за двете групи популации, което демонстрира и не високи нива на близкородствено кръстосване. В този аспект, данните от таблицата, свързани с  $F_{IS}$  сочат по-високо ниво



на инбридинг при популациите от базите – производителки на пчелни майки. Нивата на  $F_{IS}$  са в корелация и с не-високите средни нива на  $F_{IT}$  – 0.253 и 0.188, което показва, че в тези популации има дефицит на хетерозиготи от порядъка на 25% за базите – производителки на пчелни майки и 18.8% – за базите – производителки на пчелни рояци. Макар и с малко по-висока стойност в популациите от майкопроизводствените бази,  $F_{ST}$  демонстрира общо ниска степен на генетична диференциация по отношение на всички изследвани български популации (0.033 и 0.028), подложени на селекционен контрол.

**Таблица 6.** Среден брой алели за локус, среден брой ефективни алели, средни стойности на наблюдавана и очаквана хетерозиготност при пчелни популации от развъдните бази, специализирани в производство на пчелни майки и рояци

		<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>
<b>За пчелни майки</b>	<b>Средно</b>	2.296	1.461	0.221	0.247
	<b>SE</b>	0.073	0.069	0.030	0.028
<b>За пчелни рояци</b>	<b>Средно</b>	2.278	1.414	0.211	0.241
	<b>SE</b>	0.057	0.048	0.025	0.022

**Таблица 7.** Средни стойности на  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  и  $F_{ST}$  и  $Nm$  при пчелни популации от развъдните бази, специализирани в производство на пчелни майки и рояци

		$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$Nm$
<b>За пчелни майки</b>	<b>Средно</b>	0.226	0.253	0.033	7.854
	<b>SE</b>	0.098	0.092	0.004	0.758
<b>За пчелни рояци</b>	<b>Средно</b>	0.164	0.188	0.028	9.523
	<b>SE</b>	0.084	0.082	0.004	1.579

Средното ниво на потока от гени ( $Nm$ ) при популациите от базите – производителки на пчелни майки и рояци бе 7.854 и 9.523 съответно, което отново демонстрира ниски нива на генетична диференциация.

**Сравнение на пчелните популации *Apis mellifera macedonica*, тип *rodopica*, подложени на селекционен контрол с другите изследвани български популации**

Популации медоносни пчели от територията на страната са проучвани с цел характеризирани на популационно-генетичните им параметри чрез прилагане на разнообразни генетични подходи, включително и изоензимен анализ (Ivanova 2015). В настоящото проучване от интерес се оказва сравнението им с подложените на селекционен контрол популации на *Apis mellifera macedonica*, тип *rodopica*. Данните за изявения полиморфизъм по шестте проучвани локуса в над 120 популации с различни местообитания в България демонстрираха наличие на общо 23 алела – 3 алела по MDH-1, HK и ALP локуса, четири алела по ME и PGM локусите и шест алела по EST-3 локуса. В генофонда на подложените на селекционен контрол популации не бе открито

присъствието на алелите ME<sup>115</sup>, PGM<sup>125</sup> и EST-3<sup>105</sup>. В същото време, в три от тези популации бе констатирано наличие на четвърти хексокиназен алел – НК<sup>121</sup>.

По отношение сравнителния анализ, характеризиращ нивата на полиморфизъм и хетерозиготност, направи впечатление фактът, че за отглежданите без прилагане на целенасочени селекционни мероприятия пчелни популации нивата на полиморфизъм по критерий 0.95 варират от 50% до 83% и рядко достигат 100% (Ivanova 2015), а за подложените на селекционен контрол популации от типа *rodopica* нивото на полиморфизъм варира от 50% до 100% – Таблица 9.

Нивата на наблюдавана и очаквана хетерозиготност за двете сравнявани групи бяха сходни – от порядъка на 0.200 – 0.250. Установената средна стойност на  $F_{ST}$  за пчелните популации от типа *rodopica* бе 0.029 – значително сходна със стойността на  $F_{ST}$ , установена за популациите на територията на страната – 0.025 (Ivanova, 2015), което показва, че 2.56% – 2.9% от установената генетична изменчивост е между популациите и 97.44% – 97.1% е вътре популационна.

### **Сравнителен анализ на *Apis mellifera macedonoca* (тип *rodopica*) и *Apis mellifera carnica*, подложени на селекционен контрол**

Освен популациите български медоносни пчели, включени в Националната селекционна програма, в проучването бяха използвани и линии медоносни пчели от Косово, таксономично определени на базата на класически морфометричен анализ като подвид *A. m. carnica*. При статистическата обработка, за по-детайлно сравнение, бяха допълнително използвани референтни данни от по-рано публикувани резултати за алоензимни популационно-генетични характеристики на селекционно контролирани популации *A. m. carnica* от Сърбия. От групата на българските популации *Apis mellifera macedonoca* (тип *rodopica*), в сравнителния анализ бяха включени 7 принадлежащи на следните развъдни бази на НРАП: Печковец; Ралево; Сливен; Бъзовец; Татари; Ябланово и Пловдив.

Данните за констатирания полиморфизъм и честотите на алелните варианти по проучваните ензимни локуси за всяка популация са представени в Таблица 8, а данни за среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена (Ho) и очаквана (He) хетерозиготност – в Таблица 9.

Както е видно от таблицата, българските популации се характеризират със значително по-висок процент на полиморфизъм, за разлика от *A. m. carnica* популациите. Като цяло може да се отчете също и сравнително по-ниското ниво на хетерозиготност при популациите от Косово и Сърбия, за разлика от българските популации. Средният брой алели за локус бе  $\leq 2$  за всички косовски популации, 2.2 – за сръбските популации и варираше между 2.0 (Пловдив) и 2.7 (Ябланово) за включените в сравнението български популации.

По отношение полиморфизма на анализирания ензимни локуси в пчелните популации от България и от Косово, изчислената стойност на  $F_{ST}$  варираше от 0.014 (за EST-3 локуса) до 0.052 (за ME локуса) – Таблица 10.

За двойките пчелни популации от България и от Косово изчислената стойност на  $F_{ST}$  варираше от 0.005 (между българските популации Бъзовец и Ралево и между косовските линии К-II и К-III) до 0.04 (между популациите Сливен и К-IV), 0.044 (между популациите Пловдив и К-III) и 0.048 (между Пловдив и К-IV) – Таблица 11. Представените в таблицата данни показват ясно по-високи нива на генетична диференциация между българските и косовските популации, за разлика от по-ниското ниво на генетична диференциация вътре в двете сравняваните групи – *A. m. macedonica* (тип *rodopica*) и *A. m. carnica*.

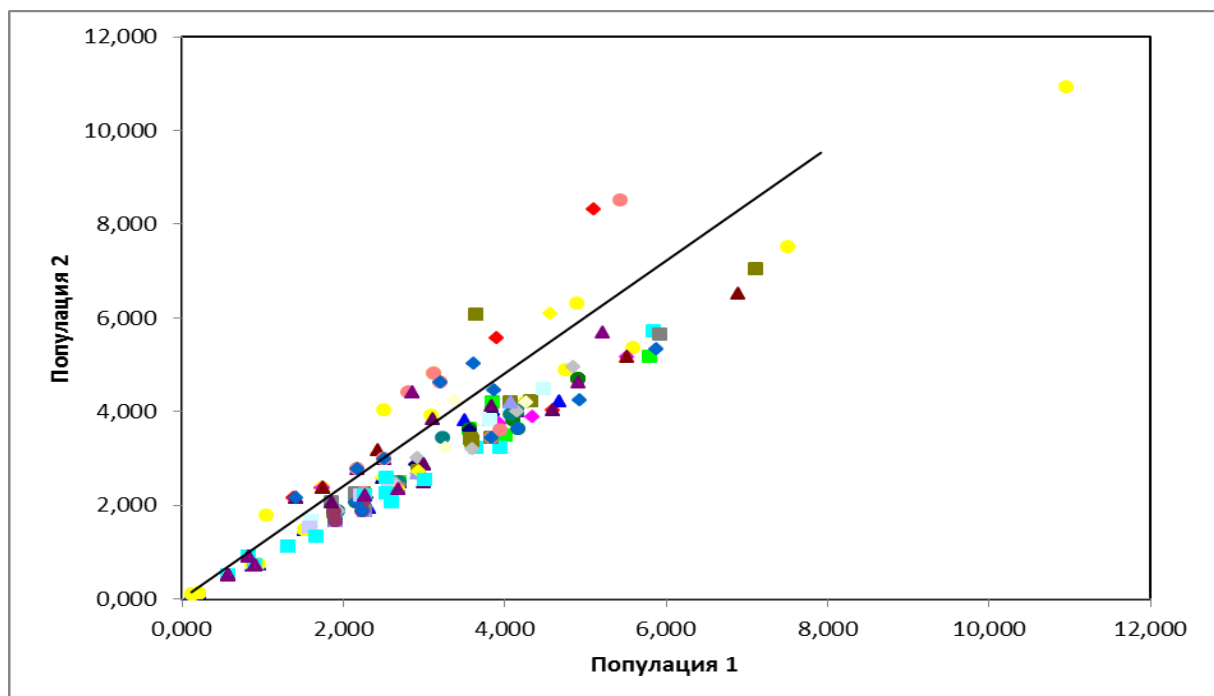
При проведения сравнителен анализ на популации от *A. m. macedonica* (тип *rodopica*) и *A. m. carnica* средната изчислена стойност за потока на гени ( $Nm$ ) бе 8.284. За отделните анализирани ензимни локуси той варираше между 4.517 (за ME локуса) и 17.299 (за EST-3 локуса) – Таблица 10. Високите стойности ( $Nm > 2$ ) на показателя  $Nm$  по отношение на двете сравнявани групи популации намира обяснение във факта, че същите дългогодишно са били под селекционен контрол.

Графично представяне на коректното разпределение на индивидите сред изследваните групи популации на двата сравнявани подвида е показано на Фигура 19.

Филогенетичните зависимости, между българските и косовските популации, подложени на селекционен контрол и определени на базата на UPGMA и NJ методите са представени на Фигури 20 и 21.

Както се вижда от данните на приложени асигнационен тест, двете групи популации са ясно отличими. Това съвпада с получените резултати относно изчислените генетични дистанции и генетична близост по Nei (1972), които показват по-високи стойности на отдалеченост между българските и косовските популации – Таблица 12. От таблицата е видно, че генетичната дистанция между изследваните популации *A. m. macedonica* (тип *rodopica*) и *A. m. carnica* варира от 0.001 до 0.037 и е най-голяма между популациите Пловдив и К-IV и Сливен и К-IV (0.037).

По-детайлното групиране по кластери и субкластери в двата вида дендрограми показва интересни зависимости между изследваните “*rodopica*” и “*carnica*” популации. Независимо от факта, че косовските популации морфометрично са определени като *A. m. carnica*, е очевидно че по биохимико-генетични показатели същите се доближават до българските (Фигури 20 и 21). Тези резултати допълват установените от Peseva et al. (2015) данни за съществуващи различия между сравняваните “*carnica*” популации с произход от Сърбия, Черна гора и Косово.



**Фигура 19.** Обобщено графично изображение на разпределението на индивидите сред анализирани пчелни популации *A. m. macedonica* (тип *rodopica*) и *A. m. carnica*: Популация 1 – българските популации; Популация 2 – косовските популации (в сравнението са включени всичките анализирани български популации)

**Таблица 8.** Алели и алелни честоти в изследваните българските популации *Apis mellifera macedonosa* (тип *rodopica*) и популации *A. m. carnica* от Косово и Сърбия

Локус Алел	К I	К II	К III	К IV	К V	К VI	С I	С II	Пч	Рл	Сл	Яб	Бз	Тт	Пл
<b>MDH-1</b>	54	54	54	53	53	54	54	53	46	46	34	35	35	46	46
<b>65</b>	0.389	0.472	0.519	0.698	0.509	0.481	0.600	0.432	0.522	0.446	0.324	0.514	0.571	0.467	0.337
<b>80</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000	0.054	0.000
<b>100</b>	0.611	0.528	0.481	0.302	0.491	0.519	0.400	0.500	0.478	0.554	0.676	0.429	0.429	0.478	0.663
<b>125</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.068	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>ME</b>	54	54	54	53	53	54	54	53	46	46	34	35	35	46	46
<b>90</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.043	0.033	0.029	0.000	0.029	0.011	0.000
<b>100</b>	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.935	0.935	0.971	0.929	0.971	0.946	0.859
<b>106</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.033	0.000	0.071	0.000	0.043	0.141
<b>PGM</b>	54	54	54	53	53	54	54	53	46	46	34	35	35	46	46
<b>80</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.065	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
<b>100</b>	0.972	1.000	1.000	0.962	0.925	0.963	0.895	0.875	0.859	0.891	0.971	0.871	0.886	0.891	0.902
<b>114</b>	0.028	0.000	0.000	0.038	0.075	0.037	0.105	0.125	0.076	0.109	0.029	0.114	0.114	0.109	0.098
<b>HK</b>	54	54	54	53	53	54	54	53	46	46	34	35	35	46	46
<b>87</b>	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.028	0.000	0.000	0.065	0.011	0.059	0.000	0.000	0.076	0.087
<b>100</b>	0.981	0.991	1.000	0.972	1.000	0.972	0.890	0.879	0.913	0.967	0.853	0.957	0.957	0.924	0.913
<b>110</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.094	0.087	0.022	0.022	0.088	0.043	0.043	0.000	0.000
<b>121</b>	0.019	0.009	0.000	0.009	0.000	0.000	0.016	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>EST-3</b>	54	54	54	53	53	54	54	53	46	46	34	35	35	46	46
<b>80</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.027	0.000	0.000	0.022	0.029	0.000	0.014	0.000	0.000
<b>88</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000
<b>94</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000
<b>100</b>	0.991	0.944	0.981	0.953	0.972	0.972	0.947	0.925	1.000	0.978	0.956	0.943	0.971	0.967	0.935
<b>105</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.065
<b>118</b>	0.009	0.056	0.019	0.047	0.019	0.028	0.026	0.075	0.000	0.000	0.000	0.029	0.014	0.033	0.065
<b>ALP</b>	54	54	54	53	53	54	52	40	46	46	34	35	35	46	46
<b>80</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.500	0.576	0.382	0.500	0.500	0.511	0.489
<b>90</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.423	0.300	0.000	0.000	0.044	0.000	0.043	0.000	0.000
<b>100</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.577	0.600	0.500	0.424	0.574	0.500	0.457	0.489	0.511

**Таблица 9.** Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена ( $H_o$ ) и очаквана ( $H_e$ ) хетерозиготност по отношение на сравняваните българските популации *Apis mellifera macedonosa* (тип *rodopica*) и популации *A. m. carnica* от Косово и Сърбия (стандартната грешка е включена)

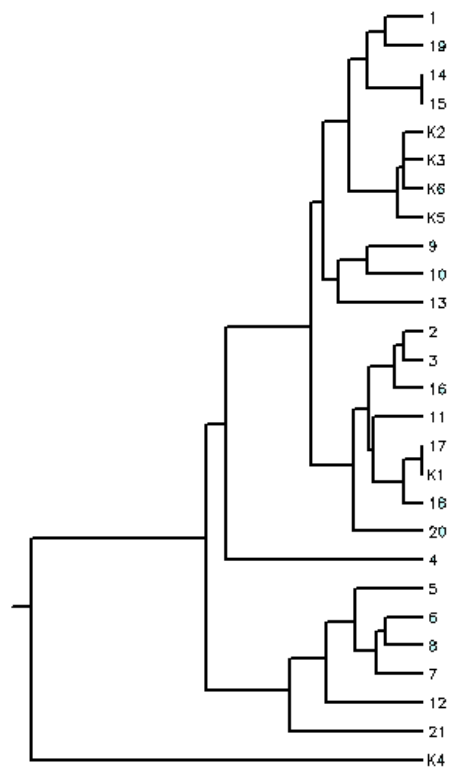
Популация	Среден брой алели за локус	Процент полиморфни локуси			$H_o$	$H_e$
		p=0.95	p=0.99	p=1		
К I	1.8 ± 0.2	20	60	80	0.126±0.094	0.121±0.089
К II	1.6 ± 0.2	40	40	60	0.189±0.158	0.126±0.097
К III	1.4 ± 0.2	20	40	40	0.163±0.154	0.108±0.099
К IV	2.0 ± 0.3	40	80	80	0.121±0.090	0.134±0.087
К V	1.8 ± 0.4	40	60	60	0.121±0.098	0.140±0.095
К VI	1.8 ± 0.2	20	80	80	0.169±0.149	0.148±0.091
С I	2.2 ± 0.4	83.33	100	100	0.228±0.115	0.195±0.081
С II	2.2 ± 0.4	83.33	100	100	0.246±0.127	0.229±0.093
Пч	2.3 ± 0.3	83.33	83.33	83.33	0.207±0.109	0.256±0.084
Рл	2.3 ± 0.2	66.67	100	100	0.221±0.110	0.234±0.084
Сл	2.5± 0.2	50	100	100	0.216±0.079	0.237±0.084
Яб	2.7± 0.2	83.33	100	100	0.248±0.108	0.276±0.081
Бз	2.3 ± 0.2	50	100	100	0.195±0.085	0.237±0.091
Тт	2.3 ± 0.2	83.33	100	100	0.301±0.120	0.258±0.086
Пв	2.0± 0.0	100	100	100	0.246±0.083	0.274±0.065

**Таблица 10.** Средни стойности на очакваната ( $H_e$ ) и наблюдаваната ( $H_o$ ) хетерозиготност за отделните изследвани локуси, F статистика и поток на гени  $Nm$  в пчелните популации от България и от Косово

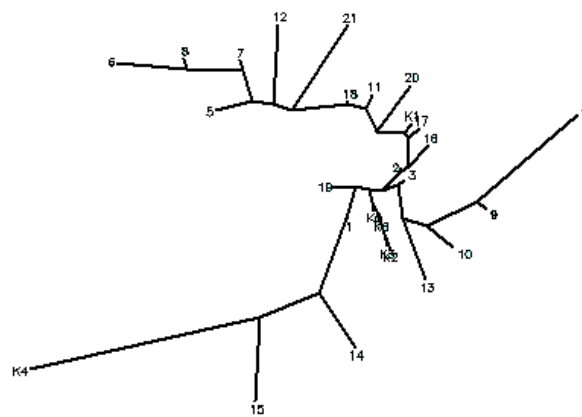
Локус	Средна $H_e$	Средна $H_o$	$F_{is}$	$F_{it}$	$F_{st}$	$Nm$
MDH-1	0.489	0.568	-0.161	-0.118	0.037	6.500
ME	0.065	0.032	0.501	0.527	0.052	4.517
PGM	0.119	0.066	0.445	0.462	0.032	7.685
HK	0.097	0.050	0.488	0.511	0.044	5.418
EST-3	0.064	0.067	-0.042	-0.027	0.014	17.299
Средни стойности	0.167	0.157	0.246	0.271	0.036	8.284
SE	0.022	0.027	0.143	0.141	0.006	2.315

Таблица 11. *F<sub>ST</sub>* стойности за изследваните двойки популации *A. m. macedonica* (тип *rodopica*) и *A. m. carnica*

	Печковец	Ралево	Сливен	Ябланово	Бъзовец	Татари	Пловдив	К I	К II	К III	К IV	К V	К VI	
Печковец	0.000													Печковец
Ралево	0.007	0.000												Ралево
Сливен	0.020	0.016	0.000											Сливен
Ябланово	0.012	0.013	0.017	0.000										Ябланово
Бъзовец	0.008	0.005	0.023	0.012	0.000									Бъзовец
Татари	0.006	0.006	0.018	0.009	0.008	0.000								Татари
Пловдив	0.021	0.016	0.020	0.019	0.029	0.011	0.000							Пловдив
К I	0.021	0.013	0.015	0.026	0.018	0.019	0.031	0.000						К I
К II	0.028	0.021	0.023	0.026	0.022	0.024	0.037	0.010	0.000					К II
К III	0.026	0.021	0.027	0.028	0.020	0.025	0.044	0.010	0.005	0.000				К III
К IV	0.024	0.025	0.040	0.022	0.013	0.020	0.048	0.028	0.019	0.018	0.000			К IV
К V	0.017	0.010	0.025	0.022	0.009	0.014	0.033	0.010	0.013	0.013	0.015	0.000		К V
К VI	0.016	0.011	0.017	0.019	0.011	0.011	0.027	0.005	0.008	0.009	0.013	0.006	0.000	К VI
	Печковец	Ралево	Сливен	Ябланово	Бъзовец	Татари	Пловдив	К I	К II	К III	К IV	К V	К VI	



**Фигура 20.** UPGMA дендрограма на сравняваните български (1 – 21) и косовски (K1 – K6) популации



**Фигура 21.** NJ дендрограма на сравняваните български (1 – 21) и косовски (K1 – K6) популации

Таблица 12. Генетична дистанция по Nei, 1972 за изследваните популации *A. m. macedonica* (тип *rodopica*) и *A. m. carnica*

	Печковец	Ралево	Сливен	Ябланово	Бъзовец	Татари	Пловдив	К I	К II	К III	К IV	К V	К VI	
Печковец	0.000													Печковец
Ралево	0.003	0.000												Ралево
Сливен	0.014	0.008	0.000											Сливен
Ябланово	0.004	0.006	0.014	0.000										Ябланово
Бъзовец	0.002	0.004	0.019	0.004	0.000									Бъзовец
Татари	0.002	0.002	0.012	0.004	0.003	0.000								Татари
Пловдив	0.014	0.007	0.007	0.017	0.020	0.009	0.000							Пловдив
К I	0.007	0.002	0.004	0.009	0.010	0.005	0.007	0.000						К I
К II	0.006	0.004	0.009	0.005	0.006	0.004	0.011	0.002	0.000					К II
К III	0.004	0.004	0.013	0.004	0.004	0.004	0.015	0.004	0.001	0.000				К III
К IV	0.010	0.017	0.037	0.009	0.005	0.012	0.037	0.022	0.012	0.008	0.000			К IV
К V	0.003	0.002	0.013	0.005	0.002	0.002	0.013	0.004	0.002	0.001	0.009	0.000		К V
К VI	0.003	0.002	0.009	0.004	0.004	0.002	0.011	0.002	0.001	0.001	0.011	0.001	0.000	К VI
	Печковец	Ралево	Сливен	Ябланово	Бъзовец	Татари	Пловдив	К I	К II	К III	К IV	К V	К VI	



Както вече бе отбелязано, след 1999 г. Министърството на земеделието и горите възлага на Националната Развъдна Асоциация по Пчеларство (НРАП) реализирането на селекционна програма, насочена към типизиране (изчистване) чрез „поглъщане” на метизираните пчелни семейства от чисторасови български пчели и преминаване към чистопордното им развъждане. Основната цел на тази програма е консервация на генофонда на българската медоносна пчела. В този аспект са и провежданите у нас морфо-етологични (Петров 1990; 1993; 1997), биохимико-генетични (Ivanova et al. 2007; 2010; 2011) и частични молекулярно генетични проучвания (Ivanova and Bouga 2009; Ivanova et al. 2010; Nikolova 2011). Настоящото проучване е съществен етап от комплексно генетично изследване на българските медоносни пчели, целящо да характеризира популационно-генетичните изоензимни параметри на популации от местната българска медоносна пчела *A. m. macedonica* (тип *rodopica*), подложена на дългогодишен селекционен контрол и обект на Национална селекционна програма за развъждане. По данни на Ruttner (1988), базирани на класически морфометричен анализ на територията на България е разпространена *A. m. macedonica*. Според Петров (1990) и Петров и Умран (2004), местните за България медоносни пчели (именувани от него като *A. m. rodopica*) притежават група характеристики, по които се различават, както от популации на *A. m. macedonica*, така и от *A. m. carnica*, широко разпространена на територията на Европа и отглеждана в Сърбия, Хърватска, Словения, Чехия, Полша, Германия и др.. В предхождащи проучвания, на базата на популационно-генетични изоензимни анализи, популации медоносни пчели от различни територии на България, неконтролирани селекционно, бяха сравнени с *A. m. macedonica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica* (Petrov and Ivanova 2009; Ivanova 2010; Ivanova et al. 2011) и се установи, че те са в общ кластер с *A. m. macedonica*, макар и формиращи два субкластера и различаващи се по някои изоензимни характеристики. Отделно от това, проведен митохондриален ДНК анализ на популации български медоносни пчели показва липса на установения от Bouga et al. (2005a) диагностичен за *A. m. macedonica*, разпространен в Гърция ДНК маркер, което с основание се коментира като отличителна характеристика на българските пчели (Ivanova and Bouga 2009; Ivanova et al. 2010).

**За пръв път настоящото изследване предоставя информация за популационно-генетичния полиморфизъм по 6 ензимни локуси в популации български медоносни пчели, подложени на дългогодишен селекционен контрол и използвани като обект на целенасочена национална програма за развъждане като ги сравнява, както с други български популации, неподлагани на селекционни мероприятия, така и със селекционно контролирани популации на подвида *A. m. carnica*.**

Анализираната извадка от индивидуални проби (общо 851, всички от селекционно контролирани бази на НРАП, включително селекционния център на Аграрен Университет – Пловдив и ген-банката на НРАП в района на гр. Сливен) дава основания за обективен анализ на получените резултати. Именно пчелните популации от майкопроизводствените станции на НРАП са база за работа по Национална селекционна програма. Анализът на расовите характеристики на българските медоносни пчели *A. m. macedonica* (тип *rodopica*) не би бил пълен, ако в сравнителните анализи не са включени популации от други подвидове на *Apis mellifera* и то такива, които са били подложени за дълъг период на селекционен контрол и включени в селекционни мероприятия. В нашето изследване ние използвахме като референтна информация данни от селекционно контролирани популации (линии) от подвида *A. m. carnica* с произход от територията на Косово и Сърбия. Както вече бе отбелязано, настоящото проучване констатира наличие на полиморфизъм с дву-, три-, четири- и петалелна система на унаследяване по отношение на изследваните 6 ензимни локуси.

Наличието на частни алели в популациите е показател за техните индивидуални особености или различия. За частни се приемат алелите, които са открити само в определена (конкретна) популация. По отношение на българските популации *A. m. macedonica* (тип *rodopica*) не бе констатирано наличие на частни алели, което е резултат от прилагания дългогодишен селекционен контрол и множеството селекционни мерки, водещи до значима консолидация на използвания селекционен материал. При анализа на сравнителните резултати, обаче бе установено наличието на три частни алела, характерни само за българските популации: EST-3<sup>88</sup> с честота 0.029 в генофонда на популация Ябланово, EST-3<sup>94</sup> с честота 0.015 в генофонда на популация Сливен и EST-3<sup>105</sup> с честота 0.065 в генофонда на популация Пловдив. При сравнителния анализ на двете групи популации – „*rodopica*“ и „*carnica*“, от значение се оказва фактът, че алелът MDH-1<sup>80</sup> присъстваше само в генофонда на българските популации и липсваше в генофонда на популациите от Косово и Сърбия. Един частен алел MDH-1<sup>125</sup> с честота 0.068 бе констатиран в сръбската популация С II. Само в генофонда на изследваните български популации присъстваха алелите ME<sup>90</sup> и ME<sup>106</sup>, докато в генофонда на всички *A. m. carnica* популации ME<sup>100</sup> алелът беше фиксиран (честота 100%).

При характеризирани генофонда на популациите от голямо значение са алелите, които се откриват с най-висока честота. В това отношение би могло да се отбележи, че алелите с най-висока честота на срещане в генофонда на изследваните български популации бяха: MDH-1<sup>100</sup>, ME<sup>100</sup>, PGM<sup>100</sup>, HK<sup>100</sup> и EST-3<sup>100</sup>. Алелите на ALP локуса (ALP<sup>80</sup> и ALP<sup>100</sup>) преобладаваха като честота на срещане в генофонда на една или друга от българските популации. Анализът на резултатите по отношение на най-често срещаните алели при изследваните *A. m. carnica* популации от Косово и Сърбия показва следното: фиксиране на ME<sup>100</sup> алела във всички *carnica* популации, на PGM<sup>100</sup> и на HK<sup>100</sup> – в част от косовските популации; по-висока честота срещане на ALP<sup>100</sup> алела в генофонда на сръбските популации. По отношение на по-редките алели, прави впечатление фактът, че HK<sup>121</sup> е характерен за болшинството популации *A. m. carnica* от Косово и Сърбия и липсва в генофонда на изследваните български популации, с изключение на Торос, Каварна и Васил Левски.

Като диагностични могат да се определят алелите, които показват големи различия в честотите на срещане за различните популации. Диагностични алели могат да се открият, както сред тези с висока честота на срещане, така и сред по-рядко срещаните в генофонда на популациите алели. Търсенето на диагностични алели сред по-широко разпространените в популацията се приема за успешно, ако тези алели се откриват в една популация и липсват в друга. Диагностичните алели трябва да са с честота по-висока от 5%. Алели с по-малка честота може също да отсъстват в една популация и да присъстват в друга, но причина за ниската им честота може да е големината на извадката, например. В тези случаи въпросните алели не се обсъждат като диагностични. В този смисъл, два от общо четирите обсъждани частни алели за една българска (EST-3<sup>105</sup>) и една сръбска популации (MDH-1<sup>125</sup>) могат да се приемат за диагностични, тъй като честотата им е по-висока от 0.05. Като диагностичен може да се приемат и ME<sup>106</sup>, тъй като честотата му в част от българските популации е по-голяма от 0.05. От алелите с по-висока честота на срещане в изследваните пчелни популации заслужават внимание коментираните по-горе, които отличават българските пчели *A. m. macedonica* (тип *rodopica*) от *A. m. carnica*.

Настоящото проучване представя обстойна информация за получените и очаквани стойности на хетерозиготност по изследваните ензимни локуси за всяка от популациите, както и за средните стойности по този показател. Хетерозиготността, разглеждана като мярка за генетично разнообразие, е удобен параметър за

характеризиране на генетичната изменчивост (Ting Ji and Cohong, 2011). В нашето изследване анализираниите ензимни локуси демонстрират сравнително по-висока степен на изменчивост в проучваните български популации в сравнение с *A. m. carnica* популациите. Литературните данни относно нивата на хетерозиготност и при други подложени на селекционен контрол популации от подвида *A. m. carnica* показват сходни резултати (Ivanova et al. 2011; 2012).

В настоящото изследване, в хода на сравнителния анализ, най-ниско ниво на наблюдавана хетерозиготност (0.121) бе отчетено при две от косовските *carnica* популации (К V и К VI), а най-високо (0.301) – при българската популация Татари. Очакваната хетерозиготност варираше от 0.108 в популацията К III до 0.276, в българската популация от Ябланово (Таблица 9). В популационно-генетичните изследвания, високите нива на генетична изменчивост се свързват с относително висок селекционен потенциал и в тази връзка, по-високите нива на хетерозиготност и полиморфизъм при българските популации демонстрират и по-висок селекционен потенциал. Получените в настоящото изследване резултати относно нивото на хетерозиготност между индивидите в отделните субпопулации ( $F_{is}$ ), нивото на хетерозиготност в общата популация ( $F_{IT}$ ) и степента на генетична диференциация между отделните субпопулации в общата популация ( $F_{st}$ ) носят допълнителна информация за ниските нива на генетична диференциация сред изследваните български популации (Таблица 10). Това е така, защото получените резултати показват  $F_{st}$  стойности  $< 0.05$ , което според Hartl and Clark (2007) е доказателство за слаби генетични различия. От друга страна,  $Nm$  стойностите, предоставящи информация относно близостта или различията между изследваните популации в резултат от потока на гени са значително високи ( $>2$ ). Анализът сочи, че за всички български популации стойността на  $Nm$  е по-висока от 2 по отношение на изследваните ензимни локуси, което демонстрира ниска степен на генетична диференциация (Таблица 10). Констатираните високи стойности на потока от гени  $Nm$  са значим показател за наличие на селекционен контрол и доказателство за дългогодишно провеждани селекционни мероприятия с изследваните български популации.

След прилагането на асигнационен тест с цел отчитане степента на принадлежност на анализираниите български популации едни към други се отчете висок процент на принадлежност към друга популация, което е резултат от провежданата селекционна дейност и високите нива на консолидация на изследваните български пчелни популации. От друга страна, прилагането на асигнационния тест по отношение на сравнителния анализ с популациите на *A. m. carnica* от Косово показва ясно разграничаване на двете групи.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ИЗВОДИ

Проведеният в хода на настоящото изследване анализ предоставя информация за генетичния полиморфизъм и нивото на генетична диференциация и консолидация в популациите *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), подложени на селекционен контрол и използвани като обект на Националната програма за развъждане на медоносните пчели в България.

Получените резултати, направените анализи и проведеното на тяхната база обсъждане дават основание за формулиране на следните основни изводи:

1. Установено е, че шестте анализирани ензимни локуси са полиморфни в изследваните популации с три-, четири- и пет алелна система на унаследяване и за тях е отчетено наличието на общо 21 алелни варианти;
2. Констатирано е средно ниво на полиморфизъм от порядъка 97.62% и на обща средна стойност на очаквана и наблюдавана хетерозиготност за всички изследвани български популации, подложени на селекционен контрол от порядъка на 0.247 и 0.217, съответно;
3. Данните за фиксационния индекс  $F_{ST}$  и потока от гени  $Nm$  в изследваните българските популации сочат ниски нива на генетична диференциация;
4. Не са констатирани високи стойности на инбридинг коефициента  $F_{IS}$ , което демонстрира и не високи нива на близкородствено кръстосване. На базата на изчислените средни нива на  $F_{IT}$  коефициента е установен дефицит на хетерозиготи от порядъка на 25% за майкопроизводствените бази и 18.8% – за базите – производителки на пчелни рояци;
5. Данните от проведения асигнационен тест показват ясно разграничаване на популациите *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), подложени на селекционен контрол и селекционно контролираните популации на *Apis mellifera carnica*, включени в изследването;
6. Установени и характеризирани са специфични генетични показатели, подходящи за разграничаване на популациите *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), подложени на селекционен контрол и селекционно контролирани популации на *Apis mellifera carnica*. Установените специфични генетични показатели, могат да се използват като надеждни ензимни диагностични маркери за формиране на комплексна система от мероприятия по консервацията на националните генетични ресурси от *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*);
7. Обобщените данни за нива на полиморфизъм, хетерозиготност, фиксационен индекс, поток от гени и генетична дистанция по отношение на изследваните популациите *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*) демонстрират ниско ниво на генетична диференциация, високо ниво на консолидация и общ висок селекционен потенциал.

## ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Приноси с оригинален научен и научно-приложен характер

1. За пръв път в настоящото изследване е представена информация за популационно-генетичния полиморфизъм по 6 ензимни локуси в популации български медоносни пчели, подложени на дългогодишен селекционен контрол и използвани като обект на целенасочена Национална програма за развъждане.
2. За първи път на базата на изоензимен анализ е проучен сравнително генетичния полиморфизъм и е характеризирана степента на генетична диференциация в популации български медоносни пчели, подложени на дългогодишен селекционен контрол като същите са сравнени, както с други български популации, неподлагани на селекционни мероприятия, така и със селекционно контролирани популации на подвида *A. m. carnica*.
3. За първи път са характеризирани специфични генетични показатели, подходящи за разграничаване на популациите *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), подложени на селекционен контрол и селекционно контролирани популации на *Apis mellifera carnica*.
4. За първи път на базата на ензимен генетичен анализ е установено, че за изследваните български популации *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), подложени на селекционен контрол и използвани като обект на Националната програма за развъждане на медоносните пчели в България е характерно ниско ниво на генетична диференциация, високо ниво на консолидация и общ висок селекционен потенциал.

### Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърден е многоалелен (три-, четири- и пет алелен) полиморфизъм по отношение на изследваните ензимни локуси за българските пчелни популации като цяло.
2. Потвърдено е установеното и за пчелните популации на територията на страната сравнително ниско ниво на генетична диференциация.
3. Потвърдено е, че ензимните генетични маркери са подходящи за популационно-генетични анализи на популации медоносни пчели и че могат успешно да се използват като генетични маркери

### Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд

Peseva V., Stoyanov I. Y., Andjelkovic B., Mladenovic M., Georgieva V. H., Ivanova E. N. 2015. Allozyme Analysis of Selectively Reared Populations of Honey Bee, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, in Kosovo. Acta zool. bulg., 67 (4), 567-572.

Georgieva V. H., Petrov P.P., Petkov N. G., Ivanova E. N. 2016. Genetic analysis of *Apis mellifera macedonica* (type *rodopica*) populations selectively reared for purposive production of honey bee queens in Bulgaria. Journal of BioScience and Biotechnology 5 (1), 79-85.

Georgieva V. H., Ivanova E. N., Petrov P.P., Petkov N. G., 2016. Genetic characterization of *Apis mellifera macedonica* (type “*rodopica*”) populations selectively controlled in Bulgaria. Journal of Central European Agriculture 17 (3), 620-628.

### **Презентации в научни форуми по темата на дисертацият**

Georgieva V. H., Petrov P. P., Petkov N. G., Ivanova E. N. (2015) Genetic characterization of selectively controlled for swarm production *Apis mellifera macedonica* (type *rodopica*) populations in Bulgaria. Втора Национална конференция за млади учени “Биологически науки за по-добро бъдеще” 30-31 Октомври 2015 г. Пловдив, България.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова Е. (1996). Изменчивост при *Apis mellifera* в България – онтогенетични и популационно-генетични аспекти. Дисертация за образователна и научна степен „Доктор”. Пл. Унив. Издателство.
2. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. (1977). Генетика изоферментов. М.: Наука. 275 с.
3. Петров П. 1990. Медоносные пчелы Болгарии, их характерные особенности и таксономическое положение. – Докторска дисертация, Москва, 133 с.
4. Петров П. (1993). За морфоетологичния породен стандарт на българските пчели (*Apis mellifica rodopica*), Животновъдни науки, 4, 84-88.
5. Петров П. (1995). Българската медоносна пчела *Apis mellifica rodopica* и нейния расов стандарт, Пчеларство, 5, 4-7.
6. Петров П. (1996). Принос към таксономията на Българската медоносна пчела. – Животновъдни науки, 1, 58-61.
7. Петров П., Петкова О. (1996). Възможности за използване на някои количествени признаци в таксономията на Българската медоносна пчела (*Apis mellifica rodopica*). III. Размери на коремчето - Животновъдни науки, 4, 78-79.
8. Петров П., Петкова О. (1997). Възможности за използване дължината на задното краче и тарзалния индекс в таксономията на Българската медоносна пчела *Apis mellifica rodopica*. - Животновъдни науки, 1-2, 86-87.
9. Петров П. (1997). За произхода на Българската медоносна пчела *Apis mellifica rodopica*. - Животновъдни науки, 1-2, 88-93.
10. Петров П., Василева С., Ненчев П., Иванова Т., Стоилов Н., Спасов Хр., Христов П., Башлийска В. (1999). Програма за развъдно-подобрителна работа с пчелите в България и организация на майкопроизводството, Пчелар, N 2, с. 8-10.
11. Петров П., Умран М. (2004). Морфологична характеристика на медоносната пчела *Apis mellifera* L. от източната част на Средиземноморския биогеографски район. - Н.Т. АУ, XLIX, 5-11.
12. Фридрих П., (1986). Ферменты – четвертичная структура и надмолекулярны комплексы, Москва, Мир, с. 374.
13. Badino G., Celebrano G., Manino A. (1983). Population structure and Mdh-1 locus variation in *Apis mellifera ligustica*. J. Heredity 74: 443-446.

14. Badino G., Celebrano G., Manino A., Longo S. (1985). Enzyme polymorphism in the Sicilian honeybee. *Experientia* 41: 752-754.
15. Badino G., G. Celebrano, A. Manino, M.D. Ifantidis (1988). Allozyme variability in Greek honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 19: 337-386.
16. Bouga M., Harizanis P., Kiliyas G., Alahiotis S. (2005a). Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR - RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apidologie*. 36: 335-344.
17. Bouga M., Kiliyas G., Harizanis P.C, Papatotiropoulos V., Alahiotis S. (2005b). Allozyme variability and phylogenetic relationships in honey bee (Hymenoptera: Apidae: *A. mellifera*) populations from Greece and Cyprus. *Biochem. Genet.* 43, 471-484.
18. Brueckner D., (1974). Reduction of biochemical polymorphism in honeybee (*Apis mellifera*). *Experientia*, 30(6): 618-619.
19. Contel E. P. B., M. A. Mestriner & E. Martins (1977). Genetic control and developmental expression of malate dehydrogenase in *Apis mellifera*. *Biochem. Genet.* 15: 859-876.
20. Daevis B. J. (1964). Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Annals New York Academy of Sciences* 121: 404-427.
21. Dedej S., Basiolo A., Piva R. (1996). Morphometric and alloenzymatic characterisation in the Albanian honeybee population *Apis mellifera* L. *Apidologie* 27: 121-131.
22. Del Lama M. A. (1982). Estudos genéticos e bioquímicos das isoenzimas de malato desidrogenase em *Apis mellifera*. / PhD thesis, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.
23. Del Lama M. A., Mestriner M. A., Pavia J. C. A. (1985). Ast-5 and Pgm-1: new polymorphism in *Apis mellifera*. *Brazilian Journal of Genetics*, 8: 17-27.
24. Del Lama M. A., Figueiredo R. A., Soares A. E. E., Del Lama S. N. (1988). Hexokinase polymorphism in *Apis mellifera* and its use for Africanized honeybee identification. *Rev. Brazil. Genet.*, 11(2): 287-297.
25. Del Lama M. A., Lobo J. A., Soares A. E. E., Del Lama S. N. (1990). Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized honeybee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie* 21: 271-280.
26. Drilhon A. and Busnel R. G. (1945). Recherches sur les phosphatases d'insectes, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 27, 415.
27. Felsenstein J. (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package), Version 3.5C Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, W.A.



28. Francis R. M., Kryger P., Meixner M., Bouga M., Ivanova E., Andonov S., Berg S., Bienkowska M., Büchler R., Charistos L., Costa C., Dyrba W., Hatjina F., Panasiuk B., Pechhacker H., Kezić N., Korpela S., Le Conte Y., Uzunov A., Wilde J. (2014b). The genetic origin of honey bee colonies used in the Genotype-Environment-Interactions experiment: a comparison of methods. *Journal of Apicultural Research* 53(2): 188-204. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.02>.
29. Garstide D. F. (1980). Similar allozyme polymorphism in honeybees (*Apis mellifera*) from different continents. *Experientia* 36: 649-650.
30. Hartl and Clark A. (2007). *Principles of population genetics*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts. 642 p.
31. Henderson W. S. (1966). Izozymes and genetic control of NADP-malate dehydrogenase in mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 117, 28-23.
32. Henderson W. S. (1968). Intracellular location and genetic control of izozymes of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase. *Annals of New York Academy of Science*, 151 (1), 195-204.
33. Ivanova, E., Staykova, T., Bouga, M. (2007). Allozyme variability in honey bee populations from some mountainous regions in southwest of Bulgaria. // *Journal of Apicultural Research*, 46, (1), 3-8.
34. Ivanova E, and Bouga M. (2009). Genetic variability in honey bee population from Northern Bulgaria. Proceedings of the 41st Congress Apimondia, 15-20 September, 2009, Montpellier – France (<http://www.apimondia.org/2009/proceedings.htm>).
35. Ivanova E. (2010). Investigation on genetic variability in honeybee populations from Bulgaria, Greece and Serbia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 24 (2), 385 – 389.
36. Ivanova E, Petrov P, Bouga M, Emmanouel N, Ivgin-Tunka R, Kence M. (2010a). Genetic variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Bulgaria. *Journal of Apicultural Science*, 54(2): 51-62.
37. Ivanova E, Staykova T, Petrov P. (2010b). Allozyme variability in populations of local Bulgarian honey bee. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24(2SE): 379-384.
38. Ivanova E, Bienkowska M, Petrov P. (2011). Allozyme Polymorphism and Phylogenetic Relationships in *Apis mellifera* Subspecies Selectively Reared in Poland and Bulgaria. *Folia biologica* (Kraków), vol. 59 (2011), No 3-4, doi:10.3409/fb59\_3-4.09-13.

39. Ivanova E., Staykova T., Stoyanov I., Petrov P. (2012). Allozyme genetic polymorphism in Bulgarian honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from the south-eastern part of the Rhodopes. *Journal of BioScience and Biotechnology*, 1 (1), 45–49.
40. Ivanova E. (2015). Additional Information on Allozyme Variability of Honey Bees, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, from Bulgaria. *Acta zool. bulg.*, 67 (4), 2015: 573-578.
41. Kandemir I., Kence A. (1995). Allozyme variability in a Central Anatolian honey bee (*Apis mellifera* L.) population. *Apidologie* 26: 503-510.
42. Kandemir I., Kence M., Kence A. (2000). Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey. *Apidologie*, 31(3): 343-356.
43. Kandemir I., Kence M., Kence A. (2005). Morphometric and electrophoretic variation in different honeybee (*Apis mellifera* L.) population. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 29: 885-890.
44. Lobo J. A., Del Lama M. A., Mestriner M. A. (1989). Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L.). *Evolution* 43: 794-802.
45. Meixner M. D., Sheppard W. S., Dietza A., Krell R. (1994). Morphological and allozyme variability in honey bees from Kenya. *Apidologie* 25: 188-202.
46. Mestriner M.A., Contel E. P. B. (1972). The P-3 and Est-3 loci in the honeybee *Apis mellifera*. *Genetics*, 72(4): 733-738.
47. Nakamura T. (1940). Studie über den Phosphorstoffwechsel beim Wachstum des Tieres: Über das beim Wachstum, *Mitt. Med. Akad. Kioto*, 28, 590.
48. Nei M. (1972). Genetic distances between populations. *American Naturalist*. 106:283–292.
49. Nikolova S. (2011). Genetic variability of local Bulgarian honey bees *Apis mellifera macedonica (rodopica)* based on microsatellite DNA analysis.- *Journal of Apicultural Science* 2011, vol. 55 No.2.
50. Nunamaker R.A., Wilson W. T. (1980). Some isozymes of the honeybee. *Isozyme Bulletin* 13: 111-112.
51. Nunamaker R. A., Wilson W. T. and Haley B. E. (1984). Electrophoretic detection of Africanized honey bees (*Apis mellifera scutellata*) in Guatemala and Mexico based on malate dehydrogenase allozyme patterns. *J. Kans. Entomol. Soc.* 57, 622-631.
52. Peakall R, and Smouse P. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.
53. Petrov P., Ivanova E. (2009). Morpho-ethological and biochemical- genetic characteristics of the local Bulgarian honey bee *Apis mellifera rodopica*. In *Proceedings of the 41st International Apicultural Congress, Montpellier, France, 15-20 September 2009*.

54. Ray W. J. Jr., Roscelli G. A., (1964). A kinetic study of the phosphoglucosmutase pathway, J. Biol. Chem. 239, 1228-1236.
55. Rockstein M. and Herron P. W. (1951). Phosphatase in the adult worker honeybee, J. Cell. Comp. Physiol., 38, 451.
56. Ruttner F. L., Tassencourt L. and Louveaux J. (1978). Biometrical-statistical analysis of the geographical variability of *Apis mellifera* L. I. Material and methods. Apidologie 9: 363/381.
57. Ruttner F. (1988). Biogeography and taxonomy of honey bees. Springer-Verlag; Berlin, Germany.
58. Saitou N., Nei M. (1987). The Neighbour-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution 4(4): 406 - 425.
59. Sheppard W. S., Berlocher S. H. (1984). Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway. J. Apiculture Res. 23: 64-69.
60. Sheppard W. S., Berlocher S. H. (1985). New allozyme variability in Italian honey bees. J. Heredity 76: 45-48.
61. Sheppard W. S., McPherson B. A. (1986). Genetic variation in honey bees from an area of racial hybridization in western Czechoslovakia. Apidologie, 17(1): 21-32.
62. Sheppard W. S. (1988). Comparative study of enzyme polymorphism in United States and European honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) populations. Ann. Entomological Society of America 81: 886-889.
63. Sneath P. H. A., Sokal R. R. (1973). Numerical Taxonomy - The principle and practice of numerical classification, W.H. Freeman and Co., San Francisco.
64. Sylvester H. A. (1986). Biochemical genetics. In: Rinderer TE (ed) Bee genetics and breeding. Academic Press, Orlando, pp 177-203.
65. Ting J., Cohong C., (2011). Genetic diversity and population structure of Chinese honeybees (*Apis cerana*) under microsatellite markers. African Journal of Biotechnology, 19 (9): 1712-1720.
66. Uzunov A., Costa C., Panasiuk B., Meixner M. D., Kryger P., Hatjina F., Bouga M., Andonov S., Bienkowska M., Le Conte Y., Wilde J., Gerula D., Kiprijanovska H., Filipi J., Petrov P., Ruottinen L., Pechhacker H., Berg S., Dyrba W., Ivanova E., B uchler R. (2014a). Swarming, defensive and hygienic behaviour in honey bee colonies of different genetic origin in a pan-European experiment. Journal of Apicultural Research 53(2): 248-260. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.06>.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

*Изказвам сърдечна благодарност на научните ми ръководители – проф. д-р Евгения Нешова Иванова и проф. д-р Пламен Павлов Петров за всеотдайността, безграничната помощ и подкрепа при подготовката на настоящия дисертационен труд!*

*Искрено благодаря на всички пчелари и ръководители на бази, представляващи Националната Развъдна Асоциация по Пчеларство, предоставили материали за настоящото изследване! За оказаната ми помощ при работа и в трудни моменти – изказвам огромната си благодарност на гл. ас. д-р Иван Стоянов, както и на цялата катедра „Биология на развитието” – сектор „Генетика”, предоставили ми възможността да работя по този дисертационен труд!*