

**ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“**  
**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА „БИОЛОГИЯ НА РАЗВИТИЕТО“**

---

**ЕВГЕНИЯ НЕШОВА ИВАНОВА**

***ПОПУЛАЦИОННО-ГЕНЕТИЧНА ИЗМЕНЧИВОСТ НА  
APIS MELLIFERA L. В БЪЛГАРИЯ***

**АВТОРЕФЕРАТ  
НА  
ДИСЕРТАЦИЯ**

за придобиване на научната степен  
„доктор на науките“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика  
и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологични науки

Научна специалност: Генетика

Пловдив 2017

Дисертационният труд е обсъден и предложен за публична защита на разширено заседание на Катедра „Биология на развитието“ при Биологическия факултет на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ на 17.10.2016 г.

*Дисертационният труд съдържа 248 страници и включва: 106 таблици, 69 фигури и 280 цитирани заглавия.*

**Научно жури:**

проф. д.б.н. Параскева Владимирова Михайлова  
проф. д.б.н. Георги Георгиев Марков  
проф. д.с.н. Светозар Пенев Тянков  
проф. д.с.н. Дияна Лилова Светлева  
проф. дбн Павел Атанасов Ангелов  
доц. д-р Петя Павлова Иванова  
доц. д-р Ценка Георгиева Часовникарова

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 16.02.2017 г. от 11.00 ч. в 15 аудитория на Биологическия факултет при Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“, ул. „Тодор Самодумов“ № 2.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в университетската библиотека, Ректорат, ул. „Цар Асен“ № 24.

## ВЪВЕДЕНИЕ

Медоносните пчели са вид насекоми с огромно биологично, екологично, стопанско и икономическо значение. Те са обект на разнообразни научни изследвания. Като социални насекоми, те са предпочитан и широко използван модел за изясняване еволюцията на социалното поведение. Заради хапло-диплоидията като механизъм за детерминиране на пола, диференциацията във функциите на индивидите в пчелното семейство, както и заради стопанското си значение, *Apis mellifera* е значим обект на изследвания в областта на онтогенетиката, популационната и селекционната генетика, селекцията като цяло. Биологичната им значимост се основава на факта, че те са основните опрашители в дивата природа – 80% от опрашването на ентомофилните растения се осъществява от *Apis mellifera*, а при всички видове културни растения, активното опрашване значително повишава добивите им. Медоносните пчели са ценен стопански обект с икономическо значение и заради обстоятелството, че са производители на пчелен мед, пчелен восък, пчелен прашец, прополис, пчелно млечице и пчелна отрова – продукти, използвани от човека за храна и лечение.

Понастоящем, обект на професионално и любителско пчеларство в България са над 800 000 пчелни семейства. Около 13 000 от тях са под контрола на Националната Развъдна Асоциация по Пчеларство, която съблюдава работата и на над 30 майкопроизводителни стопанства в страната ни с капацитет за производство на около 60 – 70 000 високопродуктивни пчелни майки годишно. Структурата на сектора показва, че пчеларството в страната има все още екстензивен и разпръснат характер. Около 71% от пчеларите притежават до 50 пчелни семейства, приблизително 24% се грижат за пчелини с от 50 до 149 семейства, а едва 5% притежават пчелни стопанства с над 150 семейства.

В Европейския съюз приблизително 630 000 пчелари отглеждат 11.6 милиона пчелни семейства. Като цяло, средно в европейските страни, един пчелар се грижи за 10 семейства, което е доказателство, че повечето от пчелните стопанства в Европа не функционират с комерсиална цел.

През 2002 г. в Централна Европа е отчетена тревожна тенденция, свързана с повишаване смъртността на медоносните пчели. Заради различни или неизяснени по характер причини около 30% от пчелните семейства са загинали. През 2007 г. в САЩ е съобщено за сравнително най-мощните загуби на пчелни семейства. Този феномен в световен мащаб и сериозността на проблема, простиращ се от загуба на колонии до загиване на цели популации, прие наименованието „Colony Collapse Disorder (CCD) и привлече вниманието на учените от Европа и света, обединявайки ги около идеята да стартират мащабна по рода си научно-изследователска и приложна дейност, за да противопоставят научния потенциал и новостите в науката и практиката, свързани с медоносните пчели на тревожното явление, което засяга пчелите в световен мащаб не само като производители на пчелен мед и пчелни продукти, но и като основни опрашители в живата природа. В тази връзка през 2008 г. с COST акция FA0803 на ЕС стартира 4 годишен европейски проект „Prevention of honeybee colony losses“, в екипа на който се включиха и учени от България, участващи в работата на работна група 4 – WG4 – „Diversity and Vitality of honey bees“. Основна задача на групата бе да проучи взаимовръзката „генотип – околна среда“, включвайки в мащабен сравнителен анализ местни популации медоносни пчели от цяла Европа, включително и такива от България.

В Европа се отглеждат около 28 подвида на *Apis mellifera* и техни екотипове. В същото време, природните популации на местните медоносни пчели са подложени на силен натиск от генетично замърсяване, резултат от интензивния трансфер на чужди подвидове през цяла Европа. Двата подвида – *Apis mellifera carnica* и *Apis mellifera ligustica* – са най-използвани от пчеларите с комерсиална цел. Те са и най-експортираните подвидове на *Apis mellifera* в Европа. В някои европейски страни фрагментарно се отчита наличието в чисто състояние на популации от подвидовете *A. m. mellifera*, *A. m. caucasica*, *A. m. siciliana (sicula)*.

Генетичното богатство на популациите медоносни пчели в Европа е застрашено от неконтролираното въвеждане на гени от други подвидове в адаптираните местни популации, стреса от променящата се околна среда и замърсяването ѝ, появата на нови патогенни видове и глобалните промени в климата. За да се реагира на тези заплахи и в пълно съответствие с изискванията на конвенцията за биологичното разнообразие, приета в Рио де Жанейро през 1992 г., трябва да се работи организирано за запазване на подвидовете медоносни пчели и техните екотипове като генетичен резерв за бъдеща селекционна дейност. Липсата на усилия и на целенасочени дейности с такава цел ще се отрази пагубно върху медоносните пчели и живата природа, с потресавачи последствия за опрашването на дивата флора и земеделските растения. В глобален мащаб, това би довело до повсеместно намаляване на биологичното разнообразие и земеделската продуктивност и би рефлектирало върху хранителните източници на планетата, тъй като 1/3 от храната на човечеството зависи от пчелното опрашване.

Според базираната на класически морфометричен анализ класификация на медоносните пчели (Ruttner, 1988), територията на страната ни се обитава от подвида *Apis mellifera macedonica*.

Като обект на селекционна дейност, медоносните пчели в България са проучвани морфологично още през 30-те години на миналия век (Лазаров, 1935, 1936). Научно-техническата концепция за развитие на пчеларството в страната ни за периода 1967 – 1975 е включвала целенасочени селекционни мероприятия в две направления: чисто породно развъждане на българската медоносна пчела и междупородна хибридизация с интродуцирани подвидове като *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica* (Величков, 1970; Петров и Ганев, 2013). От 1999 г. в България се работи по нова Национална програма за развъдно-подобрителна работа с пчелите (Петров и др., 1999), чиято основна цел е запазване генофонда на местната българска медоносна пчела. Във връзка с тази цел, в страната ни е проведен морфо-етологичен анализ за характеризиране на нейната подвидова принадлежност (Петров, 1995, 1997), а от 1991 г. се осъществяват и биохимико-генетични изследвания на полиморфизма по някои протеинови и изоензимни системи (Ivanova et al, 1991; Ivanova et al, 1994; Ivanova and Popov, 1996 – 1997; Ivanova et al, 1996; Ivanova et al. 2001; Ivanova et al, 2007). Цялостно популационно-генетично проучване на изоензимния полиморфизъм в популациите на българската медоносна пчела от територия на цялата страна не е провеждано. Надеждните и разнообразни методи за ДНК анализ на генетичната изменчивост в българските пчелни популации са прилагани фрагментарно (Ivanova et al, 2004; Ivanova and Bouga, 2009; Nikolova, 2011), което мотивира необходимостта от планирано комплексно изследване на популационно-генетичната изменчивост сред популациите на местната за България медоносна пчела. От голямо значение при генетичното характеризиране на местната българска медоносна пчела като част от европейския генетичен ресурс на *Apis mellifera* е обединяването на различни изследователски подходи и провеждането на сравнителен анализ с популации медоносни пчели, принадлежащи към други европейски подвидове. Според Петров

(1990, 1995, 2004) и Petrov and Ivanova (2009), местната за България медоносна пчела може да бъде различена по определени морфологични и морфометрични характеристики от останалите подвидове на *Apis mellifera*. И макар, че в класификацията на Ruttner (1988) тя е определена като принадлежаща към подвида *A. m. macedonica*, Петров (1990) я именува като *A. m. rodopica*, основавайки се на обстоятелството, че нейни неметизирани популации са открити основно на територията на Родопите, някои части от Стара планина и в части от североизточна Гърция. По-късно той уточнява, че *A. m. macedonica* и *A. m. rodopica* са синоними (Петров и Ганев, 2013), което ясно е отчетено и в монографията на Engel (1999), представляваща ревизия на таксономията на медоносните пчели съобразно международния кодекс на зоологичната номенклатура.

Българската медоносна пчела е адаптирана към специфичните за територията на страната ни условия, при които семействата ѝ се развиват нормално и не проявяват голяма скронност към роене. Поради доказаните биологични и продуктивни качества на местните популации и адаптацията им към конкретните за страната ни условия (Петров и Ганев, 2013), генофондът им трябва да бъде детайлно проучен и съхранен, а селекцията им да се основава на сериозни научно-обосновани принципи.

Морфологичните проучвания на българската медоносна пчела сочат още, че в почти всички по-ниски райони на страната тя е кръстосвана основно с *A. m. ligustica*. Освен това, в продължение на повече от три десетилетия през миналия век в България със селекционни цели са изпитвани подвидовете *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica*, което е позволило чрез сравнителен анализ да се установи, че българската пчела е най-продуктивна при конкретните условия на средата, която обитава.

Тези факти отварят широко темата за степента на генетична хомо- или хетерогенност сред популациите на *A. m. macedonica* в България и нивото на метизацията им към настоящия момент. Решаването на трудния казус изисква провеждането на задълбочен сравнителен генетичен анализ на пчелни популации, както от България, така и от територията на Балканския полуостров и Европейския континент. Детайлната информация относно състава на генофонда и генетичната структура на местните популации ще допринесе за избор на подходящи критерии за генетична оценка на българската медоносна пчела *A. m. macedonica*, която при конкретните за страната ни условия се характеризира с висока плодовитост и продуктивност, добра зимостойчивост, миролюбивост, слаба склонност към роене и изразено хигиенно поведение. Като краен резултат от успешното провеждане на такова комплексно проучване се очаква изготвянето на система от популационни критерии и таксономични генетични маркери, приложими в бъдещи дейности, свързани с консервацията и селекцията на българската медоносна пчела.

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Литературният обзрe направен на базата на 280 източника, 28 от които на кирилица и е структуриран в четири подрездела: I. Социално поведение; II. Класификация на медоносните пчели; III. Проучвания на генетичната изменчивост при *Apis mellifera* L. чрез прилагане методите за протеинов и изоензимен анализ и IV. Проучвания върху генетичната изменчивост на медоносните пчели чрез методите на молекулярно-генетичния анализ. Предвид събраната и анализирана информация са направени следните заключения:

Данните, характеризиращи отделните еволюционни клонове, както и различните подвидове на *Apis mellifera* се обогатяват непрестанно предвид прилагането на разнообразни подходи на генетични изследвания. Допълнителни задълбочени изследвания на местните бъл-

гарски популации на подвида *A. m. macedonica*, базирани на комплексни генетични подходи ще допринесат за обогатяване, детайлизиране и прецизиране както на неговите характеристики, така и на еволюционния клонон С, към който той принадлежи.

Като ядрени генетични маркери, изоензимите крият значим потенциал за изследване на полиморфизма при медоносните пчели. Проучването им в хода на добре планиран сравнителен популационно-генетичен анализ и в комплекс с подходящи софтуерни продукти за статистическа обработка на получените резултати би довело до важни заключения, свързани, както с генетичното характеризирание на пчелните популации, така и с информация за генетичната им хетерогенност и филогенетичните връзки между тях. Събирането на нови данни относно биологичната изменчивост на ниво митохондриална ДНК би допринесло за разработването на система от генетични маркери, които да се прилагат в бъдеще при комплексни подходи за консервация на местни популации медоносни пчели, както на територията на България, така и на територията на Европейския континент.

Направеният литературен преглед показва, че микросателитният ДНК анализ се прилага все по-широко при изучаване особеностите на генофонда и генотипната структура на популации медоносни пчели по света. Като съществен елемент от цялостен генетичен анализ, той би допринесъл значимо за изясняване особеностите на генетичната изменчивост сред популациите медоносни пчели в България, за характеризирание на таксономичния им подвигов статус и филогенетичните им връзки с други европейски популации, принадлежащи към различни подвидове на *Apis mellifera*.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото проучване е: 1) да се характеризира популационно-генетичната изменчивост на *Apis mellifera macedonica* на територията на България; 2) да се определи степента на генетична диференциация между българската медоносна пчела и медоносни пчели с друга повидова принадлежност на територията на Европа; 3) да се изготви система от популационни и таксономични генетични маркери за оценка и разграничаване на българската медоносна пчела *A. m. macedonica*, съпоставима с нейните ценни биологични и стопански качества и приложима в бъдещи дейности по консервацията и селекцията ѝ в България.

За осъществяването на посочената цел е необходимо решаването на следните конкретни задачи:

1. Изучаване особеностите на генетично детерминирания полиморфизъм в популации *Apis mellifera macedonica* от територията на България чрез изоензимен анализ и характеризирание степента на вътрепопулационна и междупопулационна генетична изменчивост по шест алоензимни системи – малатдехидрогенази, малат ензими, неспецифични естерази, алкални фосфатази, фосфоглюкомутази и хексокинази, кореспондиращи с шестте съответни локуси – MDH-1, ME, EST-3, ALP, PGM и HK;

2. Сравнително проучване на генетично детерминирания полиморфизъм в популации на местната за България медоносна пчела *Apis mellifera macedonica* и пчелни популации, принадлежащи към същия подвид и към други подвидове от територията на Балканския полуостров (Гърция, Република Македония, Сърбия, Черна гора, Хърватия и Румъния) и Европа (Дания, Финландия, Франция, Германия, Австрия, Полша и Италия) чрез изоензимен анализ и характеризирание степента на генетична диференциация по шестте избрани локуси ( MDH-1, ME, EST-3, ALP, PGM и HK);

3. Изследване на генетичната хетерогенност в популации на *Apis mellifera macedonica* от България чрез RFLP метод, характеризирани степените на генетичната изменчивост по три генни сегмента на митохондриалната ДНК – 16s rDNA, COI и ND5 и обсъждане възможностите за дискриминиране на българската медоносна пчела от други популации на *Apis mellifera macedonica* от територията на Балканския полуостров;

4. Изучаване на генетично детерминирания полиморфизъм в популации *Apis mellifera macedonica* от територията на България и Гърция и Република Македония и пчелни популации на други подвидове от територията на Европа (Дания, Финландия, Франция, Германия, Австрия, Полша, Италия и Хърватия) чрез микросателитен ДНК анализ по 24 локуса и характеризирани състава на генофонда и степените на генетична диференциация;

5. Анализирани на филогенетичните зависимости между проучваните популации на *Apis mellifera macedonica* от България, Гърция и Република Македония и включените в изследването популации от други подвидове на *Apis mellifera* от територията на Балканския полуостров и Европа на базата на алоензимен анализ.

6. Характеризиране възможностите за разграничаване на популациите *Apis mellifera macedonica* от България, Гърция и Република Македония, както на подвид *Apis mellifera macedonica* от другите включените в изследването подвидове на *Apis mellifera* чрез прилагането на асигнационен тест (тест за принадлежност) по алоензимни и микросателитни показатели.

7. Избор на подходящи популационни и таксономични генетични маркери за оценка и разграничаване на българската медоносна пчела *A. m. macedonica*, съпоставими с нейните ценни биологични и стопански качества и приложими в бъдещи дейности по консервацията и селекцията ѝ в България.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### I. Алоензимен анализ

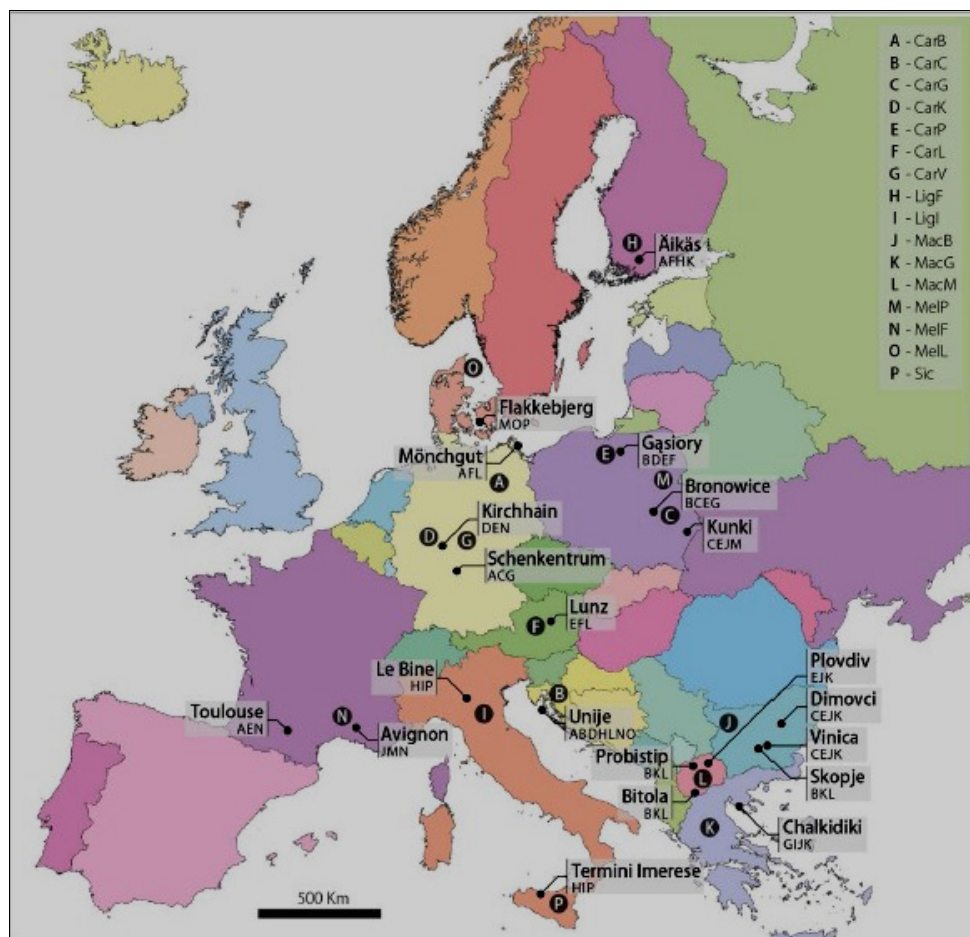
За нуждите на алоензимното изследване бяха използвани женски имагинални форми (пчели-работнички) от 108 български популации медоносни пчели с местонахождения в 24 района на територията на цялата страна, както и от популации, разпознати на базата на класически морфометричен анализ (Ruttner, 1988) като принадлежащи към подвидовете *A. m. mellifera* (с произход Дания, Франция и Полша), *A. m. carnica* (с произход Германия, Австрия, Полша, Хърватия, Сърбия, Черна гора и Румъния), *A. m. caucasica* (с произход Полша), *A. m. ligustica* (с произход Италия и Финландия), *A. m. siciliana* (с произход Италия) и *A. m. macedonica* (с произход Гърция и Република Македония). В проучването бяха включени и популации, подложени на строг селекционен контрол, принадлежащи към местната за България *A. m. macedonica* (обозначени в настоящия труд като *A. m. macedonica* – тип *rodopica*, предвид предложеното от Петров (1990)). Посочените проби бяха използвани за анализи при различни сравнителни схеми: алоензимен анализ на българските популации по райони и области; алоензимен анализ на популации медоносни пчели от територията на Балканския полуостров (България, Гърция, Република Македония, Сърбия, Черна гора, Румъния); алоензимен анализ на българските популации и популации, принадлежащи към други подвидове на *A. mellifera* и комплексен сравнителен алоензимен популационно-генетичен анализ на европейски популации медоносни пчели (включително български), принадлежащи към различни подвидове и имащи различен произход на територията на Европа. Общо около 7500 пчели-работнички (събрани на случаен принцип от по пет семейства за популация, 7 до 12 индивида от пчелно семейство) бяха изследвани

чрез прилагане на този подход. Събирането на пробите бе осъществено през месеците юни, юли и август за периода 2003 – 2013 г. Изследваните български популации бяха основно от неконтролирани любителски пчелини, състоящи се от 10 до 50 пчелни семейства. Изследваните европейски популации, включително тези от Балканите (Фигура 1), бяха отглеждани под селекционен контрол и любезно предоставени за целите на изследването от селекционни или научно-изследователски центрове в България и Европа, както следва: *A. m. macedonica* с произход България – Научна база по пчеларство на Аграрен университет – Пловдив и База по пчеларство – Смолян; *A. m. macedonica* с произход Гърция – Гръцки национален институт по пчеларство – Солун и пчеларски бази Лариса I и II, Арта, Халкидики и Кастория и *A. m. macedonica* с произход Република Македония – Научна база по пчеларство към Скопски университет; *A. m. carnica* – Пчеларски бази Врач и Вранье на Белградски университет, Сърбия, пчеларски бази Бело Поле и Сутоморе, Черна гора, Институт по пчеларство – Кирхайн и Вейтшюхам, Германия, Австрийска „*carnica*“ асоциация, Лунц, Австрия, Научни бази по пчеларство – Пулави и Олстин, Полша и Пчеларска база „Унийе“ при Аграрен факултет на Загребски университет, Хърватия; *A. m. ligustica* – Научна база по пчеларство – Болоня, Италия и Изследователски институт МТТ – Агрифуд Йокиоинен, Финландия; *A. m. siciliana* – Научно-изследователска база, Сицилия, Италия; *A. m. mellifera* – Департамент по агроекология, Университет Архус, Слагелсе, Дания, Биологична лаборатория към Агропарк, Авиньон, Франция и Научна база по пчеларство – Пулави, Полша; *A. m. caucasica* – Научна база по пчеларство – Пулави, Полша. Същите популации бяха включени и в сравнителен експеримент на европейската COST акцията FA0803 „Prevention of honeybee Colony Losses (COLOSS)“, получил наименованието GEI (genotype – environment – interactions) експеримент, целящ сравнителното анализиране на местни европейски популации с различен произход и принадлежащи към различни подвидове на *A. mellifera* (Фигура 2).



Фигура 1. Местонахождения на изследваните популации от територията на Балканския полуостров: (1) България – Пловдив; (2) България – Смолян; (3) Гърция – Лариса I; (4) Гърция – Лариса II; (5) Гърция – Арта; (6) Гърция – Халкидики; (7) Гърция – Кастория; (8) Сърбия - Врач; (9) Сърбия - Вранье; (10) Черна гора – Бело поле; (11) Черна гора – Сутоморе; (12) Република Македония – Скопие; (13) Румъния - Букурещ. Източник: [www.geographic.org](http://www.geographic.org), използвана с разрешение





Фигура 2. Карта на Европа с обозначени тест-локации на включените в европейския GEI експеримент пчелни популации с различен генетичен произход (по Francis et al., 2014a)

Материалът бе доставян, съхраняван и обработван в Лабораторията по генетика на катедра „Биология на развитието“. Изследвани бяха индивидуални екстракти от торакс на пчели-работнички (за MDH, EST, PGM и НК ензимните системи) и индивидуални тотални екстракти (за ME и ALP ензимните системи). Като екстрахиращ разтвор бе използван трис-фосфатен буфер с pH 6.7, разреден с дестилирана вода в отношение 1:7. Електрофоретичното разделяне бе проведено по метода на Daervis (1964) и първа система на Маурер (1971) с някои модификации (Иванова, 1996) в 7.5% полиакриламиден гел.

На електрофоретичен анализ бяха подложени 6 алоензимни системи: MDH, НАД-зависими малатдехидрогенази (malate dehydrogenase, EC 1.1.1.37); ME, малат ензими, НАДФ-зависими малатдехидрогенази (malic enzyme, EC 1.1.1.40); EST, естерази (esterase, EC 3.1.1), ALP, алкални фосфатази (alkaline phosphatase, EC 3.1.3.1); PGM, фосфоглюкомутази (Phosphoglucomutase, EC 5.4.2.2) и НК, хексокинази (Hexokinase, EC 2.7.1.1.), контролирани от 6 различни локуса (MDH-1, ME, EST-3, ALP, PGM и НК). За целите на алоензимното проучване бяха използвани стандартизирани методи, представени от Meixner et al. (2013).

Статистическата обработка бе на правена чрез BIOSYS-1 (Swofford and Selander, 1981). Филогенетичните схеми бяха построени на базата на генетичната дистанция по Nei (1972) чрез UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) и Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) методите и чрез използването на PHYLIP (Felsenstein, 1993) софтуерния пакет.

## II. Митохондриален ДНК анализ

Пчелните индивиди (пчели-работнички) бяха събрани през лятото на 2007 г. от девет популации с местонахождения в шест района на страната, както следва: Северозападен (Сливовик и Дреновец); Северен централен (Ралево-Липака); Североизточен (Писанец); Югоизточен (Поморие и Китен); Южен централен (Пловдив и Поибрене) и Югозападен (Жижево) – Фигура 3. За нуждите на митохондриалния ДНК анализ бе използван по 1 индивид от семейство и по пет семейства от популация. От всеки индивид бе изолирана тотална ДНК съгласно протокола на Qiagen Tissue Kit.

Вариантите на митохондриалната ДНК бяха анализирани чрез RFLP анализ, извършен върху амплифицирани PCR (polymerase chain reaction, полимеразната верижна реакция) продукти. Три набора от праймери бяха използвани за амплификацията на 16s rDNA, COI и ND5 гените сегменти. Праймерите за 16s rDNA сегмента бяха 5'-СААСАТСГАГГТСГСАААСАТС-3' и 3'-АГТТГГГАСТАТГТТТТССАТГ-5' (Nielsen et al., 1994), за COI сегмента – 5'-ГАТТАСТТСТССТСАТТА-3' и 3'-ААТААГТСТГАТАГГТСТАА-5' (Nielsen et al., 1995). Използваните праймери за ND5 сегмента 5'-ТСГАААТГААТАГГАТАСАГ-3' и 3'-ТТАГГАТТГГТАГАГТТГГ-5' бяха проектирани за базата на известния митохондриален геном на *A. m. ligustica*. Полимеразната верижна реакция (Saiki et al., 1988) се състоеше от 2.4 U от Taq polymerase, 5 µL от 10x reaction buffer на GibcoBRL, 5 µL dNTPs mix (2 mM), 3 µL MgCl<sub>2</sub> (2 mM), приблизително 100 ng ДНК, 0.68 µM от всеки праймер и стерилна вода. PCR програмата включваше като първа стъпка денатурация при 94°C за 4 min, последвана от 35 цикъла ДНК денатурация при 94°C за 1 min, анилиране при 55°C (16s rDNA, CO I), или при 48°C (ND 5) за 1 min и удължаване при 72°C за 2 min. Реакцията приключваше с допълнителни 6 min удължаване при 72°C, следвани от финален цикъл на амплификация.

Рестрикционните ензими, използвани за 16s rDNA бяха Sau3A I, Ssp I, Hinc II, Dra I, EcoR I, за COI – Sau3A I, Ssp I, Fok I, Bcl I, Sty I, Nco I, BstU I и Xho I и за ND5 – Dra I, Taq I, Nla III, Hinc II, Fok I и Ssp I.

Електрофоретичното разделяне на сегментите бе проведено в 2% агарозен гел с използването на 0.5×TBE буфер. Проявяването се осъществи с използването на ethidium bromide и визуализация под UV светлина. Размерът на ДНК фрагментите бе сравнен с PCR маркер (Promega G316A, Promega Corp.), поставен в същия гел. Статистическата обработка се осъществи чрез програмата DNAfrag 3.03 (Nash, 1991).



Фигура 3. Местонахождения на изследваните чрез mtDNA анализ популации *A. m. macedonica* на територията на България

### III. Микросателитен ДНК анализ

За целите на микросателитния анализ бяха реализирани две сравнителни схеми: 1) сравнение на пчелни популации (пчели-работнички от различни локални популации на територията на дадена страна) от подвида *A. m. macedonica* с произход България (обозначена в таблиците и фигурите като *A. m. macedonica* Bg), Гърция (*A. m. macedonica* Gr) и Република Македония (*A. m. macedonica* Mac) с референтни данни за подвидовете *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera*, *A. m. anatoliaca* и 2) сравнение на включена в европейския GEI експеримент местна популация на *A. m. macedonica*, обозначена в таблиците и фигурите като *A. m. macedonica* B, селекционно контролирана и предоставена от Научната база по пчеларство на Аграрен университет – Пловдив, България; *A. m. macedonica* G – Гръцки национален институт по пчеларство – Солун, Гърция и *A. m. macedonica* M – Научна база по пчеларство към Скопски университет, Република Македония с референтни данни за подвидовете *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* и *A. m. anatoliaca*. Референтните данни бяха предоставени за нуждите на европейския GEI експеримент от лабораторията на департамента по агроекология в Слагелсе, Дания.

Общо около 460 индивида (пчели-работнички) бяха използвани за реализирането на двете експериментални сравнителни схеми. Пробосъбирането бе извършено през месеците юни, юли и август 2009 и 2010 г.

Българска популация на *A. m. macedonica* включваше индивиди от 32 локални популации от 18 области на страната от всичките шест географски района, както следва: Северозападен (Монтана); Северен централен (Русе, Велико Търново, Ловеч и Плевен); Североизточен (Варна, Шумен и Търговище); Югоизточен (Бургас и Ямбол); Южен централен (Пловдив, Пазарджик, Смолян, Кърджали и Стара Загора) и Югозападен (София, Благоевград и Кюстендил). Включените във втората експериментална сравнителна схема пчелни индивиди бяха от подложена на селекционен контрол популация на местната българска пчела *A. m. macedonica* (именувана от Петров, 1990 като *A. m. rodopica* и използвана като обект на национална селекционна програма от 1999 г.).

Пробите от пчели-работнички бяха събрани от популациите с посочените местонахождения и произходи (Фигура 2), транспортирани до Лабораторията по генетика и съхранявани при температура  $-20^{\circ}\text{C}$  до използването им. При организиране на работната схема, те бяха прехвърлени в епруветки с абсолютен алкохол и съхранявани в тях до изолирането на ДНК за нуждите на микросателитния анализ. Набирането и комплектоването на пробите за сравнителния анализ се извърши от WG4 на COST акцията FA0803.

ДНК бе екстрахирана чрез използване на DNeasy™ 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen) и съгласно посочените за прилагането му инструкции. Пробите с изолирана ДНК бяха преместени в 100ul стерилна вода и съхранени при  $-20^{\circ}\text{C}$  до използването им.

Бяха проведени четири отделни PCR реакции с флуоресцентно белязани двойки праймери и шест до девет повтаряния за реакция. Началният праймер на всеки маркер бе белязан в 5' края с fluorescent phosphoramidite. Флуоресцентното маркиране беше извършено с 6-карбоксиметил-флуоресцин (6-FAM), 6-карбоксиметил-4, 7,2", 4", 5", 7'-хексахлор-флуоресцин (HEX) и 2,7", 8'-бензо-5"-флуорополимер-2',4,7-трихлор, 5-карбоксифлуоресцин (NED), VIC и PET (да се допълни). Като размерен стандарт бе използван ROX500™.

В настоящото изследване, за целите на микросателитния анализ, бяха включени 24 *A. mellifera* микросателитни локуси (Estoup et al., 1995; Solignac et al., 2003). Техните наименования са представени в Таблица 1.

Генотипирането бе извършено върху 96 капиларен ABI 3730xl Sequencer (Applied Biosystems). Алелните варианти бяха първоначално определени автоматично с помощта

на GeneMapper (GENEMAPPER™ v.4.1.2) софтуерния продукт, след това проверени двукратно и, при необходимост, поправени ръчно.

Таблица 1. Списък на анализираниите микросателитни локуси

Микросателитни локуси							
A8	A14	A24	A29	A43	A79	A88	A113
Ac11	Ac88	Ac139	Ap15	Ap68	Ap85	Ap90	Ap223
Ap224	Ap226	Ap249	Ap273	Ap274	Ap288	At168	At188

Получените данни бяха въведени и организирани в Excel™ файл, който бе изходна база за последващата статистическата обработка.

В настоящото изследване статистическата обработка се извърши с помощта на GenAlEx v.6.42 (Peakall and Smouse, 2006) софтуерния продукт. Тестът за вероятност (точен Тест на Fisher) с помощта на марковия алгоритъм на Raymond and Rousset (1995) бе приложен след създаването на таблици за всички двойки локуси. Определянето на генетичната дистанция по Nei (1972), заедно с изчислените алелни честоти, бе в основата на приложени асигнационен тест.

С цел характеризирани на формираните кластери и подкластери, на следващ етап получените данни бяха анализирани чрез програмата STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al., 2000). Кластрирането бе извършено на база стойности за всяко K с изчислена максимална вероятност и визуализирано по Evanno et al. (2005). Принципният компонентен анализ (Principal Component Analysis, PCA) бе проведен съгласно Jombart (2008) и Dray and Dufour (2007) чрез R софтуер (Ihaka and Gentleman, 1996). Същият софтуер бе използван за изготвяне на крайната STRUCTURE диаграма. Пространственият анализ бе проведен по отношение популациите на подвида *A. m. macedonica* чрез R програмата (R Development Core Team, 2012) с използването на adegenet софтуера (Jombart, 2008). Географското картиране бе осъществено с помощта на Global Administrative Areas database (GADM v1.0, 2011) (<http://www.gadm.org/>) и R пакета PBSmapping (Schnute et al., 2010).

### **Някои особености на *Apis mellifera* като обект на изследване в генетиката**

Начинът на живот в пчелното семейство, фертилноста на част от индивидите му и дейностите, които те извършват се характеризират с някои особености, сред които от голяма значение за генетичните проучвания са следните:

1. Нормално само един женски индивид в семейството (пчелната майка) може да се опложда и да снася яйца, т.е. – да предава генетичните си заложи в потомството, а всички членове на пчелното семейство имат еднаква митохондриална наследственост, предадена по майчина линия;
2. Младата майка може да бъде оплодена от много на брой търтеи (полиандрия), което определя значимия потенциал за генетично разнообразие в потомството по бащина линия;
3. Нормално, в пчелното семейство от оплодените яйца се развиват женски нефертилни индивиди, а от неоплодените – мъжки фертилни индивиди;
4. Оплождането на пчелната майка се извършва при брачен полет, по време на който тя може да прелети, в зависимост от релефа на района и наличния търтеев фон, разстояния средно от 2 до 10 км;
5. За да достигнат т. нар. търтееви сбрища, където се извършва оплождането на пчелната майка (от 15 до 35 м височина), търтеите прелитат рстояния средно от 2 до 3 км;
6. *Apis mellifera* е стопански експлоатиран вид. Пчелните семейства, макар и съществуващи в състава на естествени природни популации, заради ценните си

стопански качества, са подложени на различно по сила човешко въздействие, формирайки културни популации, генофондът на които в различна степен е повлиян и от човешкия фактор;

7. Културните популации на медоносните пчели могат да са от „отворен“ или „затворен“ тип, предвид възможностите за свободно или ограничено кръстосване съобразно липсата или наличието на конкретни селекционни цели, както и „неконтролирани“ или „контролирани“, предвид естеството на конкретните дейности по управлението им, включващи основно добив на пчелен мед или провеждането на строг и целенасочен селекционен контрол с цел достигане на висока плодовитост, продуктивност, зимоустойчивост и др.

## **Някои уточнения относно използваната в настоящия дисертационен труд терминология предвид особености на обекта на изследването – медоносната пчела *Apis mellifera***

### **Подвид и произход**

Заради факта, че медоносната пчела е стопански ценен вид насекоми, тя е обект на изследване, освен на генетиката като фундаментална наука, но и на селекцията като приложна такава. В стоизи аспект, в литературата, посветена на проучвания върху медоносните пчели, терминът „подвид“ често се заменя от по-рано широко използвания термин „раса“, а в някои разработки, посветени на строго селекционни проучвания – и от термина „порода“. В настоящия труд е използван основно терминът „подвид“, но при цитиране резултатите на други автори, макар и рядко е употребяван терминът „порода“. С цел уточняване на конкретния произход на базата на географската диференциация на определени популации, принадлежащи към един и същ подвид, е използван и терминът „произход“.

### **Популация**

Включените в настоящото изследване пчелни популации не са естествени. В експерименталната работа не са използвани проби от пчелни семейства, обитаващи хралупи, скални цепнатини и др. Всички сравнявани в проучването популации се характеризират с географска диференцираност и по тип са културни, като по-голямата част от тях са неконтролирани, т. е. не подложени на селекционен контрол, но управлявани от човека. За тези популации е характерно, че отстоят на повече от 10 км една от друга (което е съобразено с коментирани вече способности за летеж на определени разстояния от фертилните индивиди), но няма сигурна гаранция, че потокът от гени в различни посоки е прекратен. Подложените на селекционен контрол популации са от затворен тип, което значи, че кръстосването в тях се осъществява по определени селекционни схеми, при което са осигурени необходимите условия на изолация. В работата е уточнено местонахождението на всяка популация и в текста освен терминът „популация X“, е използвано и наименованието на конкретното местонахождение X или това на „тест-локацията X“ като равнопоставено с дадената популация.

Популациите на българската медоносна пчела *Apis mellifera macedonica*, които са под строг селекционен контрол и обект на националната развъдна програма от 1999 г. и понастоящем в този труд са обозначени като *A. m. macedonica* – тип *rodopica*. В европейския GEI експеримент са обозначени като Мас В (Фигура 2) или като *A. m. macedonica* В (в таблиците с данни от микросателитния ДНК анализ).

### **Екотип**

Терминът „екотип“ е с ненапълно изяснено съдържание особено по отношение на стопански експлоатирани видове и на такива, които са подложени на различен по сила селекционен контрол.

По мнение на Одум (1986) организмите се приспособяват към условията на средата, за да намалят лимитиращото влияние на физическите фактори. Видовете с широко географско разпространение почти винаги формират адаптирани към местните условия популации, наречени екотипове, чиито оптимален диапазон на толерантност съответства на местните условия. Такъв тип адаптация може да е съпроводена от проява на генетични промени или да е просто физиологична аклиматизация без генетична изменчивост.

Според Кадиев (1999) под екотип се разбира съвкупност от индивиди на даден вид, адаптирани към средата на обитание и притежаващи наследствените белези на екологичната даденост.

В настоящото проучване в съответствие с обсъжданата в областта на апидологията терминология (De La Rua et al., 2009; Meixner et al., 2010; Uzunov et al., 2014a; Francis et al., 2014a), терминът екотип се използва за обозначаване на съвкупност от локални популации на даден подвид, адаптирани към определена среда на обитание и притежаващи някои специфични морфологични и генетични характеристики, по които е възможна тяхната дискриминация в рамките на подвида.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### I. Алоензимен анализ

Алоензимният анализ се основава на получените чрез гел-електрофореза резултати за алелните варианти на съответните ензимни локуси. Това е и първият метод за изследване, характеризирани и прилагани на ядрени молекулни маркери за изследвания в сферата на популационната генетика на медоносните пчели (Mestriner 1969, Mestriner and Contel 1972). Болшинството от алоензимните изследвания върху полиморфизма в пчелните популации са от 80-те и 90-те години на XX век (Garstide 1980, Nunamaker et al., 1984, Sheppard and Berlocher 1984, 1985, Badino et al., 1982, 1988, Lobo et al., 1989, Kandemir and Kence 1995, Dedej et al., 1996). Алоензимните изследвания дават възможности за изучаване на популационната структура, хибридизацията, потока от гени (Badino et al., 1983, 1985, 1988; Sheppard and McPherson 1986; Del Lama et al., 1990; Meixner et al., 1994), както и за разкриване ефекта на родоначалника (Cornuet and Fresnaye, 1979; Sheppard 1988).

Сравнителният алоензимен анализ показва, че неголям брой локуси се характеризират с наличие на полиморфизъм в различните популации медоносни пчели и че няма фиксирани значими алелни различия между отделните подвидове. Онова, което е значимо за популационно-генетичното им характеризирани, са различията в алелните честоти. Практически, това ограничение не дава възможност алоензимният анализ да се прилага успешно при изследване на малка извадка от индивиди или малък брой индивиди от отделна колония (пчелно семейство).

Алоензимните маркери обаче и до днес успешно се прилагат в популационно-генетичните изследвания. Като преимущество, този метод на изследване е икономичен и лесен за прилагане, а постигнатите резултати са отчетливи и ясни при тълкуване.

Един от най-полиморфните и най-широко използвани за изследване на популационната изменчивост при *Apis mellifera* ензимни локуси е MDH-1 (malate dehydrogenase) локусът. Неговата изменчивост се оказва особено полезна заради факта, че честотите на срещане на алелите му се различават в значима степен сред подвидовете медоносни пчели от различните еволюционни клонове. На практика, изменчивостта по MDH-1 локуса се използва екстензивно в изследвания, посветени на разпространението на африканизирани подвидове на *Apis mellifera*, както и на генетичната диференциация сред подвидовете от европейските родословни клонове (Cornuet, 1982; Cornuet et al., 1986; Lobo et al., 1989; Del Lama et al., 1990).

**Таблица 2. Най-често използвани полиморфни локуси и техни алели при провеждане на алоензимни изследвания чрез прилагане на различни електрофоретични техники. Е.С. – класификационен номер (Enzyme commission number) при *Apis mellifera* (съгласно Meixner et al., 2013).**

Полиморфен локус	Известни алели	Литературни източници
<b>MDH-1</b> EC 1.1.1.37	MDH65 MDH80 MDH87 MDH100 MDH116 MDH125 MDH133	Garstide 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, Smith and Glenn 1995, Dedej et al., 1996, Kandemir et al., 2000, Bouga et al., 2005, Ivanova 2010, Ivanova et al., 2007, 2011
<b>ME</b> EC 1.1.1.40	ME70 ME90 ME100 ME106 ME117 (115)	Sheppard and Berlocher 1984, 1985, Sheppard and McPheron 1986, Meixner et al., 1994, Dedej et al., 1996, Kandemir et al., 2000, 2005, Bouga et al., 2005, Ivanova 2010, Ivanova et al., 2011
<b>EST 3</b> EC 3.1.1	EST70 EST80 EST88 EST94 EST100 EST105 EST118 EST130	Sheppard and McPheron 1986, Kandemir and Kence 1995, Bouga et al., 2005, Ivanova 2010, Ivanova et al., 2010a, b, c, 2011
<b>ALP</b> EC 3.1.3.1	ALP80 ALP90 ALP100	Bouga et al., 2005, Ivanova 2010, Ivanova et al., 2010a, b, c, Ivanova et al., 2011
<b>PGM</b> EC 5.4.2.2	PGM75 PGM80 PGM100 PGM114 PGM120	Mestriner & Contel 1972, Brueckner 1974, Nunamaker & Wilson 1980, Badino et al., 1983, Sheppard & Berlocher 1985, Del Lama et al., 1985, Meixner et al., 1994, Smith and Glenn 1995, Kandemir & Kence 1995, Ivanova 2010, Ivanova et al., 2010a, b, c, Ivanova et al., 2011
<b>HK</b> EC 2.7.1.1	HK77 HK87 HK100 HK110 HK121	Sheppard & McPheron 1986, Badino et al., 1988, Del Lama et al., 1988, 1990, Smith and Glenn 1995, Kandemir and Kence 1995, Kandemir et al., 2000, Ivanova et al., 2010a, b, c, Ivanova et al., 2011

Тъй като са налице и доказателства за твърдението, че изменчивостта по MDH-1 локуса може да бъде интерпретирана като следствие от физиологична адаптация към различните климатични условия и по тази причина да не рефлектира върху потока от гени (Coelho and Mitton 1988; Nielsen et al., 1994, Cornuet et al., 1995), към филогеографски

заклучения трябва да се подхожда внимателно, предвид становището, че MDH-1 локусът не е селективно неутрален (Meixner et al., 2013).

Най-предпочитаните за изследване алоензимни системи и полиморфни локуси при медоносните пчели, както и констатираните до момента в генофонда на изследваните популации алели са представени в Таблица 2.

В хода на настоящото проучване, на базата на електрофореза в ПААГ, бе изследван полиморфизмът по всичките горе посочени алоензимни системи.

Общо, за всички включени в изследването български и европейски популации медоносни пчели, бе установен полиморфизъм по отношение на повечето проучвани локуси. Бе констатирано наличие на четири алела по MDH-1 локуса, три алела – по ME, седем алела – по EST-3, три – по ALP, два – по PGM и четири – по HK локуса.

### **Сравнителен алоензимен анализ на популации български медоносни пчели по области и райони**

Обобщените данни от настоящото изследване показват, че в българските популации медоносни пчели е налице полиморфизъм по всички изследвани алоензимни системи (Таблицы 3 и 4).

В проучваните български популации по области средният брой алели за локус варираше между 1.8 (Разградска област) и 3.5 (Бургаска област). Нивото на полиморфизъм бе в границата от 50% (за популациите в 7 от изследваните области – Русе, Разград, Шумен, Търговище, Благоевград, Кюстендил и Перник) и 100% (само в област Монтана). За популациите от областите Видин, Ловеч, Варна, Хасково, Кърджали, Пазарджик, Ст. Загора, Ямбол, Сливен и София изчисленият процент на полиморфизъм бе 66.7%, а за популациите от областите Плевен, Добрич, В. Търново, Пловдив, Смолян, Бургас – 83.3%. Получената и очаквана хетерозиготност ( $H_o$  и  $H_e$ ) варираше в диапазон от 0.142 (област Видин) до 0.253 (област Сливен) и от 0.219 (области Русе и Разград) до 0.296 (област Монтана), съответно.

Средната изчислена стойност на показателя  $F_{ST}$  за изследваните популации по области бе 0.0191, което показва, че само 1.91% от констатираната генетична изменчивост е междупопулационна, а 98.09% – вътрепопулационна.

Алелните честоти за всички полиморфни локуси бяха използвани като база за изчисляване на генетичната дистанция и бе установено, че тя варира между 0.001 (Русе – Разград, Русе – Ловеч, Смолян – Пловдив, Смолян – Велико Търново, Смолян – Благоевград, Благоевград – Пловдив, Ямбол – Варна, Перник – Добрич и Кюстендил – София) и 0.027 (Стара Загора – Видин) за изследваните популации по области и между 0.001 и 0.008 за изследваните популации по райони.

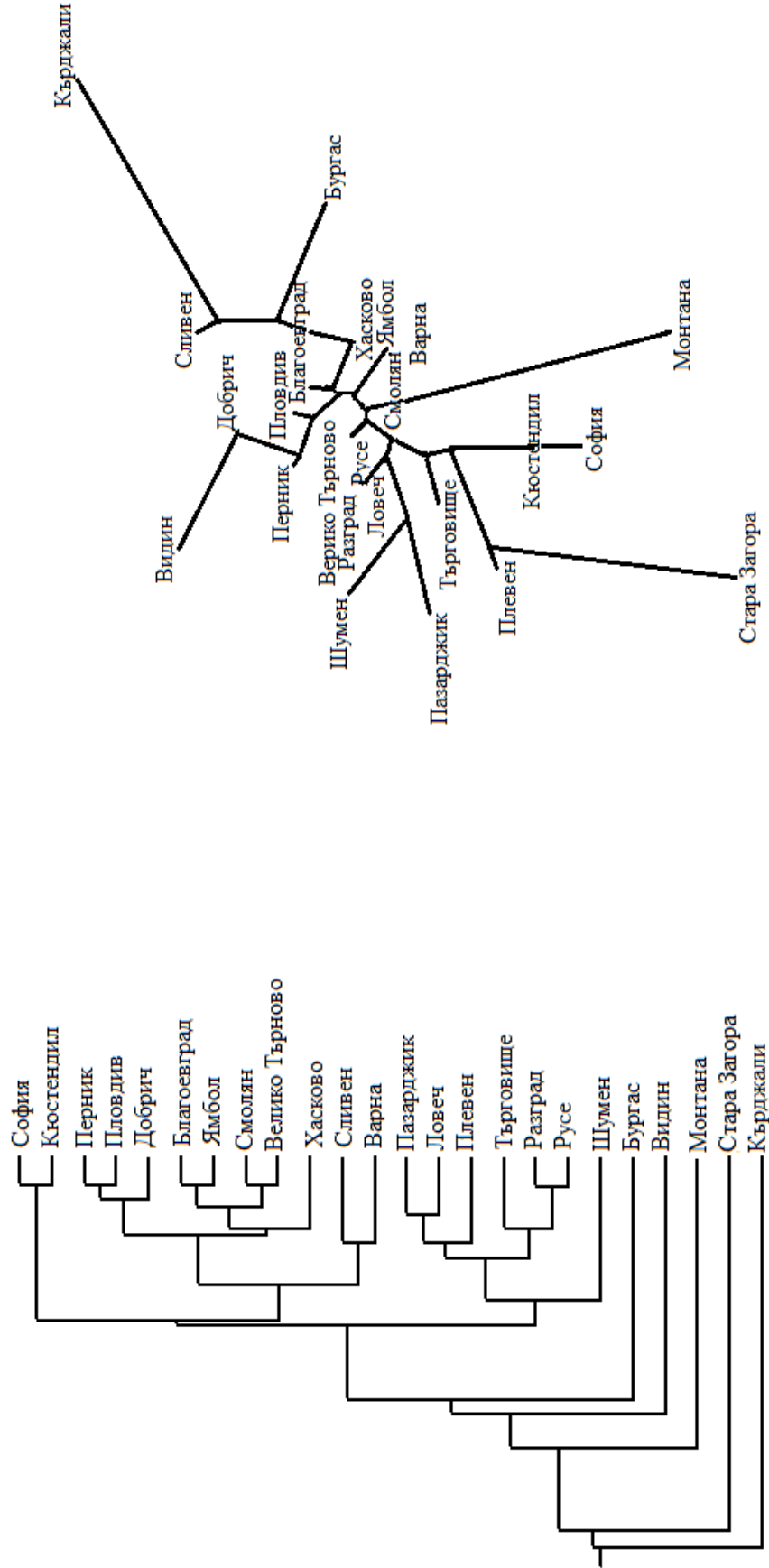
На базата на изчислените алелни честоти и генетичната дистанция по Nei (1972) между популациите по области, бяха построени UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) и Neighbor-Joining – NJ (Saitou and Nei, 1987) филогенетични схеми (Фигура 4 А и Б).

И в двата типа дендрограми, популациите от области Кърджали, Ст. Загора, Монтана, Видин и Бургас бяха кластрирани поотделно, докато останалите популации се групираха в общ кластер, формиращ три клона: 1) области Шумен, Русе, Разград, Търговище, Плевен, Ловеч и Пазарджик; 2) области Варна, Сливен, Хасково, В. Търново, Смолян, Ямбол, Благоевград, Добрич, Пловдив и Перник; 3) области Кюстендил и София.



Таблица 3. Алелни честоти за изследваните полиморфни локуси, обобщени по области и райони.

Локус	Северозападен						Северенцентрален						Северозападен						Югозападен						Южен централен						Югоизточен					
	Алел	Vm	Dbr	Shm	Rzg	Trg	Rus	V.Tr	Plv	Lov	Vdhn	Mon	Blg	Knd	Ptn	Sf	Sm	Kr	Has	Pz	Pld	St.Z	Brg	Yam	Sl											
MDH1	Алел	0.467	0.353	0.435	0.455	0.483	0.461	0.451	0.563	0.491	0.304	0.333	0.444	0.505	0.384	0.487	0.407	0.462	0.441	0.494	0.4	0.641	0.398	0.443	0.481											
	100	0.533	0.647	0.565	0.545	0.477	0.539	0.549	0.437	0.506	0.696	0.464	0.556	0.495	0.616	0.513	0.587	0.538	0.537	0.506	0.6	0.359	0.596	0.557	0.519											
	80	0	0	0	0	0.04	0	0	0	0.003	0	0.202	0	0	0	0	0.006	0	0.023	0	0	0	0.006	0	0											
ME	100	0.958	0.939	0.979	0.9	0.877	0.951	0.853	0.947	0.955	0.864	0.884	0.915	0.869	0.951	0.833	0.899	0.943	0.903	0.963	0.901	0.891	0.91	0.931	0.949											
	106	0.042	0.061	0.021	0.1	0.085	0.049	0.118	0.045	0.017	0.136	0.116	0.071	0.03	0.033	0	0.074	0.041	0.097	0.037	0.086	0.087	0.038	0.025	0.026											
	90	0	0	0	0	0.038	0	0.029	0.008	0.028	0	0	0.005	0.101	0.016	0.167	0.027	0.016	0	0	0.013	0.022	0.052	0.044	0.026											
EST3	115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.009	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											
	80	0.022	0.052	0.036	0	0	0	0	0.026	0.023	0	0	0.008	0	0.021	0	0	0	0.021	0.116	0.008	0	0.017	0	0.015											
	100	0.955	0.94	0.893	1	0.971	0.993	0.931	0.967	0.938	1	0.924	0.966	0.989	0.979	0.975	0.942	0.898	0.89	0.884	0.958	0.957	0.943	0.959	0.963											
ALP	88	0.022	0.007	0	0	0	0	0	0	0	0	0.043	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.008	0	0											
	118	0	0	0.071	0	0.007	0.007	0.014	0.007	0.008	0	0.033	0.025	0	0	0.025	0.042	0.018	0.031	0	0.02	0.043	0.009	0	0											
	94	0	0	0	0	0.022	0	0	0	0	0	0	0	0.011	0	0	0	0.084	0.059	0	0.006	0	0.013	0.01	0.022											
PGM	105	0	0	0	0	0	0	0.056	0	0.031	0	0	0	0	0	0.017	0	0	0	0	0.008	0	0.009	0.031	0											
	80	0.518	0.46	0.568	0.625	0.555	0.619	0.537	0.589	0.587	0.526	0.552	0.511	0.539	0.508	0.523	0.559	0.337	0.467	0.638	0.507	0.478	0.375	0.5	0.409											
	100	0.482	0.5	0.341	0.375	0.375	0.381	0.435	0.411	0.41	0.474	0.448	0.467	0.461	0.492	0.477	0.441	0.663	0.489	0.362	0.46	0.522	0.452	0.458	0.523											
HK	90	0	0.04	0.091	0	0.07	0	0.028	0	0.003	0	0	0.022	0	0	0	0	0	0.044	0	0.033	0	0.173	0.042	0.068											
	100	0.872	0.949	0.979	0.955	0.978	0.917	0.899	0.935	0.914	0.935	0.913	0.963	0.957	0.921	0.942	0.918	0.951	0.955	0.892	0.924	0.891	0.93	0.918	0.836											
	114	0.128	0.051	0.021	0.045	0.022	0.071	0.101	0.065	0.086	0.065	0.087	0.033	0.032	0.053	0.058	0.082	0.049	0.036	0.108	0.076	0.109	0.068	0.082	0.145											
HK	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.002	0	0											
	125	0	0	0	0	0	0.012	0	0	0	0	0	0.004	0.011	0.026	0	0	0	0.009	0	0	0	0	0.018												
	87	0.02	0.033	0.017	0.034	0.018	0.015	0.037	0.014	0.018	0.013	0.021	0.007	0.013	0	0	0.006	0.026	0.022	0.023	0.06	0.03	0.014	0.008	0											
HK	100	0.944	0.951	0.966	0.966	0.976	0.961	0.951	0.949	0.974	0.975	0.938	0.978	0.97	0.959	0.967	0.974	0.974	0.973	0.974	0.927	0.97	0.966	0.963	0.972											
	110	0.035	0.016	0.017	0	0.006	0.024	0.011	0.037	0.008	0.013	0.042	0.015	0.017	0.041	0.033	0.019	0	0.004	0.003	0.013	0	0.02	0.028	0.028											



A)

B)

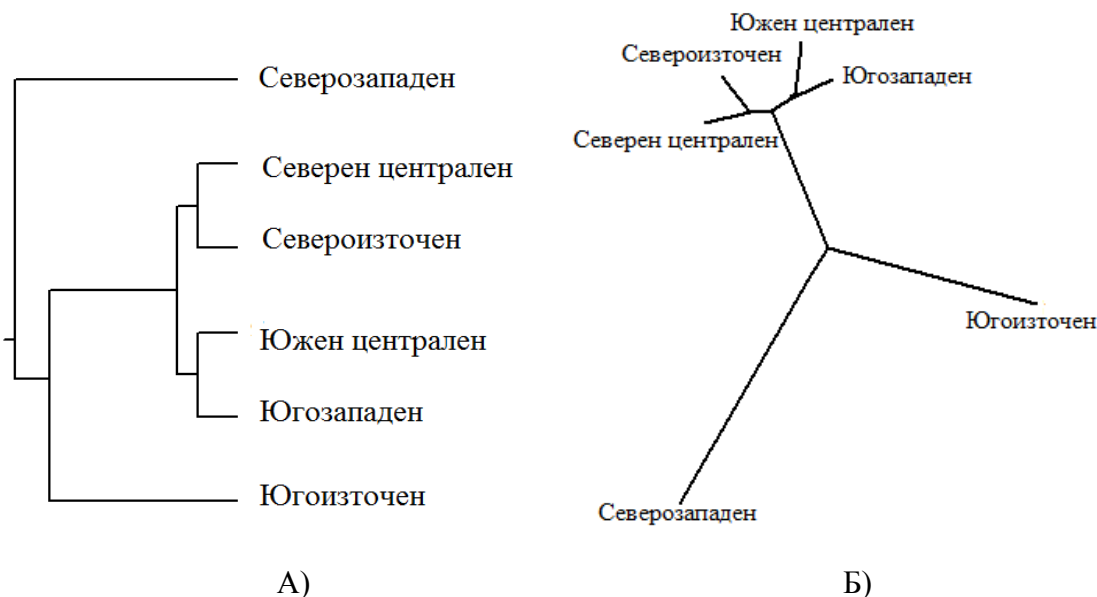
Фигура 4. UPGMA (A) и Neighbor-joining (B) дендрограми на изследваните популации по области

Допълнително, общите популации, обединяващи областите по райони, бяха филогенетично сравнени с оглед възможностите за отчитане на тенденции за генетична близост и генетична дистанция. Изчислените алелни честоти (Таблица 4) и генетични дистанции по райони позволиха построяването и на обобщени UPGMA и NJ филогенетични схеми (Фигура 5).

Таблица 4. Обобщени данни за полиморфни локуси и алелни честоти по райони

Локус	Югозападен	Южен централен	Югоизточен	Североизточен	Северен централен	Северозападен
MDH-1						
(N)	438	788	504	406	599	88
65	0.451	0.451	0.419	0.458	0.496	0.318
100	0.549	0.543	0.577	0.542	0.503	0.585
80	0	0.007	0.004	0	0.001	0.097
ME						
(N)	441	585	398	355	366	76
100	0.93	0.921	0.908	0.921	0.937	0.875
106	0.045	0.069	0.044	0.065	0.049	0.125
90	0.02	0.01	0.048	0.014	0.014	0
115	0.005	0	0	0	0	0
EST-3						
(N)	442	758	480	372	527	69
80	0.008	0.036	0.011	0.02	0.013	0
100	0.974	0.923	0.953	0.952	0.956	0.949
88	0	0	0.005	0.007	0	0.029
118	0.016	0.022	0.004	0.013	0.011	0.022
94	0.002	0.015	0.014	0.008	0	0
105	0	0.005	0.013	0	0.019	0
ALP						
(N)	386	618	385	318	550	68
80	0.517	0.513	0.403	0.539	0.585	0.537
100	0.47	0.47	0.461	0.418	0.408	0.463
90	0.013	0.017	0.136	0.042	0.006	0
PGM						
(N)	424	640	406	363	392	69
100	0.953	0.922	0.915	0.946	0.916	0.92
114	0.038	0.077	0.081	0.054	0.08	0.08
80	0	0	0.001	0	0	0
125	0.009	0.002	0.002	0	0.004	0
HK						
(N)	494	894	573	445	822	86
87	0.007	0.027	0.011	0.022	0.021	0.017
100	0.97	0.966	0.966	0.962	0.964	0.965
110	0.023	0.007	0.023	0.016	0.015	0.017

От обобщените по райони данни и построените на тяхна база филогенетични схеми е видно генетичното сходство сред „южните“ и „северните“ популации. Северозападния район е кластрират отделно. В два други кластера са позиционирани поотделно югоизточния и останалите четири района. Най-голямо е генетичното сходство, отчетено между Северен централен и Североизточен райони, от една страна, и между Южен централен и Югозападен райони, от друга. Именно тези четири района формират и двата основни субкластера в дендрограмите.



Фигура 5. UPGMA (А) и Neighbor-joining (Б) дендрограми на изследваните популации по райони

### Сравнителен алоензимен анализ на български пчелни популации и популации медоносни пчели от подвидовете *A. m. macedonica*, *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. caucasica*

При реализиране целите на настоящото проучване бе необходимо да се проведе и сравнителен изоензимен анализ на български пчелни популации и пчелни популации от подвидовете *A. m. macedonica*, *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. caucasica*.

Данните за установените алелни честоти, нивата на полиморфизъм и хетерозиготност при популациите на сравняваните подвидове са представени в Таблицы 5 и 6.

За изследваните подвидове медоносни пчели, като цяло, бе констатиран полиморфизъм по отношение на всички проучвани изоензимни системи с наличие на общо 21 алелни варианта – четири алела ( $MDH-1^{65}$ ,  $MDH-1^{80}$ ,  $MDH-1^{100}$  и  $MDH-1^{125}$ ) за *MDH-1* локуса, три – за *ME* локуса ( $ME^{90}$ ,  $ME^{100}$  и  $ME^{106}$ ), пет – за *EST-3* локуса ( $EST-3^{88}$ ,  $EST-3^{94}$ ,  $EST-3^{100}$ ,  $EST-3^{105}$  и  $EST-3^{118}$ ), три – за *ALP* ( $ALP^{80}$ ,  $ALP^{90}$  и  $ALP^{100}$ ), три – за *PGM* ( $PGM^{80}$ ,  $PGM^{100}$  и  $PGM^{114}$ ) и три – за *HK* ( $HK^{87}$ ,  $HK^{100}$  и  $HK^{110}$ ). Получените резултати сочат, че алелът  $MDH-1^{125}$  на *MDH-1* локуса присъства само в генофонда на изследваната популация от подвида *A. m. carnica*.

Алелът  $ME^{100}$  бе фиксиран в генофонда на *A. m. carnica*.  $ME^{90}$  липсваше при *A. m. carnica* и *A. m. caucasica*, а  $ME^{106}$  – при *A. m. carnica* и *A. m. ligustica*. По-рано описаните алели  $EST-3^{80}$  и  $PGM^{125}$  не бяха установени в генофонда на сравнително проучваните популации от *A. m. carnica*, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* и *A. m. macedonica*. Алелът  $HK^{87}$  бе констатиран само в генофонда на контролираната българска *A. m. macedonica* тип *rodopica*.

Таблица 5. Полиморфни локуси, алели и алелни честоти при популациите на изследваните подвидове медоносни пчели.

Локус/ Алели	<i>A. m. macedonica</i> тип <i>rodopica</i>	<i>A. m.</i> <i>macedonica</i>	<i>A. m. carnica</i>	<i>A. m.</i> <i>caucasica</i>	<i>A. m.</i> <i>ligustica</i>
MDH-1					
65	0.337	0.13	0.154	0.235	0.553
100	0.663	0.685	0.577	0.551	0.426
80	0	0.185	0.115	0.214	0.021
125	0	0	0.154	0	0
ME					
100	0.885	0.929	1	0.826	0.826
106	0.096	0.014	0	0.174	0
90	0.019	0.057	0	0	0.174
EST-3					
100	0.962	0.891	0.813	0.944	0.955
88	0	0.022	0	0	0
118	0.031	0	0.063	0.028	0
94	0.008	0.087	0	0.028	0
105	0	0	0.125	0	0.045
ALP					
80	0.547	0.524	0.111	0.24	0
100	0.453	0.476	0.722	0.38	0.778
90	0	0	0.167	0.38	0.222
PGM					
100	0.942	0.981	1	0.923	0.87
114	0.058	0.019	0	0.058	0.13
80	0	0	0	0.019	0
HK					
87	0.051	0	0	0	0
100	0.927	0.943	0.915	0.929	0.981
110	0.022	0.057	0.085	0.071	0.019

Алелът EST-3<sup>88</sup> бе открит само при *A. m. macedonica* с небългарски произход, EST-3<sup>94</sup> присъстваше в генофонда на двете популации на *A. m. macedonica* и при *A. m. caucasica*, EST-3<sup>105</sup> – при *A. m. carnica* и *A. m. ligustica*, EST-3<sup>118</sup> – при *A. m. macedonica* тип *rodopica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica*. Алелният вариант ALP<sup>90</sup> липсваше в генофонда на пчелните популации от *A. m. macedonica* с различен произход. PGM<sup>100</sup>-алелът беше фиксиран в генофонда на „*carnica*“ популацията, а PGM<sup>80</sup> присъстваше само в генофонда на „*caucasica*“ популацията (Таблица 6).

Данните от проучването сочат (Таблица 6), че за сравняваните подвидове средният брой алели за локус варира между 2.2 (*A. m. ligustica*) и 2.7 (*A. m. caucasica*). Нивото на полиморфизъм варира между 66.7% (*A. m. carnica* и *A. m. ligustica*) и 100% (*A. m. caucasica*). За *A. m. macedonica* и *A. m. macedonica* тип *rodopica* изчисленият процент на полиморфизъм е 83.3%. Получената и очаквана хетерозиготност ( $H_o$  and  $H_e$ ) варира от

0.163 (*A. m. carnica*) до 0.246 (*A. m. ligustica*) и от 0.247 (*A. m. macedonica* тип *rodopica*) до 0.326 (*A. m. caucasica*), съответно.

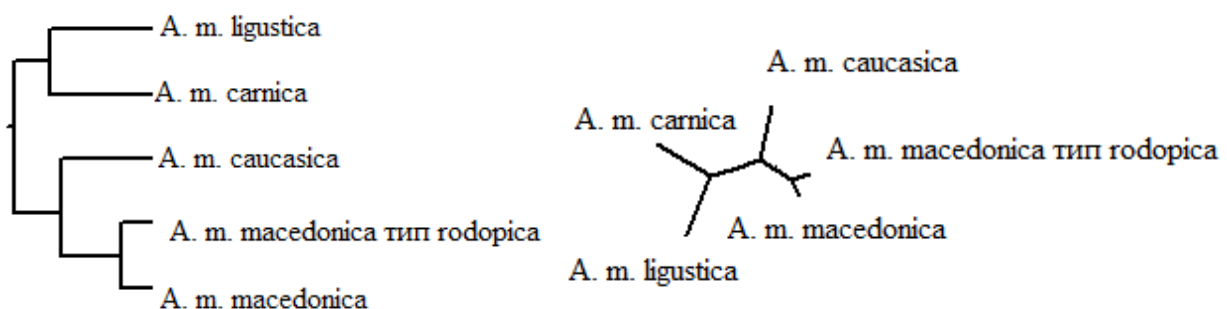
Таблица 6. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност при популациите на изследваните подвидове медоносни пчели.

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H <sub>o</sub> Получена хетерозиготност	H <sub>e</sub> Очаквана хетерозиготност
<i>A. m. macedonica</i> тип <i>rodopica</i>	2.5±0.2	83.3	0.234±0.113	0.247±0.074
<i>A. m. macedonica</i>	2.5±0.2	83.3	0.166±0.088	0.248±0.083
<i>A. m. carnica</i>	2.3±0.5	66.7	0.163±0.059	0.263±0.105
<i>A. m. caucasica</i>	2.7±0.2	100	0.234±0.109	0.326±0.101
<i>A. m. ligustica</i>	2.2±0.2	66.7	0.246±0.087	0.254±0.072

Средната изчислена стойност на показателят  $F_{ST}$  за популациите на изследваните подвидове е 0.0767, което показва, че 7.67% от констатираната генетична изменчивост е междупопулационна, а 92.33% – вътрепопулационна.

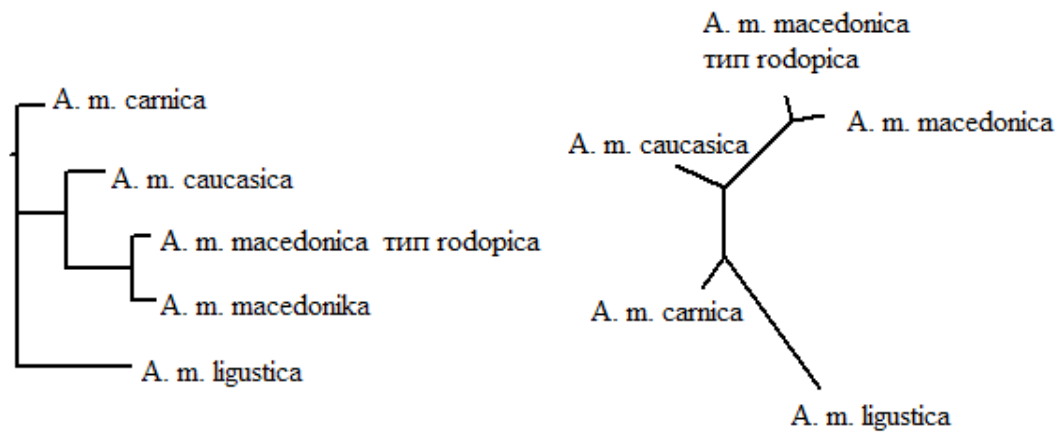
Алелните честоти за всички полиморфни локуси са използвани като база за изчисляване на генетичната дистанция по Nei (1972) между популациите на изследваните европейски подвидове и е установено, че тя варира между 0.012 (между *A. m. macedonica* и *A. m. macedonica* тип *rodopica*) и 0.087 (между *A. m. macedonica* и *A. m. ligustica*).

На базата на изчислените алелни честоти и генетичната дистанция между популациите на изследваните подвидове, са построени UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) и Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) филогенетичните схеми (Фигури 6 и 7). И в двата типа дендрограми, *A. m. macedonica* и *A. m. macedonica* тип *rodopica* са групирани в общ кластер с два субкластера, а *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica* формират три други отделни кластери.



Фигура 6. Два типа UPGMA дендрограми на изследваните подвидове

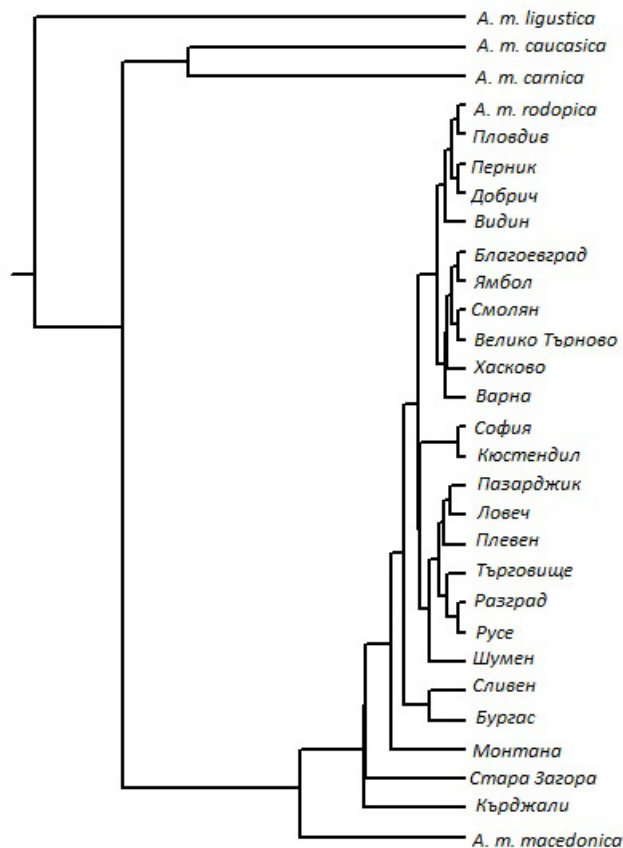
Кластрирането на всички изследвани български популации по области спрямо популациите на включените в проучването подвидове медоносни пчели, базирано на изчислените алелни честоти и установената генетична дистанция е представено на Фигура 8. Видно е, че подвидовете *A. m. caucasica*, *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. macedonica* са групирани поотделно. Всичките български популации, включително подложената на селекционен контрол *A. m. macedonica* тип *rodopica*, са групирани в общ кластер заедно с *A. m. macedonica*, но формират втори негов клон.



Фигура 7. Два типа Neighbor-joining (NJ) дендрограми на изследваните подвидове

Това, от една страна показва, че има отчетливи различия между двата произхода на подвида *A. m. macedonica*, и от друга – че е налице значимо генетично сходство между местните неконтролирани и контролирани пчелни популации, което е показател и за високо ниво на генетична консолидация на територията на страната ни.

Данните от проучването сочат, че на базата на алоензимни показатели българската медоносна пчела може да бъде отличена от останалите популации на подвида *A. m. macedonica*, а това е важно от популационно-генетична гледна точка, защото освен на териториите на Република Македония и Северна Гърция, по данни на Uzunov et al., (2014a) популации на този подвид или зони на хибридизация между него и подвида *A. m. carnica* се срещат и в някои райони на Сърбия и Албания. Данни за хибридни зони на двата подвида са коментирани и от Peseva et al. (2015) и от Георгиева (2016).



Фигура 8. UPGMA обобщена дендрограма на проучваните български и европейски популации медоносни пчели по области и подвидове

Обобщените резултати от това сравнение показват наличието на следните таксономични маркери, които биха могли да се използват при популационно-генетична диагностика на изследваните подвидове медоносни пчели: MDH-1125 – за подвида *A. m. carnica*; EST-388 за *A. m. macedonica* (с небългарски произход); PGM80 – за *A. m. caucasica*; HK87 – за *A. m. macedonica* (тип *rodopica*). Към тази група маркери може да се причисли и липсата на ALP90 в генофонда на пчелните популации от *A. m. macedonica*. От друга страна, биха могли да се отдиференцират и генетични популационни маркери, позволяващи сравнения в рамките на подвида *A. m. macedonica* и разкриващи специфични характеристики на българската медоносна пчела, а именно: отсъствие на алела MDH-180 за сметка на по-високата честота на MDH-165; по-ниска честота на срещане на EST-394 и по-висока честота на срещане на PGM114 в генофонда ѝ.

Установените на базата на проведеня сравнителен изoenзимен анализ различия между българските популации и включените в изследването европейски популации медоносни пчели е съществен принос в характеризирането на генетичната им изменчивост. Получените данни относно генетичните дистанции между изследваните неконтролирани местни популации на българската медоносна пчела и подложената на селекционен контрол и обект на национална развъдна програма *A. m. macedonica* тип *rodopica*, както и построените дендрограми, демонстрират значимо генетично сходство, което е показател и за високо ниво на генетична консолидация на територията на страната ни.

Проведеният анализ показва, че макар по морфометрични показатели българската медоносна пчела да принадлежи към подвида *A. m. macedonica*, на биохимикогенетично ниво тя би могла да бъде разграничена от популации на същия подвид с друг произход.

### Сравнителен алоензимен анализ на пчелни популации от територията на Балканския полуостров

На базата на класически морфометрични анализи е установено, че на територията на Гърция се срещат подвидовете *A. m. adami*, *A. m. macedonica*, *A. m. secropia* и *A. m. carnica* (Ruttner, 1988). Карниолските пчели, *A. m. carnica* Pollmann, са разпространени на територията бивша Югославия, южна Австрия, части от Унгария и Румъния. Подвида *A. m. macedonica* се среща в България, Македония и Северна Гърция (Ruttner, 1988). Както вече бе опоменато, Петров (1990) именува местната българска пчела като *A. m. rodopica* и това наименование е посочено като синоним на *A. m. macedonica* (Engel, 1999).

Според Ruttner (1988), *A. m. macedonica*, разпространена в Югоизточна Европа и *A. m. sicula* (*siciliana*), разпространена в централния Средиземноморския регион и Северна Африка, по някои морфометрични характеристики са сходни със западните популации на *A. m. anatoliaca*. Това мнение, както и получените резултати в изследванията на Bodur et al. (2007) относно генетичната хетерогенност на популации медоносни пчели в Турция му дава основание да определи областа на Анадола, където е естественят ареал на разпространение на *A. m. anatoliaca* като Източен генетичен център на вида *A. mellifera*. Тези обсъждания следва да се имат предвид с оглед проучване възможното генетично влияние на този подвид и на територията на Балканите, въпреки, че Петров (1997) представя по-рано от Bodur et al. (2007) друга еволюционна концепция. Разглеждайки кръг от въпроси, свързани с възможността за сравнителна оценка на медоносните пчели в България и базирайки се на съществуващите палеонтологични, палеогеографски, зоогеографски и таксономични данни, даващи представа за разпространението на пчелите от род *Apis* в различните геологични епохи, Петров прави заключението, че Балканите са вторичен център на вътрешна диференциация (Петров, 1997). Авторът



коментира сходството между българската медоносна пчела и останалите балкански подвидове и изказва мнение, че съвременната йерархична система на медоносните пчели от Югоизточна Европа отразява адаптивната реакция на вида *Apis mellifera* в условията на алопатрично географско формообразуване. Той уточнява, че е правилно да се говори за тяхното родство с прародителската форма, съхранила се по време на плейстоцена в южната част на полуострова и дала началото на съвременните таксономични единици на вида *Apis mellifera* на Балканите (Петров, 1997).

Различни генетични подходи са използвани с цел изучаване генетичното разнообразие сред популации медоносни пчели в Европа. Изоензимният анализ успешно е прилаган за характеризирани и разграничаване на отделни подвидове (Sylvester, 1982; Nunamaker et al., 1984; Sylvester, 1986; Daly, 1991), за откриването на хибридни зони между тях (Sheppard and McPheron, 1986), както и за изследване ефекта на родоначалника (Cornuet, 1979; Sheppard, 1988). Алоензимите се използват успешно за характеризирани на поведенчески (Robinson and Page, 1988, 1989; Robinson et al., 1990) и репродуктивни (Visscher, 1996) особености, за изясняване филогенетичните връзки сред подвидовете на *A. mellifera* на базата на изчислена генетична дистанция (Sheppard and Huettel, 1988) и за определяне на различията между природни (диви) и одомашнени пчелни популации (Schiff and Sheppard, 1995).

Направените в настоящото изследване и коментирани по-горе алоензимни сравнения по отношение подвидовата характеристика на българските медоносни пчели потвърждават тяхната принадлежност към подвида *A. m. macedonica*, както и наличието на отчетливи ензимни показатели, по които българските медоносни пчели биха могли да се отличат от други популации на този подвид.

Следваща стъпка от настоящото изследване бе фокусирането върху генетичната изменчивост сред популации медоносни пчели от територията на Балканския полуостров. В това сравнение бяха включени популациите, посочени на Фигура 1.

Данните относно изчислените алелни честоти, средния брой алели за локус, нивата на полиморфизъм и хетерозиготност са представени в Таблица 7. Филогенетичните връзки са представени чрез UPGMA и Neighbor-joining дендрограми, построени на базата на установените алелни честоти и генетична дистанция по Nei (1972).

Направеното проучване сочи, че ензимните системи на локусите MDH-1, ME, EST-3, ALP, PGM и HK са полиморфни в повечето от изследваните популации. Алелът EST-3<sup>100</sup> се оказва фиксиран в генофонда на популацията от Лариса I (Гърция), а ME<sup>100</sup> – в генофонда на пчелните популации от Сърбия (Таблица 7). **Алелът MDH-1<sup>125</sup> бе констатиран като наличен само в генофонда на Сръбската популация Вранье, MDH-1<sup>80</sup> – в гръцките популации (с изключение на Лариса II) и в популацията от Скопие (Република Македония), EST-3<sup>88</sup> – в Лариса II (Гърция) и Скопие, Р. Македония, HK<sup>87</sup> – в генофонда на пчелната популация Пловдив (България) и HK<sup>121</sup> – само в Сръбските популации (Врач и Вранье).** Средният брой алели за локус варираше от 2.0 (Смолян, България) до 2.5 (Лариса II, Халкидики, Кастория – Гърция, Бъло поле – Черна гора, Пловдив – България и Скопие – Република Македония). Изчисленият процент на полиморфни локуси по критерия  $P=0.95$ , варираше от 50% (Лариса II, Гърция) до 100% (Арта – Гърция, Бъло поле и Сутоморе – Черна гора и Букурещ – Румъния). Експериментално получената и очаквана хетерозиготност ( $H_o$  и  $H_e$ ) варираха от  $0.161 \pm 0.067$  (Лариса I, Гърция) до  $0.36 \pm 0.12$  (Букурещ, Румъния) и от  $0.224 \pm 0.086$  (Смолян, България) до  $0.389 \pm 0.061$  (Букурещ, Румъния), съответно.

Таблица 7. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от подвидовете *A. m. macedonica* и *A. m. sarrica* на територията на Балканския полуостров

Локус/ Алели	<i>A. m. macedonica</i>				<i>A. m. sarrica</i>				<i>A. m. macedonica</i>				
	Гърция Лариса I/II	Гърция Арта	Гърция Халкидики	Гърция Кастория	Монтенегро Бело поле/ Сутоморе	Сърбия Врач/ Вранье	Румъния Букурещ	България Пловдив	България Смолян	Република Македония Скопие			
MDH-1													
65	0.227/0.237	0.444	0.296	0.190	0.425/0.595	0.600/0.432	0.500	0.360	0.405	0.130			
80	0.091/0.000	0.222	0.222	0.036	0.000/0.000	0.000/0.000	0.000	0.000	0.000	0.185			
100	0.682/0.763	0.334	0.482	0.774	0.575/0.405	0.400/0.500	0.500	0.640	0.595	0.685			
125	0.000/0.000	0.000	0.000	0.000	0.000/0.000	0.000/0.068	0.000	0.000	0.000	0.000			
ME													
90	0.000/0.000	0.000	0.043	0.000	0.104/0.043	0.000/0.000	0.267	0.035	0.000	0.057			
100	0.900/0.958	0.804	0.957	0.978	0.833/0.935	1.000/1.000	0.700	0.879	0.935	0.929			
106	0.100/0.042	0.196	0.000	0.022	0.063/0.022	0.000/0.000	0.033	0.086	0.065	0.014			
EST-3													
80	0.000/0.000	0.027	0.027	0.000	0.000/0.025	0.027/0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
88	0.000/0.054	0.000	0.000	0.000	0.000/0.000	0.000/0.000	0.000	0.000	0.000	0.022			
94	0.000/0.054	0.000	0.000	0.000	0.000/0.000	0.000/0.000	0.000	0.016	0.000	0.087			
100	1.000/0.878	0.947	0.947	0.935	0.923/0.950	0.947/0.925	0.921	0.976	0.946	0.891			
105	0.000/0.014	0.000	0.026	0.025	0.019/0.000	0.000/0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
118	0.000/0.000	0.026	0.000	0.050	0.058/0.025	0.026/0.075	0.079	0.008	0.054	0.000			
ALP													
80	0.469/0.400	0.650	0.556	0.583	0.143/0.000	0.000/0.100	0.000	0.535	0.575	0.524			
90	0.062/0.100	0.000	0.083	0.056	0.428/0.417	0.423/0.300	0.600	0.000	0.000	0.000			
100	0.469/0.500	0.350	0.361	0.361	0.429/0.583	0.577/0.600	0.400	0.465	0.425	0.476			
PGM													
100	0.962/0.967	0.786	0.870	0.804	0.921/0.882	0.895/0.875	0.833	0.935	0.957	0.981			
114	0.038/0.033	0.214	0.130	0.196	0.079/0.118	0.105/0.125	0.167	0.065	0.043	0.019			
HK													
87	0.000/0.000	0.000	0.000	0.000	0.000/0.000	0.000/0.000	0.000	0.063	0.000	0.000			
100	0.909/0.974	0.929	0.944	0.984	0.924/0.919	0.890/0.879	0.769	0.895	0.978	0.943			
110	0.091/0.026	0.071	0.056	0.016	0.076/0.081	0.094/0.087	0.231	0.042	0.022	0.057			
21	0.000/0.000	0.000	0.000	0.000	0.000/0.000	0.016/0.034	0.000	0.000	0.000	0.000			

Изчислената средна стойност на  $F_{ST}$  бе 0.0943, което показва, че 9.43% от установената обща генетична изменчивост е между проучваните популации, а 90.57% е вътрепопулационна.

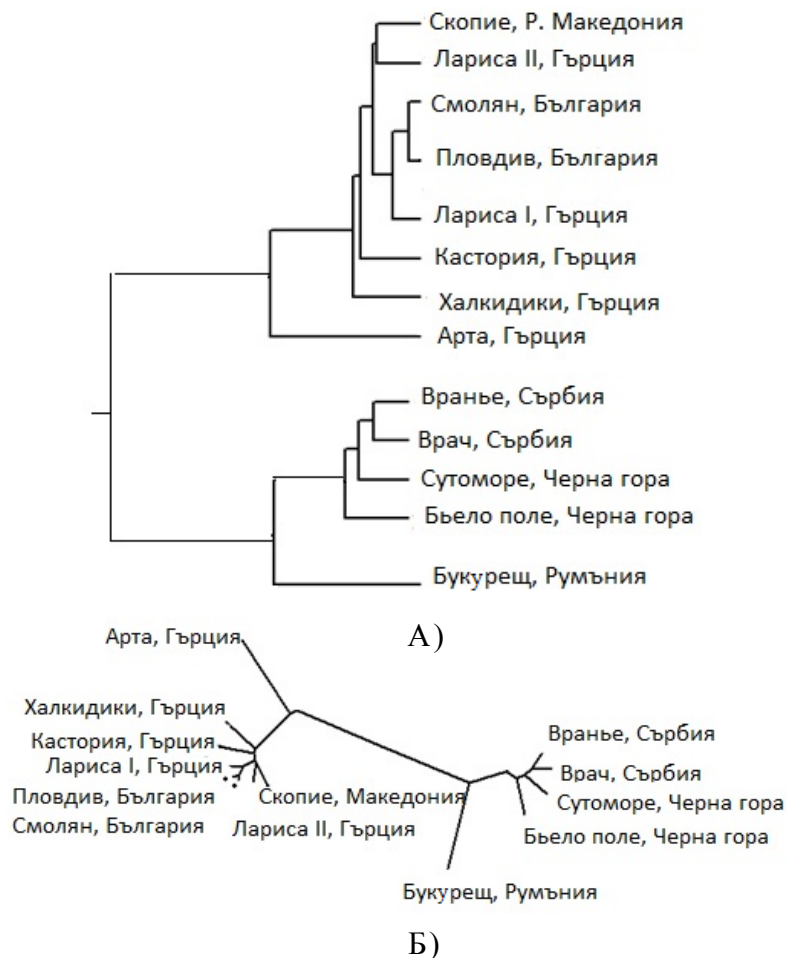
Генетичната дистанция по Nei (1972) варираше в границите от 0.001 (между сръбската популация Врач и черногорската Сутоморе) до 0.141 (между Арта – Гърция и Букурещ – Румъния).

В UPGMA и Neighbor-joining дендрограмите, популациите от България, Гърция и Македония са кластрирани отделно от популациите на Сърбия, Черна гора и Румъния. (Фигура 9), което потвърждава различната им подвидова принадлежност.

Проведеният сравнителен изoenзимен анализ дава възможност за характеризиране на изявиения полиморфизъм в проучваните пчелни популации на територията на Балканите. Общият преглед показва наличието на 22 алелни варианти по изследваните шест локуса.

**Отсъствието на MDH-1<sup>80</sup> от генофонда на българските популации е важна тяхна отличителна характеристика, която може да се използва за разграничаването им от другите популации *A. m. macedonica* от територията на Балканския полуостров.**

Характеризирайки алоензимните генетичните маркери за разграничаване на изследваните популации, заслужава да се обърне внимание и на факта, че MDH-1<sup>125</sup> алелът бе открит в генофонда само на сръбската популация Вранье (0.068). Като частен алел с честота по-висока от 0.05, той може да се използва успешно като генетичен маркер за разграничаване и на други сръбски популации, предвид представени данни от предходни изследвания на Ivanova (2010), както и като таксономичен маркер за разграничаване на популации от подвидовете *A. m. carnica* и *A. m. macedonica*. В изследваната популация от Румъния двата алела MDH-1<sup>65</sup> и MDH-1<sup>100</sup> бяха с еднакви честоти (0.5).



Фигура 9. UPGMA (А) и Neighbor-joining (Б) дендрограми на изследваните популации от подвидовете *A. m. macedonica* и *A. m. carnica* на територията на Балканския полуостров

**За отбелязване е фактът, че *EST-3<sup>88</sup>* бе открит в генофонда само на две от изследваните популации *A. m. macedonica* и липсваше в генофонда на популациите *A. m. carnica*. В този смисъл посоченият алел би могъл да се използва, както за таксономично характеризирани на подвидово ниво, така и за междупопулационни сравнения в рамките на подвида *A. m. macedonica*. Въпреки, че в проучвания на Bouga et al. (2005b) и Ivanova et al. (2010) за ALP локуса е обсъждан двуалелен полиморфизъм ( $ALP^{100}$  и  $ALP^{80}$ ) с по-висока честота на срещане за  $ALP^{80}$  алела в генофонда на изследвани гръцки и български популации на *A. m. macedonica*, в настоящото проучване бе констатирано присъствието и на трети алел –  $ALP^{90}$ , който присъстваше в генофонда на повечето от включените в изследването популации медоносни пчели, с изключение на Арта, Пловдив, Смолян и Скопие. **Тъй като този алел се срещаше с висока честота ( $> 0.420$ ) във всички изследвани популации на *A. m. carnica* и липсваше в генофонда на *A. m. macedonica* популациите от Арта, Пловдив, Смолян и Скопие Алелът, би могъл да се използва като добър генетичен маркер за междупопулационни сравнения на подвидово ниво.  $ALP^{80}$ , срещан се с висока честота в генофонда на всичките изследвани *A. m. macedonica* популации ( $0.400 - 0.650$ ) не бе открит в генофонда на популациите Сутоморе, Врач и Букурещ, а в останалите *A. m. carnica* популации бе със значително по-ниска честота ( $0.100 - 0.143$ ), което също го определя като добър популационен маркер.****

Във всички изследвани пчелни популации на двата подвида PGM локусът бе полиморфен с наличие на два алела ( $PGM^{100}$  and  $PGM^{114}$ ), което е в съгласие с резултатите от предходни изследвания на Ivanova et al. (2007, 2010). **Алелът НК<sup>87</sup> бе открит като наличен само в генофонда на българската популация Пловдив ( $0.063$ ), а алелът НК<sup>121</sup> – с ниска честота на срещане ( $< 0.05$ ) само в изследваните популации от Сърбия. По тази причина двата алела биха могли да се използват, както при сравнения между подвидовете *A. m. macedonica* и *A. m. carnica*, така и за междупопулационни сравнения на подвидово ниво.**

Получените резултати показват, че изследваните популации биха могли да се отдиференцират на базата на проведения изоензимен анализ. Най-нисък процент на полиморфизъм (50%) бе установен за популацията Лариса II (Гърция). Най-ниски стойности на експериментално получената и очакваната хетерозиготност бяха изчислени за Лариса I, Гърция ( $H_o = 0.161 \pm 0.067$ ) и за Смолян, България ( $H_e = 0.224 \pm 0.086$ ). Това, заедно с опоненатите по-горе специфични характеристики на алелно присъствие и алелни честоти по отношение на някои от анализирания локуси, позволява по-ясното отдиференциране на изследваните пчелни популации от двата подвида.

Изчислените генетични дистанции (Nei, 1972), средната стойност на фиксационния индекс  $F_{ST}$  и топологията на двете дендрограми (Фигура 9) потвърждават определената на базата на морфометрични показатели подвидова принадлежност на изследваните пчелни популации на територията на Балканския полуостров (Ruttner, 1988) и на базата на използваните в това проучване алоензимни показатели. От получените данни е видно, че популациите от Сърбия, Черна гора и Румъния са групирани заедно и принадлежат към подвида *A. m. carnica*, а популациите от България, Гърция и Република Македония, групирани в общ кластер, принадлежат към подвида *A. m. macedonica*, което е в съгласие с данните от класическия морфометричен анализ на Ruttner (1988). Заслужава внимание фактът, че гръцката популация Арта е в различен подкластер на *A. m. macedonica* групата, както и популацията от Румъния е в различен подкластер на *A. m. carnica* групата, което би могло да се тълкува и като наличие на различима генетична диференциация по отношение на тези популации не само на географски принцип, а и заради налични процеси на метизация, резултат от потока на гени в различни посоки. Този факт заслужава да бъде по-детайлно проучван занапред с оглед необходимостта да се определи точно гене-

тичния произход на тези и други пчелни популации от посочената територия и възможността за съществуване на хибридни зони между *A. m. macedonica*, *A. m. carnica* и други подвидове на *Apis mellifera*, за които има данни, че се срещат на територията на Балканския полуостров (*A. m. adami*, *A. m. secropia* и др.). В този контекст е добре да се има предвид и мнението на Engel (1999) относно ареала на разпространение на *A. m. macedonica*. Според него, анализът на проучванията сочи, че популации на този подвид могат да се открият освен в България и Македония, още в черноморското крайбрежие на Румъния, Източна Сърбия и в Северна Гърция (Engel, 1999). Получените резултати от този етап на изследването разкриват нови възможности за проучване на наследствената екологична адаптация на локалните популации *A. m. macedonica* от територията на България, Гърция и Р. Македония, при което българската пчела може да бъде генетично отдиференцирана. Твърде е вероятно популации на един и същ подвид (в случая *A. m. macedonica*) да се адаптират към конкретните екологични условия (в случая – тези на страната ни) като адаптивните промени се отразят на някои морфологични и морфометрични показатели. Тези именно промени, отчетени на базата на класически морфометричен подход, вероятно са дали основание на Петров (1990) да определи местната българска пчела като *A. m. rodopica*.

***Важно е да се акцентува върху факта, че получените в настоящото изследване резултати, от една страна, потвърждават на биохимично ниво разликите между изследваните популации на двата подвида *A. m. carnica* и *A. m. macedonica* и от друга страна предоставят отчетливи възможности за разграничаването на българската медоносна пчела от гръцките и македонските популации на *A. m. macedonica*. Установените и описани генетични маркери позволяват изследваните при сравнителен алоензимен анализ популации на двата подвида да бъдат разграничени, както на таксономично, така и на междупопулационно ниво в рамките на отделния подвид.***

***Настоящото проучване представя оригинална обобщена информация относно алоензимната генетична изменчивост сред популации медоносни пчели на територията на Балканския полуостров. Получените данни могат да се използват като база за бъдещи сравнителни популационно-генетични анализи.***

## **Българските медоносни пчели в контекста на европейската COST Action FA0803 „Prevention of honey bee colony losses – COLOSS“**

Международната COLOSS (Prevention of Colony LOSSes) асоциация обединява изследователи на медоносните пчели от Европа и света. Тя е сформирана на базата на европейската COST Action FA0803 и функционира организирано през периода от 2008 до 2013 г. с основната цел да подпомогне сътрудничеството при изследване на различни аспекти, засягащи здравния статус на медоносните пчели (*Apis mellifera* L.) и причините за загубата на пчелни семейства в световен мащаб. В рамките на тази международна мрежа е създадена и работна група 4 „Изменчивост и жизненост“ (WG4 – Diversity and Vitality), дейностите на която са фокусирани върху връзката между генетичната изменчивост и жизнеността на медонските пчели и са свързани с доказване на хипотезата, че здравето на пчелното семейство зависи от генотипа му и от неговата адаптация към условията на конкретната среда, която включва не само климат и растителност, но също и преобладаващи болести, замърсяване с пестициди, селекционни дейности и др. Във връзка с това, за периода 2009 – 2012 г., бе проведен общ експеримент (Costa et al., 2012) със стандартизирани протоколи и с основна цел да проучи, как взаимовръзката „генотип – околна среда“ (GEI: genotype – environment – interactions) повлиява преживяването, оцеляването и здравния статус на пчелни семейства с различен европейски

произход. В експеримента бяха включени генотипи на пет европейски подвида – *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. macedonica*, *A. m. mellifera* и *A. m. siciliana*, представени от общо 16 различни генетични произхода (селектирани линии или местни популации, подложени на консервационни дейности с цел опазването им). В рамките на експеримента сравненията бяха направени на базата на класическа и геометрична морфометрия, алоензимен, ДНК митохондриален и ДНК микросателитен анализи (Meixner et al., 2013; Francis et al., 2014). Предвид целите на настоящото проучване, получените резултати от включения в европейския GEI експеримент алоензимен анализ са ценно постижение, защото за първи път предоставят възможността с еднакъв подход да се сравнят популации медоносни пчели от територията на Европа.

Както вече бе отбелязано, изоензимите като ядрени генетични маркери са доказано средство за изучаване на вътре- и междупопулационната генетична изменчивост сред популации медоносни пчели, принадлежащи към различни подвидове. Данните от изоензимния анализ се използват, както за изясняване на подвидовата дискриминация, така и за разкриването на хибридни зони между отделните подвидове на *A. mellifera*.

Литературните данни сочат, че за нуждите на популационно-генетичния анализ при медоносните пчели са използвани разнообразни електрофоретични подходи. Обект на проучване е бил полиморфизмът по редица изоензимни системи, при което е констатирано наличието на два до шест алелни варианта за отделните проучвани локуси в генофонда на различни европейски популации медоносни пчели. (Bouga et al., 2005b; Kandemir et al., 2005; Ivanova et al., 2007; Ivanova et al., 2010a,b,c; Ivanova et al., 2011; Meixner et al., 2013; Francis et al., 2014). В настоящото изследване, чрез проучването на полиморфизма по шест алоензимни локуса – MDH, ME, EST, ALP, PGM и НК (стандартизиран подход по Meixner et al., 2013), се цели установяването на надеждни алоензимни диагностични маркери за документиране и характеризиране на генетичната изменчивост в европейски популации, принадлежащи към различни подвидове на *A. mellifera* с различни произходи от териториите на европейските държави, включени в общия GEI експеримент на COLOSS WG4.

Данните от проведеното сравнително алоензимно проучване показва, че всички от изследваните локуси са полиморфни за по-голяма част от изследваните популации. Бе установено наличието на три алела по отношение на MDH-1 локуса (MDH-1<sup>65</sup>, MDH-1<sup>80</sup> и MDH-1<sup>100</sup>), три алела по ME локуса (ME<sup>90</sup>, ME<sup>100</sup> и ME<sup>106</sup>), седем алела – по EST-3 локуса (EST-3<sup>80</sup>, EST-3<sup>88</sup>, EST-3<sup>94</sup>, EST-3<sup>100</sup>, EST-3<sup>105</sup>, EST-3<sup>118</sup> и EST-3<sup>130</sup>), три алела – по ALP локуса (ALP<sup>80</sup>, ALP<sup>90</sup> и ALP<sup>100</sup>), два алела по PGM локуса (PGM<sup>100</sup> и PGM<sup>114</sup>) и три алела по НК локус (НК<sup>87</sup>, НК<sup>100</sup> и НК<sup>110</sup>).

Детайлите от получените в това сравнително изследвани резултати относно алелните честоти, средния брой алели за локус, процента на полиморфните локуси (P=0.95), получената (Ho) и очаквана (He) хетерозиготност са представени в Таблицы 8 и 9. На фигурите 10 и 11, чрез UPGMA и Neighbor-joining дендрограми, са представени филогенетичните връзки между изследваните популации по произходи от различните подвидове на *Apis mellifera*.

Резултатите от изоензимното проучване на генетичния полиморфизъм, установен в пчелните популации с различен европейски произход и различна подвидова принадлежност показват някои специфични характеристики. Въпреки, че алелите ME<sup>100</sup>, EST<sup>100</sup>, PGM<sup>100</sup> и НК<sup>100</sup> бяха с най-висока честота на срещане в генофонда на всички изследвани популации, MDH-1 и ALP локусите имаха различни по-често срещани алели. В генофонда на популациите от подвидовете *A. m. macedonica*, *A. m. carnica* с произход Полша и *A. m. siciliana* с по-висока честота на срещане бе алелът MDH-1<sup>100</sup>, в генофонда на популациите от подвида *A. m. mellifera* с произход Дания и Полша по-често срещаният алел бе MDH-1<sup>80</sup> и в генофонда на популациите от подвида *A. m. car-*

*nica* с произход Германия, Хърватия и Австрия, и подвида *A. m. ligustica* с по-висока честота се срещаше алелът MDH-1<sup>65</sup>. По отношение на ALP локуса бе установено, че алелът ALP<sup>80</sup> е с по-висока честота на срещане в генофонда на популациите от подвидовете *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. siciliana* и *A. m. macedonica* с произход България. Двата алела бяха с еднаква честота при *A. m. macedonica* с произход Република Македония, а алелът ALP<sup>100</sup> – с по-висока честота в популациите на *A. m. macedonica* от Гърция и *A. m. carnica* – от Полша. Алелът ALP<sup>90</sup> се срещаше със значително по-ниска честота или липсваше в генофонда на *A. m. macedonica* (Таблица 8).

При огледа на получените резултати в GEI сравнителната схема, бяха направени още някои важни констатации. По отношение на MDH-1 локуса бе установено, че алелът MDH-1<sup>80</sup> отсъства в генофонда на популациите *A. m. macedonica* от България и Република Македония. Относно ME локуса бе установено, че алелът ME<sup>106</sup> отсъства в генофонда на *A. m. carnica* от Германия-2, *A. m. mellifera* от Франция и Дания, *A. m. ligustica* от Финландия и *A. m. siciliana* – популации, в генофонда на които ME<sup>90</sup> алелът се среща с честота от порядъка на 0.019 до 0.276. Във всички останали изследвани популации ME<sup>106</sup> беше наличен и честотата му варираше между 0.018 и 0.19. Проучването на полиморфизма по EST-3 локуса показва, че алелът EST-3<sup>80</sup> присъства само в генофонда на популацията *A. m. mellifera* от Дания (0.026), а алелът EST-3<sup>130</sup> (0.043) – само в генофонда на популацията *A. m. ligustica* от Италия. Макар и с ниска честота на срещане (<0.05), присъствието на двата частни алела в генофонда на посочените популации, ги отличава от останалите европейски популации и следва да се има предвид при последващи сравнителни анализи. Алелът EST-3<sup>88</sup> бе констатиран като наличен в генофонда на популациите *A. m. carnica* от Полша-2, Германия-1 и Австрия, както и в популацията на подвида *A. m. macedonica* с произход Гърция. Алелът EST-3<sup>94</sup> бе открит в популациите на *A. m. carnica* от Полша и *A. m. macedonica* от България и Гърция. Алелният вариант EST-3<sup>105</sup> присъстваше в генофонда на популациите от подвида *A. m. carnica* с произход Полша-2 и подвида *A. m. mellifera* с произход Дания и Полша и в генофонда на популациите *A. m. ligustica* и с ниска честота при *A. m. macedonica* с произход Гърция. Алелът EST<sup>118</sup> бе установен като наличен в генофонда на по-голямата част от изследваните популации (Таблица 11). Локусът ALP бе полиморфен с триалелна система на унаследяване в по-голямата част от изследваните европейски популации, с изключение на *A. m. carnica* от Австрия (където ALP<sup>80</sup> и ALP<sup>90</sup> алелите бяха с еднаква честота) и *A. m. macedonica* от България и Република Македония (където ALP<sup>100</sup> и ALP<sup>80</sup> бяха със сходна или еднаква честота, респективно). По отношение на PGM локуса бе констатирано, че PGM<sup>100</sup> алелът е фиксиран в генофонда на популацията от подвида *A. m. siciliana*.

Таблица 8. Алелни честоти по локуси за изследваните европейски популации на *Apis mellifera*

Локус	Попу- ляция	А.т.саміса Полша 1	А.т.саміса Полша 2	А.т.саміса Германия 1	А.т.саміса Германия 2	А.т.самі са Хърва- тия	А.т.самі са Австрия	А.т.меліф ега Франция	А.т.меліф ега Дания	А.т.меліф ега Полша	А.т.ігуств іса Финлан- дия	А.т.ігуств іса Италия	А.т.мас едоніса Р.Маке- дония	А.т.мас едоніса Гърция	А.т.мас едоніса Бълга- рия
MDH-1	Алели	65	0.4	0.079	0.837	0.756	0.609	0.386	0.022	0.293	0.674	0.598	0.348	0.227	0.337
	100	0.52	0.789	0.457	0.13	0.156	0.283	0.25	0.244	0.13	0.283	0.239	0.652	0.682	0.663
	80	0.08	0.132	0.033	0.033	0.089	0.109	0.364	0.733	0.576	0.043	0.163	0	0.091	0
ME	100	0.891	0.9	0.886	0.957	0.944	0.81	0.933	0.813	0.94	0.724	0.833	0.93	0.958	0.885
	106	0.109	0.1	0.114	0	0.056	0.19	0	0	0.06	0	0.119	0.018	0.042	0.096
	90	0	0	0	0.043	0	0	0.067	0.188	0	0.276	0.048	0.053	0	0.019
EST-3	80	0	0	0	0	0	0	0	0.026	0	0	0	0	0	0
	100	0.974	0.853	0.826	0.826	0.83	0.924	0.87	0.947	0.967	0.848	0.739	0.978	0.94	0.962
	88	0	0.029	0.163	0	0	0.022	0	0	0	0	0	0	0.024	0
	118	0	0	0.011	0.174	0.17	0.054	0.13	0	0	0.076	0.087	0.022	0	0.031
	94	0.026	0.029	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.024	0.008
	105	0	0.088	0	0	0	0	0	0.026	0.033	0.076	0.13	0	0.012	0
ALP	130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.043	0	0	0
	80	0.389	0.324	0.25	0.405	0.429	0.5	0.413	0.543	0.522	0.44	0.714	0.528	0.4	0.547
	100	0.407	0.5	0.25	0.238	0.238	0	0.196	0.174	0.217	0.23	0.071	0.111	0.5	0.453
	90	0.204	0.176	0.5	0.357	0.333	0.5	0.391	0.283	0.261	0.33	0.214	0.361	0.1	0
	100	0.935	0.913	0.872	0.911	0.903	0.848	0.935	0.958	0.968	0.75	0.579	0.981	0.947	0.942
HK	114	0.065	0.087	0.128	0.089	0.097	0.152	0.065	0.042	0.032	0.25	0.421	0.019	0.053	0.058
	87	0.017	0.016	0	0	0	0.162	0.022	0.174	0.05	0	0.138	0	0	0.051
	100	0.983	0.984	0.909	0.946	0.984	0.838	0.978	0.826	0.9	0.864	0.759	0.919	0.974	0.927
	110	0	0	0.091	0.054	0.016	0	0	0	0.05	0.136	0.103	0.081	0.026	0.022



Полиморфният хексокиназен локус (НК) бе с три алелни варианта (НК<sup>87</sup>, НК<sup>100</sup> и НК<sup>110</sup>) в популациите на *A. m. mellifera* от Полша, *A. m. ligustica* от Италия и *A. m. macedonica* от България.

**Отчетените тук характеристики са значими затова, защото биха могли да се използват успешно като подходящи алоензимни генетични маркери за сравнителни междупопулационни изследвания при медоносните пчели, както в България, така и в Европа. Заедно с морфометрични показатели и в комплекс с разнообразни ДНК анализи биха могли да са съществена част от цялостна система за разграничаване и генетично характеризиране на включените в това изследване европейски подвидове *A. mellifera*.**

Таблица 9. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност за изследваните европейски популации *Apis mellifera*

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H <sub>o</sub> Получена хетерозиготност	H <sub>e</sub> Очаквана хетерозиготност
<i>A. m. carnica</i> Полша 1	2.3±0.2	66.7	0.232±0.095	0.273±0.111
<i>A. m. carnica</i> Полша 2	2.7±0.3	83.3	0.238±0.054	0.274±0.085
<i>A. m. carnica</i> Германия 1	2.5±0.2	100	0.268±0.079	0.344±0.08
<i>A. m. carnica</i> Германия 2	2.3±0.2	83.3	0.235±0.065	0.266±0.088
<i>A. m. carnica</i> Хърватия	2.3±0.2	83.3	0.261±0.084	0.278±0.094
<i>A. m. carnica</i> Австрия	2.3±0.2	100	0.264±0.089	0.345±0.064
<i>A. m. mellifera</i> Франция	2.3±0.2	83.3	0.262±0.109	0.307±0.114
<i>A. m. mellifera</i> Дания	2.5±0.2	83.3	0.239±0.075	0.3±0.08
<i>A. m. mellifera</i> Полша	2.5±0.2	66.7	0.308±0.14	0.271±0.105
<i>A. m. ligustica</i> Финландия	2.5±0.2	100	0.286±0.049	0.403±0.061
<i>A. m. ligustica</i> Италия	3±0.3	100	0.374±0.071	0.439±0.037
<i>A. m. siciliana</i> Италия	2.2±0.3	83.3	0.206±0.092	0.297±0.091
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	2.2±0.2	66.7	0.155±0.071	0.223±0.086
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	2.5±0.3	66.7	0.2±0.096	0.219±0.088
<i>A. m. macedonica</i> България	2.5±0.2	83.3	0.234±0.113	0.247±0.074

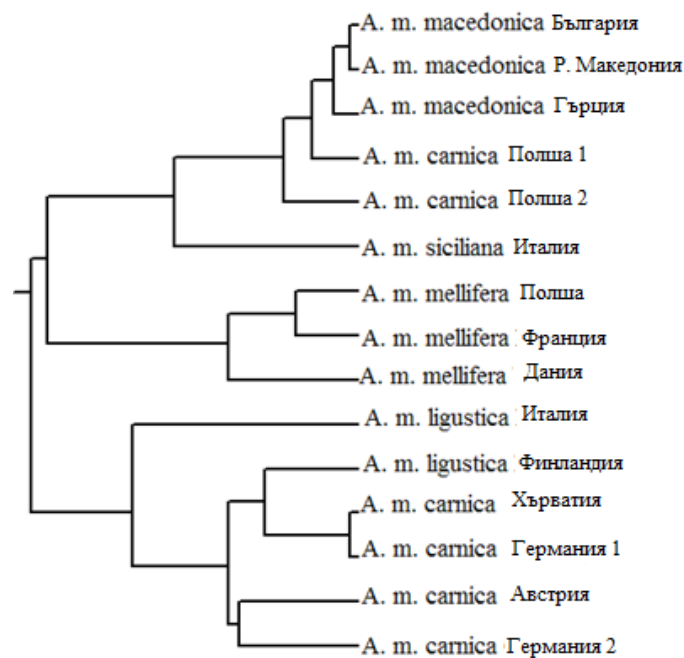
Както е видно от Таблица 9, в настоящото проучване средният брой алели за локус варираше от 2.2 (*A. m. siciliana* с произход Италия и *A. m. macedonica* с произход Република Македония) до 2.7 (*A. m. carnica* с произход Полша-2). Изчисленият процент на полиморфни локуси бе в диапазона от 66.7% до 100%. Получената и очаквана хетерозиготност ( $H_o$  и  $H_e$ ) бяха в границите от 0.155 (*A. m. macedonica* с произход Република Македония) до 0.374 (*A. m. ligustica* с произход Италия) и от 0.219 (за *A. m. macedonica* от Гърция) до 0.439 (за *A. m. ligustica* от Италия), респективно.

При проведения анализ не бяха констатирани значителни отклонения в генотипните честоти съобразно закона на Харди-Вайнберг по повече от изследваните локуси за по-голямата част от включените в изследването популации ( $P \geq 0.05$ ).

Изчисленият на базата на изоензимния анализ коефициент  $F_{ST}$  беше 0.133, което показва, че 13.3% констатираната обща генетична изменчивост е междупопулационна, за разлика от вътрепопулационната, която се равнява на 86.7%.

Генетичната дистанция по Nei (1972) варираше в границата от 0.002 (между *A. m. macedonica* от България и от Република Македония и между *A. m. carnica* от Хърватия и от Германия-2 до 0.167 (между *A. m. carnica* с произход Германия-2 и *A. m. mellifera* с произход Дания).

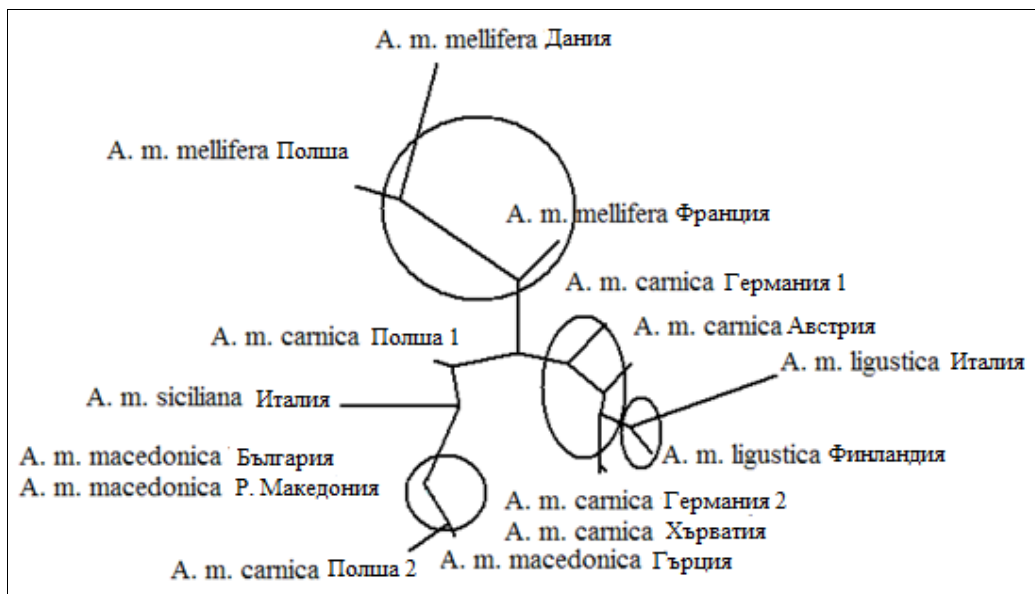
В UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) и Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) дендрограмите бяха формирани три основни кластера с шест субкластера (Фигури 10 и 11), които показваха ясно разграничаване на популациите от различните подвидове на *A. m. mellifera*.



Фигура 10. UPGMA дендрограма на анализираните европейски популации на *Apis mellifera*, базирана на алоензимен анализ

И от двете фигури е видно ясното кластриране на *A. m. macedonica* (с произход България, Гърция и Р. Македония), *A. m. carnica* (с произход Германия, Австрия и Хърватия) и *A. m. mellifera* (с произход Дания, Франция и Полша) популациите. В отделни подкластери са *A. m. ligustica* и *A. m. siciliana* с произход Италия. На базата на получените алоензимни резултати по отношение на *A. m. carnica* от Полша и *A. m. ligustica* от Финландия има достатъчно основания да се коментира възможен хибриден произход и определени нива на метизация с поток на гени в посока от *A. m. macedonica* към *A. m. car-*

*nica* от Полша и от *A. m. carnica* към *A. m. ligustica* от Финландия. В построените филогенетични схеми тези популации са разположени в близост до *A. m. macedonica* и *A. m. carnica* групите, съответно.



Фигура 11. Neighbor-joining дендрограма на анализираните европейски популации *Apis mellifera*, базирана на алоензимен анализ

С оглед по-голяма прецизност на направените сравнения, базирани на алоензимния анализ, получените резултати от GEI експеримента бяха обработени и със софтуерния продукт GenAEx v.6.42 (Peakall and Smouse, 2006), което позволи прилагането на асигнационния тест (тест за принадлежност) по отношение на изследваните подвидове и генетични произходи. Данните за направените сравнения по двойки ясно разграничават медоносните пчели от подвида *A. m. macedonica* с произход България от различните генетични произходи на останалите подвидове, включени в сравнението – *A. m. mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. siciliana* и *A. m. carnica*, както и близостта на *A. m. macedonica* с произходи България, Република Македония и Гърция. Изключение правят данните от теста за принадлежност на *A. m. macedonica* с произход България и *A. m. carnica* с произход Полша (1 и 2), които показват значително сходство сред изследваните индивиди от двете групи – факт, коментиран и по-рано на базата на построените UPGMA и NJ филогенетични схеми и навеждащ на мисълта за хибриден произход на полските популации медоносните пчели, включени в европейския GEI експеримент като принадлежащи към подвида *A. m. carnica*.

**Данните от направения сравнителен алоензимен анализ по схемата на европейския GEI експеримент показват ясното разграничение на изследваните пчелни популации по подвидове. Българска медоносна пчела, макар и кластрирана в общ кластер с другите популации на подвида *A. m. macedonica* от Гърция и Р. Македония формира отделен субкластер и може да се разграничи на биохимикогенетично ниво от тях. Шестте изследвани алоензимни групи успешно биха могли да се прилагат при междупопулационни анализи по отношение на всички, включени в настоящото проучване подвидове на *Apis mellifera* и при характеризиране на микроеволюционна диференциация на подвидово ниво. Установеното аелно разнообразие, както и описани значими разлики в честотата на срещане на определени аели в генофонда на проучваните пчелни популации, са важен оригинален принос в характеризиране на генетичния им полиморфизъм.**

## II. Митохондриален ДНК анализ – mtDNA

Както вече бе коментирано, напоследък при популационно-генетични анализи на медоносни пчели с различен подвидов статус и с различен произход се прилагат разнообразни генетични подходи. Освен алоензимният метод (Nunamaker and Wilson, 1982; Badino et al., 1988 и др.), митохондриалният ДНК анализ (Moritz et al., 1986; Smith et al., 1989; Smith 1991; Hunt and Page, 1992; Garnery et al., 1993; Oldroyd et al., 1995; Arias and Sheppard, 1996; Pedersen, 1996; De la Rúa et al., 2000; Bouga et al., 2005a и др.) и разнообразни ядрени ДНК подходи, включително микросателити (Estoup et al., 1993; Garnery et al., 1998a), се използват за характеризиране на генетичното разнообразие сред подвидовете и екотипозите на *A. mellifera*.

Митохондриалният геном се определя като изключително подходящ за популационно-генетични проучвания на вида *A. mellifera*, както и за провеждането на филогенетични сравнения и анализи по отношение на целия род *Apis*.

Майчината наследственост, проявена чрез mtDNA при медоносните пчели, се характеризира с това, че всички работнички и търтеи в пчелното семейство споделят митохондриалния ДНК хаплотип на пчелната майка (Meusel and Moritz, 1993).

Вариантите на mtDNA, както и морфометричните показатели при медоносните пчели се свързват понастоящем с характеризиране на биогеографското им райониране и допринасят за разграничаването на описаните по-рано еволюционни групи на *Apis mellifera* (Smith and Brown, 1988, 1990; Cornuet et al., 1991). Методите на хибридизация при селекцията могат да повлияят разпределението на mtDNA варианти, характерни за генофонда на местните популации. Промените от такова естество, засегнали популационната структура (особено интрогресията), не могат да бъдат разкрити чрез морфометричните проучвания (Bouga et al., 2005a). Тъй като всички индивиди от пчелното семейство нормално имат еднакъв хаплотип, редица автори приемат mtDNA като идеален маркер за популационно-генетични изследвания. При прилагането на митохондриалния ДНК анализ обаче, трябва да се има предвид, че резултатите могат да се повлияят значимо от вноса на пчелни майки с различен произход и от практикуването на подвижно пчеларство – фактори, действащи върху генетичната структура на локалните популации чрез генетичната интрогресия (Garnery et al., 1998a).

Важно при прилагането на този генетичен анализ е възможността различните хаплотипове да бъдат разграничени и групирани в съответствие с класическите морфологични анализи (Ruttner et al., 1978) и географското разпространение на подвидовете *A. mellifera* (Smith, 1991; Garnery et al., 1992).

В хода на нашето проучване на митохондриален ДНК анализ бяха подложени девет местни популации медоносни пчели на подвида *A. m. macedonica* с местообитания на територията на цялата страна (Фигура 3.).

Бе установено, че размерът на PCR амплифицираните mtDNA сегменти за всички изследвани популации на българската медоносна пчела е от порядъка на 964 базови двойки (bp), 1028 bp и 822 bp за 16s rDNA, COI, и ND5 генните сегменти, съответно. По отношение на рестрикционните ензими, използвани за амплифицирания 16s rDNA генен сегмент, бе констатирано, че за *Sau3A* I, *Ssp* I, *Hinc* II и *EcoR* I е отчетено наличието на един разпознаваем фрагментационен сайт. По отношение на COI генния сегмент бе установено, че за *Sau3A* I е отчетено наличието на три фрагментационни сайта за разпознаване, а за *Fok* I и *Bcl* I – на два. По отношение на ND5 генния сегмент, за *Dra* I и *Taq* I бяха констатирани два сайта на разпознаване, за *Nla* III – един и за *Ssp* I – три. За включените в този анализ български популации на *A. m. macedonica* не бе установена вътре и междупопулационна изменчивост. Фрагментните образци от всеки рестрикционен ензим за трите mtDNA сегмента са представени в Таблицы 10 – 12.

Таблица 10. Размери (в базови двойки – bp) на фрагментните образци, установени по отношение на 16s rDNA гена в анализираниите български популации на подвида *A. m. macedonica*

<i>Sau3A I</i>	<i>Ssp I</i>	<i>Dra I</i>	<i>Hinc II</i>	<i>EcoR I</i>
B	A	A	A	A
548	628	964	598	492
416	336		366	472

Липсата на изменчивост, установена на базата на проведения mtDNA анализ контрастира на установения чрез алоензимния метод полиморфизъм, както вътре в изследваните популации на българската медоносна пчела, така и между тях. Това несъответствие между митохондриалната и ядрена изменчивост би могло да се дължи на различните модели на трансмисия и еволюция на тези генетични системи (Moritz et al., 1986; Avise, 1994).

Таблица 11. Размери (в базови двойки – bp) на фрагментните образци, установени по отношение на COI гена в анализираниите български популации на подвида *A. m. macedonica*

<i>Nco I</i>	<i>Sau3A I</i>	<i>Fok I</i>	<i>Bcl I</i>	<i>Ssp I</i>	<i>Sty I</i>	<i>BstU I</i>	<i>Xho I</i>
B	A	A	A	A	A	B	A
1028	371	476	465	1028	1028	1028	1028
	349	425	326				
	280	127	237				
	28						

Таблица 12. Размери (в базови двойки – bp) на фрагментните образци, установени по отношение на ND5 гена в анализираниите български популации на подвида *A. m. macedonica*

<i>Dra I</i>	<i>Taq I</i>	<i>Nla III</i>	<i>Hinc II</i>	<i>Fok I</i>	<i>Ssp I</i>
A	A	A	A	A	A
429	375	585	822	822	385
285	258	237			206
108	189				124
					107

Сравнявайки резултатите от този анализ с аналогични, представени от Bouga et al. (2005a) и Harizanis et al. (2006), може да се направи заключението, че изследваните български популации медоносни пчели на подвида *A. m. macedonica* се различават от гръцките. **Диагностичните модели, описани за местните популации на *A. mellifera macedonica* в Гърция по отношение на COI сегмента след въздействие с рестрикционните ензими *Sty I* и *Nco I* (Bouga et al., 2005b), не бяха открити в митохондриалните образци на българските популации.** При сравняване на получените в това изследване резултати с дните от проучванията на Bouga et al. (2005a) бяха отчетени различия между българските и гръцките популации на *A. m. macedonica* и по отношение на диагностичните образци на COI след въздействие с *Ssp I*, както и по отношение на ND5 генния сегмент след въздействие с *Hinc II* и *Fok I* рестрикционните ензими. Предвид получените в настоящото изследване резултати и сравнението им с данни, публикувани от Kekecoglu et al. (2009) относно генетични проучвания на пчелни популации от тери-

торията на Турция, интересен се оказа фактът, че *Dra I* няма рестрикционен сайт в 16s rDNA генния сегмент на анализирания български и турски популации. Това сходство следва да е обект и на следващи по-детайлни генетични сравнения с оглед определяне степента му на проява.

При сравнителното обсъждане на резултатите от нашето проучване и литературните данни, следва да се имат предвид и заключенията на Martimianakis et al. (2011), базирани на митохондриален ДНК анализ по COI и ND5 митохондриалните гени и засягащи филогенетичните връзки между пчелни популации от Албания, България, Кипър, Гърция, Италия, Словения и Турция. Данните от изследването ясно кластрират българските популации в групата на *A. m. macedonica*. По отношение на коментирания диагностични митохондриални ДНК образци за българските и гръцките популации, това проучване е в съгласие с по-рано направените изводи от Ivanova and Bouga (2009) и от Ivanova et al. (2010) относно наличието на специфични генетични характеристики, отличаващи българските популации на *A. m. macedonica*. От друга страна, включените в изследването на Martimianakis et al. (2011) български популации, независимо от сходството по отношение липсата на *Dra I* рестрикционен сайт в 16s rDNA генния сегмент, отчетливо се различават от включените в анализа пчелни популации от територията на Турция, определени като принадлежащи към *A. m. anatoliaca* и към *A. m. carnica* от турския тракийски район.

### III. Микросателитен ДНК анализ

Микросателитният ДНК анализ е сред най-предпочитаните и прилагани напоследък подходи за изучаване на генетичната изменчивост в рамките на популациите, за характеризиране на генофонда и генотипната им структура, както и за характеризиране на филогенетичните връзки между тях.

Като предпочитани генетични маркери, микросателитите успешно се използват за характеризиране на специфични генетични особености в популациите, за сравнителни популационно-генетични анализи, като маркери за генетично картиране, както и за доказване на генетична принадлежност. Българските медоносни пчели са проучвани на базата на микросателитен ДНК анализ по 9 микросателитни локуси от Николова (2011). В проучването си авторката прави популационно-генетична характеристика на пчелни популации от страната и установява микросателитни генетични маркери, които могат да се използват и като диагностични.

Участието на България в европейската COST акция FA0803 COLOSS и европейския GEI експеримент на WG4 „Diversity and vitality“ позволи включването на проби медоносни пчели от България в значимо сравнително генетично проучване и предостави възможност българските медоносни пчели да бъдат популационно-генетично характеризирани и филогенетично сравнени с всички европейски подвидове на *Apis mellifera* на базата на разнообразни подходи, включително и микросателитен ДНК анализ по 24 микросателитни локуса.

Като вече бе уточнено настоящото проучване предвижда провеждането на сравнителни анализи по две схеми: 1) сравнение на неконтролирани пчелни популации, съставени от пчели-работнички от различни локални популации на територията на дадена страна, принадлежащи към подвида *A. m. macedonica* с произход България (обозначена в таблиците и фигурите като *A. m. macedonica* Bg), Гърция (*A. m. macedonica* Gr) и Република Македония (*A. m. macedonica* Mac) с референтни данни за подвидовете *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera*, *A. m. anatoliaca* и 2) сравнение на включени в европейския GEI експеримент контролирани местни популации на *A. m. macedonica*, както следва: *A. m. macedonica* B, селекционно контролирана и предоставена от Научната база по пчеларство на Аграрен университет – Пловдив, България; *A. m. macedonica* G – Гръцки национален институт по пчеларство – Солун, Гърция и *A. m. macedonica* M – Научна

база по пчеларство към Скопски университет, Република Македонија с референтни данни за подвидовете *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* и *A. m. anatoliaca*.

Таблица 13. Полиморфизъм по **A8** локуса: алели и алелни честоти

Локус A8	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>ana-</i> <i>tol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	<b>162</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	<b>165</b>	0.000	0.000	0.023	0.024	0.081	0.798	0.007	0.000	0.019	0.000
3.	<b>173</b>	0.000	0.042	0.091	0.048	0.014	0.096	0.147	0.038	0.019	0.167
4.	<b>175</b>	0.227	0.167	0.261	0.024	0.014	0.000	0.610	0.115	0.212	0.250
5.	<b>176</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6.	<b>177</b>	0.523	0.583	0.432	0.571	0.203	0.058	0.154	0.519	0.558	0.333
7.	<b>179</b>	0.068	0.167	0.091	0.071	0.432	0.000	0.037	0.019	0.077	0.167
8.	<b>181</b>	0.182	0.042	0.091	0.262	0.216	0.029	0.044	0.308	0.115	0.083
9.	<b>183</b>	0.000	0.000	0.011	0.000	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Таблица 14. Полиморфизъм по **A14** локуса: алели и алелни честоти

Локус A14	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>ana-</i> <i>tol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	<b>108</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	<b>110</b>	0.625	0.792	0.682	0.810	0.639	0.375	0.150	0.444	0.556	0.667
3.	<b>112</b>	0.292	0.208	0.307	0.167	0.014	0.034	0.793	0.500	0.389	0.333
4.	<b>114</b>	0.042	0.000	0.011	0.000	0.028	0.227	0.050	0.037	0.019	0.000
5.	<b>116</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.102	0.007	0.000	0.000	0.000
6.	<b>118</b>	0.042	0.000	0.000	0.024	0.069	0.227	0.000	0.019	0.000	0.000
7.	<b>120</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.019	0.000
8.	<b>122</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.019	0.000

Таблица 15. Полиморфизъм по **A24** локуса: алели и алелни честоти

Локус A24	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	<b>96</b>	0.000	0.000	0.000	0.048	0.162	0.731	0.021	0.019	0.019	0.000
2.	<b>101</b>	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	<b>102</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.019	0.019	0.000
4.	<b>104</b>	0.417	0.409	0.420	0.452	0.203	0.163	0.336	0.404	0.404	0.500
5.	<b>106</b>	0.563	0.545	0.568	0.500	0.635	0.106	0.600	0.538	0.558	0.500
6.	<b>108</b>	0.021	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.036	0.019	0.000	0.000

Настоящото проучване показва, че всички, включени в изследването 24 микросателитни локуси са полиморфни с наличие на общо 260 алелни варианти. Най-малък брой алели (4) бе констатиран по отношение на Ar273 и Ar274 локусите, а най-голям (31) – по A29 локуса. В поредица от таблици и фигури по-долу е представена детайлна информация относно извения полиморфизъм (Таблицы 13 – 36) по всеки локус, алелните варианти в генофонда на проучваните популации и алелните честоти.

Таблица 16. Полиморфизъм по **A29** локуса: алели и алелни честоти

Локус A29	Алел	<i>A. m. mac. Bg</i>	<i>A. m. mac. Gr</i>	<i>A. m. mac. Mac</i>	<i>A. m. car.</i>	<i>A. m. lig.</i>	<i>A. m. mel.</i>	<i>A. m. anatol.</i>	<i>A. m. mac. B</i>	<i>A. m. mac. G</i>	<i>A. m. mac. M</i>
1.	<b>129</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.044	0.000	0.000	0.000
2.	<b>133</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	<b>136</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000
4.	<b>137</b>	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.063	0.000	0.000
5.	<b>139</b>	0.000	0.042	0.011	0.000	0.000	0.010	0.044	0.000	0.021	0.000
6.	<b>140</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
7.	<b>141</b>	0.023	0.125	0.000	0.000	0.041	0.115	0.206	0.125	0.188	0.000
8.	<b>142</b>	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9.	<b>143</b>	0.091	0.167	0.000	0.000	0.014	0.208	0.191	0.000	0.229	0.000
10.	<b>144</b>	0.000	0.000	0.091	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
11.	<b>145</b>	0.023	0.042	0.011	0.028	0.000	0.156	0.074	0.000	0.042	0.000
12.	<b>146</b>	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
13.	<b>147</b>	0.000	0.042	0.011	0.000	0.000	0.042	0.037	0.031	0.000	0.000
14.	<b>149</b>	0.023	0.042	0.057	0.056	0.014	0.042	0.015	0.063	0.021	0.000
15.	<b>151</b>	0.000	0.083	0.068	0.111	0.041	0.104	0.015	0.156	0.042	0.167
16.	<b>153</b>	0.068	0.125	0.057	0.056	0.081	0.063	0.059	0.094	0.042	0.167
17.	<b>155</b>	0.114	0.083	0.102	0.139	0.095	0.083	0.059	0.031	0.042	0.000
18.	<b>157</b>	0.114	0.083	0.080	0.111	0.135	0.000	0.037	0.094	0.042	0.000
19.	<b>159</b>	0.205	0.042	0.057	0.056	0.081	0.021	0.051	0.063	0.125	0.000
20.	<b>161</b>	0.023	0.083	0.068	0.083	0.108	0.000	0.029	0.000	0.021	0.167
21.	<b>163</b>	0.068	0.000	0.102	0.056	0.027	0.010	0.022	0.063	0.083	0.167
22.	<b>165</b>	0.045	0.000	0.045	0.000	0.135	0.000	0.051	0.000	0.021	0.000
23.	<b>167</b>	0.000	0.000	0.045	0.056	0.014	0.031	0.037	0.000	0.000	0.000
24.	<b>168</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
25.	<b>169</b>	0.068	0.042	0.045	0.083	0.095	0.000	0.007	0.031	0.042	0.167
26.	<b>171</b>	0.114	0.000	0.057	0.000	0.054	0.000	0.022	0.156	0.021	0.167
27.	<b>173</b>	0.000	0.000	0.034	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000
28.	<b>175</b>	0.000	0.000	0.000	0.056	0.014	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000
29.	<b>177</b>	0.000	0.000	0.011	0.056	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
30.	<b>179</b>	0.000	0.000	0.000	0.028	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
31.	<b>181</b>	0.000	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

От общо установените 260 алелни варианти, 65 се оказаха частни. В генофонда на неконтролираната и на подложената на селекционен контрол български популации са налични два частни алела по два микросателитни локуса: алелът 124 по Ar288 и алелът 128 по A43. И двата алела са с ниска честота на срещане – 0.021 и 0.020, съответно.



Таблица 17. Полиморфизъм по **A43** локуса: алели и алелни честоти

Локус A43	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>ana-</i> <i>tol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	<b>115</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	<b>118</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	<b>122</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4.	<b>123</b>	0.167	0.200	0.102	0.167	0.068	0.000	0.043	0.300	0.060	0.250
5.	<b>124</b>	0.000	0.000	0.011	0.095	0.257	0.779	0.000	0.000	0.060	0.000
6.	<b>128</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000
7.	<b>130</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.020	0.000
8.	<b>134</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9.	<b>136</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000
10.	<b>137</b>	0.813	0.750	0.830	0.643	0.608	0.077	0.786	0.680	0.820	0.750
11.	<b>139</b>	0.021	0.000	0.057	0.071	0.014	0.000	0.114	0.000	0.040	0.000
12.	<b>141</b>	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000
13.	<b>143</b>	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000

Таблица 18. Полиморфизъм по **A79** локуса: алели и алелни честоти

Локус A79	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>ana-</i> <i>tol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	<b>91</b>	0.000	0.000	0.011	0.190	0.081	0.673	0.000	0.019	0.019	0.000
2.	<b>97</b>	0.188	0.167	0.091	0.024	0.000	0.010	0.379	0.019	0.111	0.083
3.	<b>99</b>	0.000	0.000	0.034	0.048	0.000	0.010	0.000	0.019	0.000	0.000
4.	<b>101</b>	0.104	0.208	0.159	0.048	0.068	0.010	0.229	0.074	0.315	0.083
5.	<b>103</b>	0.250	0.500	0.295	0.143	0.324	0.077	0.271	0.352	0.296	0.500
6.	<b>105</b>	0.188	0.042	0.091	0.357	0.203	0.019	0.057	0.278	0.148	0.083
7.	<b>107</b>	0.104	0.042	0.159	0.143	0.149	0.048	0.050	0.148	0.019	0.250
8.	<b>109</b>	0.083	0.042	0.114	0.024	0.054	0.038	0.007	0.056	0.037	0.000
9.	<b>111</b>	0.021	0.000	0.023	0.024	0.054	0.058	0.000	0.019	0.019	0.000
10.	<b>113</b>	0.000	0.000	0.011	0.000	0.027	0.000	0.007	0.000	0.037	0.000
11.	<b>115</b>	0.042	0.000	0.011	0.000	0.014	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000
12.	<b>117</b>	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
13.	<b>119</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.019	0.000	0.000
14.	<b>121</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Два частни алела бяха открити и в генофонда на *A. m. macedonica* с гръцки произход: алелът 101 по A24 локуса и алелът 166 по Ap223. Честотата на срещане и по тези алели бе сравнително ниска – 0.045 и 0.019, съответно. По-голям брой частни алели бе констатиран в генофонда на *A. m. macedonica* с произход Р. Македония – 5 в неконтролираната популация (алелите 142 и 144 по A29 локуса, алелът 208 по Ap249 локуса, 121 по Ap288 и 130 по At168) и 1 в локалната, включена в GEI експеримента (алелът 206, с честота 0.100, по Ap85 локуса). От тези изброени частни алели, само два са с честота по-висока от 0.5 (алелът 144 по A29 локуса с честота на срещане 0.091 и алелът 206 по Ap85 локуса с честота на срещане 0.100), което ги определя като генетични диагностични маркери. От анализиранияте частни алели 11 са диагностични за *A. m. mellifera* и 2 – за *A. m. anatoliaca*.

Таблица 19. Полиморфизъм по **A88** локуса: алели и алелни честоти

Локус A88	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>ana-</i> <i>tol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	<b>133</b>	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.037	0.000
2.	<b>137</b>	0.196	0.091	0.068	0.000	0.014	0.000	0.304	0.222	0.111	0.083
3.	<b>141</b>	0.087	0.045	0.034	0.048	0.028	0.843	0.435	0.167	0.019	0.000
4.	<b>143</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
5.	<b>144</b>	0.000	0.000	0.000	0.024	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6.	<b>147</b>	0.217	0.409	0.330	0.119	0.083	0.010	0.051	0.130	0.259	0.333
7.	<b>149</b>	0.500	0.409	0.568	0.762	0.722	0.147	0.152	0.481	0.556	0.583
8.	<b>151</b>	0.000	0.000	0.000	0.048	0.139	0.000	0.022	0.000	0.019	0.000

Таблица 20. Полиморфизъм по **A113** локуса: алели и алелни честоти

Локус A113	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	<b>204</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	<b>208</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	<b>212</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
4.	<b>214</b>	0.630	0.833	0.750	0.857	0.400	0.083	0.193	0.654	0.778	0.500
5.	<b>216</b>	0.043	0.000	0.011	0.024	0.000	0.010	0.014	0.058	0.000	0.000
6.	<b>218</b>	0.000	0.042	0.000	0.000	0.017	0.010	0.007	0.000	0.000	0.000
7.	<b>220</b>	0.022	0.042	0.057	0.071	0.567	0.771	0.043	0.019	0.074	0.200
8.	<b>222</b>	0.043	0.000	0.000	0.000	0.017	0.042	0.050	0.096	0.000	0.000
9.	<b>224</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.043	0.000	0.000	0.000
10.	<b>226</b>	0.065	0.083	0.080	0.000	0.000	0.000	0.143	0.096	0.093	0.200
11.	<b>228</b>	0.109	0.000	0.000	0.048	0.000	0.010	0.214	0.038	0.019	0.000
12.	<b>230</b>	0.022	0.000	0.068	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000	0.100
13.	<b>232</b>	0.022	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.071	0.019	0.000	0.000
14.	<b>234</b>	0.043	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.064	0.019	0.037	0.000
15.	<b>236</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.000
16.	<b>239</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.014	0.000	0.000	0.000

Получените в настоящото изследване резултати демонстрират високо ниво на полиморфизъм от порядъка на 91.67% – 100% (при  $P = 1$  и  $P = 0.99$ ) и от порядъка на 91.67% – 95.83% (при  $P = 0.95$ ). Тези нива на констатиран полиморфизъм по изследваните микросателитни локуси са по-високи от установените на базата на алоензимния метод при сравнителни анализи на подвигово ниво (полимофизъм от порядъка на 66.7% до 100% при  $P = 0.95$ ), за сравняваните балкански популации (50% до 100% при  $P = 0.95$ ) и за включените в европейския GEI експеримент (66.7% до 100% при  $P = 0.95$ ) подвигове и произходи.

Таблица 21. Полиморфизъм по **Ac11** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ac11	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>ana-</i> <i>tol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	<b>105</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
2.	<b>109</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	<b>111</b>	0.304	0.273	0.136	0.000	0.000	0.000	0.729	0.196	0.259	0.167
4.	<b>113</b>	0.087	0.045	0.114	0.238	0.122	0.000	0.043	0.089	0.111	0.000
5.	<b>115</b>	0.283	0.273	0.307	0.357	0.635	0.010	0.057	0.446	0.296	0.250
6.	<b>117</b>	0.261	0.409	0.398	0.262	0.176	0.069	0.136	0.250	0.333	0.583
7.	<b>119</b>	0.022	0.000	0.034	0.095	0.014	0.206	0.014	0.018	0.000	0.000
8.	<b>121</b>	0.000	0.000	0.011	0.048	0.041	0.216	0.007	0.000	0.000	0.000
9.	<b>123</b>	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.216	0.000	0.000	0.000	0.000
10.	<b>125</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.206	0.000	0.000	0.000	0.000
11.	<b>127</b>	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.069	0.000	0.000	0.000	0.000
12.	<b>129</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000

Таблица 22. Полиморфизъм по **Ac88** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ac88	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>ana-</i> <i>tol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	<b>210</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
2.	<b>214</b>	0.813	0.917	0.852	0.929	0.932	0.063	0.350	0.776	0.852	0.833
3.	<b>216</b>	0.000	0.042	0.011	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000
4.	<b>220</b>	0.188	0.042	0.125	0.024	0.014	0.000	0.621	0.224	0.130	0.167
5.	<b>222</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000
6.	<b>224</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.229	0.000	0.000	0.000	0.000
7.	<b>226</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.115	0.000	0.000	0.000	0.000
8.	<b>230</b>	0.000	0.000	0.011	0.048	0.027	0.594	0.000	0.000	0.019	0.000

Таблица 23. Полиморфизъм по **Ac139** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ac139	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	<b>321</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	<b>325</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	<b>327</b>	0.400	0.500	0.580	0.775	0.647	0.089	0.043	0.656	0.600	0.750
4.	<b>328</b>	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.000	0.129	0.000	0.000	0.000
5.	<b>329</b>	0.467	0.400	0.330	0.125	0.088	0.011	0.600	0.250	0.300	0.250
6.	<b>331</b>	0.133	0.100	0.034	0.050	0.000	0.011	0.171	0.063	0.025	0.000
7.	<b>333</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.031	0.000	0.000
8.	<b>335</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9.	<b>336</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10.	<b>337</b>	0.000	0.000	0.000	0.025	0.059	0.244	0.000	0.000	0.000	0.000
11.	<b>339</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.167	0.007	0.000	0.000	0.000
12.	<b>341</b>	0.000	0.000	0.000	0.025	0.132	0.433	0.000	0.000	0.075	0.000
13.	<b>343</b>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000

Таблица 24. Полиморфизъм по **Ap15** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap15	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	202	0.925	0.900	0.977	0.905	0.919	0.078	0.943	0.870	0.760	0.875
2.	203	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	204	0.000	0.000	0.011	0.048	0.000	0.000	0.029	0.000	0.040	0.125
4.	208	0.025	0.000	0.011	0.000	0.027	0.324	0.000	0.043	0.000	0.000
5.	210	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.049	0.007	0.000	0.000	0.000
6.	212	0.025	0.100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.087	0.160	0.000
7.	216	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000	0.000
8.	219	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.000	0.000	0.000	0.000
9.	220	0.025	0.000	0.000	0.048	0.041	0.402	0.000	0.000	0.040	0.000
10.	222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.069	0.000	0.000	0.000	0.000

Таблица 25. Полиморфизъм по **Ap68** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap68	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	152	0.021	0.000	0.057	0.238	0.162	0.000	0.023	0.024	0.043	0.250
2.	154	0.083	0.100	0.125	0.048	0.000	0.000	0.015	0.071	0.022	0.000
3.	156	0.313	0.250	0.330	0.333	0.676	0.071	0.205	0.310	0.391	0.125
4.	158	0.458	0.400	0.386	0.333	0.135	0.061	0.508	0.524	0.500	0.625
5.	160	0.083	0.200	0.068	0.000	0.000	0.000	0.061	0.048	0.043	0.000
6.	162	0.021	0.050	0.011	0.000	0.000	0.020	0.098	0.000	0.000	0.000
7.	164	0.021	0.000	0.023	0.024	0.000	0.510	0.091	0.024	0.000	0.000
8.	166	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.245	0.000	0.000	0.000	0.000

Таблица 26. Полиморфизъм по **Ap85** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap85	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	186	0.429	0.417	0.420	0.071	0.000	0.096	0.771	0.522	0.320	0.600
2.	188	0.071	0.167	0.159	0.071	0.056	0.010	0.014	0.109	0.160	0.200
3.	190	0.024	0.000	0.000	0.000	0.014	0.058	0.000	0.000	0.000	0.000
4.	192	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000
5.	194	0.095	0.000	0.068	0.071	0.000	0.173	0.043	0.043	0.020	0.000
6.	196	0.000	0.000	0.034	0.119	0.056	0.279	0.014	0.000	0.000	0.000
7.	198	0.000	0.000	0.000	0.071	0.042	0.010	0.000	0.000	0.020	0.000
8.	200	0.048	0.000	0.011	0.119	0.403	0.029	0.000	0.000	0.020	0.000
9.	202	0.310	0.375	0.295	0.381	0.417	0.067	0.136	0.261	0.400	0.100
10.	204	0.024	0.042	0.011	0.071	0.014	0.029	0.014	0.065	0.060	0.000
11.	206	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100
12.	208	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000

Таблица 27. Полиморфизъм по **Ap90** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap90	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	129	0.083	0.042	0.114	0.095	0.014	0.000	0.107	0.120	0.074	0.250
2.	131	0.500	0.667	0.489	0.429	0.581	0.033	0.543	0.600	0.593	0.500
3.	133	0.313	0.250	0.284	0.286	0.230	0.022	0.207	0.200	0.185	0.083
4.	135	0.083	0.042	0.068	0.071	0.014	0.011	0.079	0.060	0.111	0.167
5.	137	0.000	0.000	0.011	0.024	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.000
6.	139	0.000	0.000	0.000	0.000	0.068	0.000	0.007	0.000	0.019	0.000
7.	141	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.065	0.000	0.000	0.000	0.000
8.	143	0.000	0.000	0.023	0.024	0.014	0.087	0.000	0.000	0.019	0.000
9.	145	0.000	0.000	0.000	0.048	0.000	0.239	0.000	0.000	0.000	0.000
10.	147	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.109	0.000	0.000	0.000	0.000
11.	149	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.239	0.000	0.000	0.000	0.000
12.	151	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.076	0.000	0.000	0.000	0.000
13.	153	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.076	0.000	0.000	0.000	0.000
14.	155	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000
15.	157	0.000	0.000	0.000	0.000	0.054	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000
16.	159	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000

Таблица 28. Полиморфизъм по **Ap223** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap223	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	166	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000
2.	173	0.083	0.000	0.034	0.024	0.056	0.731	0.250	0.130	0.074	0.000
3.	177	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000
4.	178	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
5.	179	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.096	0.000	0.000	0.000	0.000
6.	180	0.000	0.000	0.011	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7.	181	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000
8.	182	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083
9.	183	0.625	0.583	0.682	0.905	0.944	0.096	0.307	0.648	0.667	0.750
10.	185	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.019	0.000
11.	187	0.292	0.375	0.216	0.048	0.000	0.000	0.379	0.222	0.185	0.167
12.	189	0.000	0.042	0.023	0.000	0.000	0.000	0.036	0.000	0.037	0.000

Таблица 29. Полиморфизъм по **Ap224** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap224	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	279	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.240	0.000	0.017	0.000	0.000
2.	281	0.182	0.250	0.170	0.071	0.014	0.269	0.686	0.138	0.300	0.167
3.	283	0.182	0.125	0.159	0.000	0.000	0.413	0.093	0.086	0.240	0.083
4.	285	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.019	0.021	0.000	0.020	0.000
5.	287	0.386	0.542	0.500	0.524	0.819	0.029	0.114	0.569	0.280	0.417
6.	289	0.182	0.083	0.125	0.405	0.111	0.029	0.071	0.190	0.100	0.333
7.	291	0.068	0.000	0.034	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.060	0.000

Таблица 30. Полиморфизъм по **Ap226** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap226	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	233	0.000	0.000	0.000	0.000	0.037	0.953	0.000	0.019	0.020	0.000
2.	235	0.000	0.042	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	237	0.326	0.542	0.318	0.292	0.333	0.000	0.096	0.269	0.420	0.500
4.	239	0.522	0.250	0.545	0.625	0.593	0.012	0.066	0.615	0.420	0.250
5.	241	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6.	243	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
7.	247	0.152	0.167	0.136	0.042	0.000	0.023	0.801	0.096	0.140	0.250
8.	249	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.037	0.000	0.000	0.000
9.	251	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000

Таблица 31. Полиморфизъм по **Ap249** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap249	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	208	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	209	0.563	0.583	0.705	0.738	0.919	0.096	0.132	0.352	0.750	0.583
3.	210	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4.	211	0.021	0.083	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000
5.	215	0.000	0.000	0.057	0.167	0.054	0.894	0.000	0.074	0.058	0.000
6.	217	0.125	0.208	0.091	0.048	0.014	0.000	0.118	0.259	0.058	0.250
7.	218	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
8.	219	0.271	0.125	0.102	0.000	0.000	0.010	0.625	0.259	0.096	0.167
9.	223	0.021	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.103	0.037	0.000	0.000
10.	225	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.019	0.000	0.000

Таблица 32. Полиморфизъм по **Ap273** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap249	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	102	0.000	0.000	0.011	0.000	0.025	0.817	0.007	0.000	0.048	0.000
2.	104	0.021	0.000	0.023	0.048	0.025	0.135	0.321	0.080	0.095	0.000
3.	106	0.958	0.958	0.943	0.929	0.950	0.048	0.657	0.920	0.857	1.000
4.	108	0.021	0.042	0.023	0.024	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000

Таблица 33. Полиморфизъм по **Ap274** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap274	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	112	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000
2.	120	0.979	1.000	1.000	0.952	0.811	0.058	0.993	1.000	0.981	1.000
3.	121	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
4.	122	0.021	0.000	0.000	0.048	0.189	0.923	0.000	0.000	0.019	0.000

Таблица 34. Полиморфизъм по **Ap288** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap288	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	121	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	123	0.729	0.583	0.727	0.976	0.959	0.167	0.179	0.722	0.481	0.667
3.	124	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4.	127	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000
5.	130	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.019	0.000	0.000
6.	131	0.250	0.375	0.250	0.000	0.027	0.588	0.664	0.241	0.463	0.333
7.	133	0.000	0.000	0.000	0.024	0.014	0.225	0.050	0.000	0.019	0.000
8.	139	0.000	0.042	0.011	0.000	0.000	0.000	0.057	0.019	0.037	0.000

Таблица 35. Полиморфизъм по **At168** локуса: алели и алелни честоти

Локус At168	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	128	0.625	0.750	0.693	0.929	0.946	0.096	0.507	0.680	0.635	0.667
2.	130	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	134	0.354	0.250	0.284	0.071	0.000	0.048	0.478	0.300	0.365	0.333
4.	136	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.020	0.000	0.000
5.	140	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.375	0.000	0.000	0.000	0.000
6.	142	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.106	0.000	0.000	0.000	0.000
7.	144	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.317	0.000	0.000	0.000	0.000
8.	146	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.058	0.000	0.000	0.000	0.000

Таблица 36. Полиморфизъм по **At188** локуса: алели и алелни честоти

Локус At188	Алел	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Bg	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Gr	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> Mac	<i>A. m.</i> <i>car.</i>	<i>A. m.</i> <i>lig.</i>	<i>A. m.</i> <i>mel.</i>	<i>A. m.</i> <i>anatol.</i>	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> B	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> G	<i>A. m.</i> <i>mac.</i> M
1.	187	0.000	0.000	0.000	0.071	0.162	0.817	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	189	0.739	0.708	0.750	0.905	0.811	0.144	0.169	0.804	0.808	0.917
3.	199	0.109	0.000	0.023	0.024	0.014	0.010	0.147	0.000	0.038	0.000
4.	203	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000
5.	205	0.043	0.083	0.023	0.000	0.000	0.000	0.088	0.036	0.038	0.000
6.	207	0.000	0.083	0.057	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.038	0.083
7.	209	0.000	0.042	0.034	0.000	0.000	0.000	0.132	0.000	0.019	0.000
8.	211	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.118	0.018	0.000	0.000
9.	212	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.000	0.007	0.018	0.000	0.000
10.	213	0.065	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.140	0.089	0.019	0.000
11.	215	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.019	0.066	0.000	0.000	0.000
12.	217	0.022	0.042	0.023	0.000	0.000	0.000	0.051	0.018	0.019	0.000
13.	219	0.000	0.042	0.011	0.000	0.014	0.010	0.022	0.018	0.000	0.000
14.	221	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.044	0.000	0.019	0.000

В настоящото проучване общият брой алели за локус варираше от 1 (за Ap274 при популации на *A. m. macedonica* с различен произход) до 20 (за A29 при *A. m. macedonica* с произход Р. Македония), а ефективният брой алели – от 1 (Ap274) до 14.95 (A29) при

посочените вече пчелни популации на *A. m. macedonica*. Установената хетерозиготност ( $H_o$ ) по локуси в проучваните популации варираше от 0.042 (за Ap274 при *A. m. macedonica* от България) до – 0.958 (за A79 отново при *A. m. macedonica* от България). Очакваната хетерозиготност бе от порядъка на 0.046 – 0.933 (за Ap288 локуса при *A. m. carnica* и за A29 локуса при *A. m. macedonica* с произход Р. Македония).

Средният брой алели варираше от 2.917 (*A. m. macedonica* М) до 6.625 (*A. m. mellifera*) с обща средна стойност за изследваните популации от 5.146. За същия параметър, Vodur et al., (2007) докладват средна стойност от 6.95 при популациите медоносни пчели на територията на Турция, а Solignac et al. (2003) отчитат стойности 5.69, 3.91 и 8.71 за М, С и А еволюционните линии, съответно. Видно е, че получената в настоящото изследване стойност е по-висока от по-рано установената и коментирана за С клона.

Средният ефективен брой алели бе в диапазона от 2.263 – при *A. m. macedonica* М до 2.962 при *A. m. anatoliaca*. Средните стойности на получената и очакваната хетерозиготност бяха в границите от 0.410 при *A. m. ligustica* до 0.544 при *A. m. macedonica* М и от 0.424 при *A. m. ligustica* до 0.535 при *A. m. anatoliaca*. Хетерозиготността, разглеждана като показател за генетично разнообразие, е удобен параметър за изучаване на генетичната изменчивост (Ting Ji and Cohong, 2011). В нашето изследване всичките 24 микросателитни локуси демонстрираха сравнително висока степен на изменчивост, показвайки обща средна стойност на наблюдаваната и очаквана хетерозиготност за всички изследвани популации от порядъка на 0.496 и 0.493, съответно. Vodur et al. (2007) съобщават, че за популации, принадлежащи към А еволюционната линия установените нива на хетерозиготност са в границите от 0.528 до 0.555, а за изследвани популации от С еволюционната линия – в границите от 0.449 до 0.739.

Установените средни стойности за българската медоносна пчела бяха, както следва: среден брой алели – 4.917 и 4.875; среден ефективен брой алели – 2.745 и 2.584; средна  $H_o$  – 0.534 и 0.503; средна  $H_e$  – 0.528 и 0.518 (по-високи от средните), което е сходен резултат с коментирания от Vodur et al. (2007). Получените в настоящото изследване стойности са по-ниски от установените от Nikolova (2011) за изследваните от нея български популации, получени на базата на микросателитен анализ по 9 локуса.

За отбелязване е фактът, че българската неконтролирана популация се характеризира с по-високи стойности на получена и очаквана хетерозиготност в сравнение с другите популации от групата на подвида *A. m. macedonica*.

Най-ниска стойност на получена и очаквана хетерозиготност бе отчетена по Ap274, а най-висока – по A29 локуса.

Получените в настоящото изследване резултати относно нивото на хетерозиготност ( $F_{IS}$ ) между отделните локални популации (субпопулации), нивото на хетерозиготност в изследваната генерална популация ( $F_{IT}$ ) и степента на генетична диференциация между отделните субпопулации ( $F_{ST}$ ) носят допълнителна информация за генетичната изменчивост. В настоящото проучване стойностите на инбридинг коефициента  $F_{IS}$  са ниски, което демонстрира и не високи нива на близкородствено кръстосване. За 13 от проучваните микросателитни локуси стойностите на този показател бяха отрицателни, което демонстрира излишък от хетерозиготи, а за останалите 11 – положителни, което показва дефицит на такива. Нивата на  $F_{IT}$  варират от 0.036 до 0.691, средно 0.217, което показва, че в общо в проучваните популации има дефицит на хетерозиготи от порядъка на 21.7%. Средната стойност на  $F_{ST}$  бе 0.222, което показва, че 22.2% от констатираната изменчивост е междупопулационна и 77.8% – вътрепопулационна (Таблица 37).

Данните от проучването сочат: ниски нива на генетична диференциация между популациите на българската *A. m. macedonica* и популациите на *A. m. macedonica* с произход Гърция и Р. Македония (0.009 – 0.017) и между *A. m. macedonica* с трите произхода и *A. m. carnica* (0.032 – 0.051); умерени нива на генетична диференциация между популаци-



ите на подвида *A. m. macedonica* (0.071 за българската популация) и *A. m. ligustica* (0.059 – 0.081) и между *A. m. macedonica* и *A. m. anatoliaca* (0.087 – 0.110); значително високи нива на генетична диференциация между *A. m. macedonica* и *A. m. mellifera* (0.290 и 0.307).

*Nm* стойностите предоставят информация за близостта или различията между изследваните популации в резултат от потока на гени (Таблица 37). Ако *Nm* е по-малко от 2, това е показател за значителни разлики между популациите.

По отношение на анализираниите микросателитни локуси, стойността на потока от гени бе по-голяма от 2 за A29 (5.131) и за Ap90 (2.857) локусите. По отношение на анализираниите популации *Nm* бе в границите от 0.507 (между *A. m. carnica* и *A. m. mellifera*) и 28.779 (между *A. m. macedonica* с произход България и *A. m. macedonica* с произход Р. Македония).

Таблица 37. Средни стойности на очакваната (*He*) и наблюдаваната (*Ho*) хетерозиготност за отделните изследвани локуси, *F* статистика и поток на гени *Nm* за всички изследвани популации от различните подвидове на *Apis mellifera*, включени в микросателитния ДНК анализ

Локус	Средна <i>He</i>	Средна <i>Ho</i>	<i>Fis</i>	<i>Fit</i>	<i>Fst</i>	<i>Nm</i>
A8	0.621	0.550	0.114	0.281	0.188	1.078
A14	0.476	0.467	0.017	0.186	0.171	1.208
A24	0.514	0.510	0.008	0.137	0.130	1.670
A29	0.895	0.891	0.005	0.051	0.046	5.131
A43	0.398	0.370	0.072	0.274	0.218	0.898
A79	0.741	0.783	-0.056	0.062	0.113	1.972
A88	0.551	0.543	0.015	0.205	0.193	1.046
A113	0.493	0.507	-0.030	0.198	0.221	0.879
Ac11	0.667	0.648	0.029	0.168	0.143	1.495
Ac88	0.293	0.289	0.016	0.337	0.326	0.516
Ac139	0.539	0.476	0.118	0.276	0.179	1.148
Ap15	0.237	0.240	-0.014	0.267	0.278	0.650
Ap68	0.643	0.623	0.030	0.156	0.129	1.683
Ap85	0.664	0.679	-0.022	0.118	0.137	1.570
Ap90	0.643	0.674	-0.048	0.036	0.080	2.857
Ap223	0.437	0.453	-0.035	0.191	0.218	0.895
Ap224	0.617	0.672	-0.089	0.077	0.152	1.392
Ap226	0.508	0.536	-0.056	0.244	0.284	0.631
Ap249	0.473	0.478	-0.011	0.262	0.270	0.676
Ap273	0.168	0.169	-0.007	0.455	0.459	0.295
Ap274	0.063	0.067	-0.053	0.691	0.706	0.104
Ap288	0.397	0.473	-0.193	0.079	0.228	0.849
At168	0.413	0.404	0.024	0.208	0.188	1.077
At188	0.387	0.399	-0.031	0.244	0.267	0.687
		Средно	-0.008	0.217	0.222	1.267
		SE	0.013	0.029	0.028	0.206

Най-високи са стойностите за потока от гени в групата на *A. m. macedonica* популациите с различен произход. Отчетен бе поток на гени от порядъка на 5.628 между неконт-

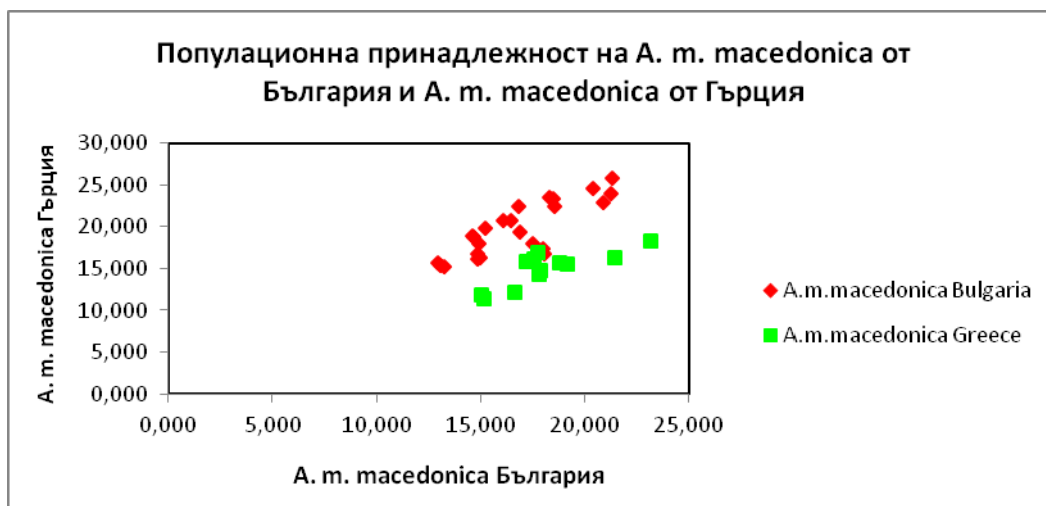
ролираната българска популация и *A. m. carnica*, 3.294 между неконтролираната българска популация и *A. m. ligustica*, 2.629 между българската популация и *A. m. anatoliaca* и 0.613 между българската популация и *A. m. mellifera*. Тези данни са показателни за нивата на генетична диференциация между анализираниите популации. Те демонстрират ниски нива на генетична диференциация сред групата популации на *A. m. macedonica* и значими нива на диференциация между подвидовете *A. m. macedonica* и *A. m. mellifera*. Получените резултати сочат, че генетичната дистанция по Nei (1972) варира в границите от 0.019 (между *A. m. macedonica* с произход България и Р. Македония) и 0.826 (между *A. m. macedonica* и *A. m. mellifera*).

С цел по-детайлни сравнения между включените в изследването популации от различни подвидове и произходи на *Apis mellifera* и характеризирани на диференциацията между тях, бе приложен и асигнационен тест. Както се вижда от графичните данни за принадлежност на индивидите от проучваните популации, представени на фигурите по-долу (Фигури 12 – 17) *A. m. macedonica* популациите са ясно отличими от останалите. Същите са генетично сходни помежду си, но могат да се отличат и това съответства на получените резултати относно изчислените генетична дистанция и генетична близост по Nei (1972).

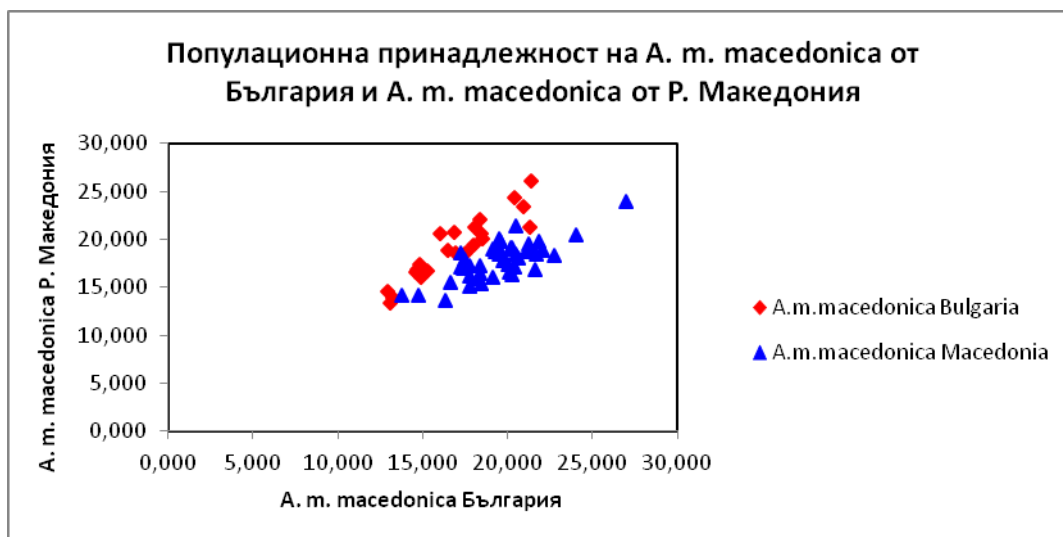
Групирането по двойки на изследваните популации, принадлежащи към различни подвидове и имащи различен произход, дава възможност за детайлни сравнения между тях. При това, от изключителна важност, съобразно целите на проучването, са резултатите от генетичния анализ на комплекса популации от подвида *A. m. macedonica* и конкретното сравнение на българската медоносна пчела с другите популации на *A. m. macedonica*, както и с тези на подвидовете *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* и *A. m. anatoliaca*. Това сравнение е важно и предвид факта, че в съвременния ход на развитие на пчеларството в България, в определени периоди (60-те и 70-те години на XX в.) се е осъществявала интродукция на пчелни майки от подвидовете *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* и селекционно са се изпитвали различни схеми на кръстоски между тези подвидове с местните български пчели. От друга страна, наличието, макар и на слабо сходство с подвида *A. m. anatoliaca*, коментирани на базата на резултатите от митохондриалния ДНК анализ се нуждае от доуточнения, които микросателитният анализ би могъл да предостави.

От представеното на Фигури 12 и 13 сравнение на българската медоносна пчела с другите популации на *A. m. macedonica* е видно, че въпреки значимото сходство, българска популация е различима.

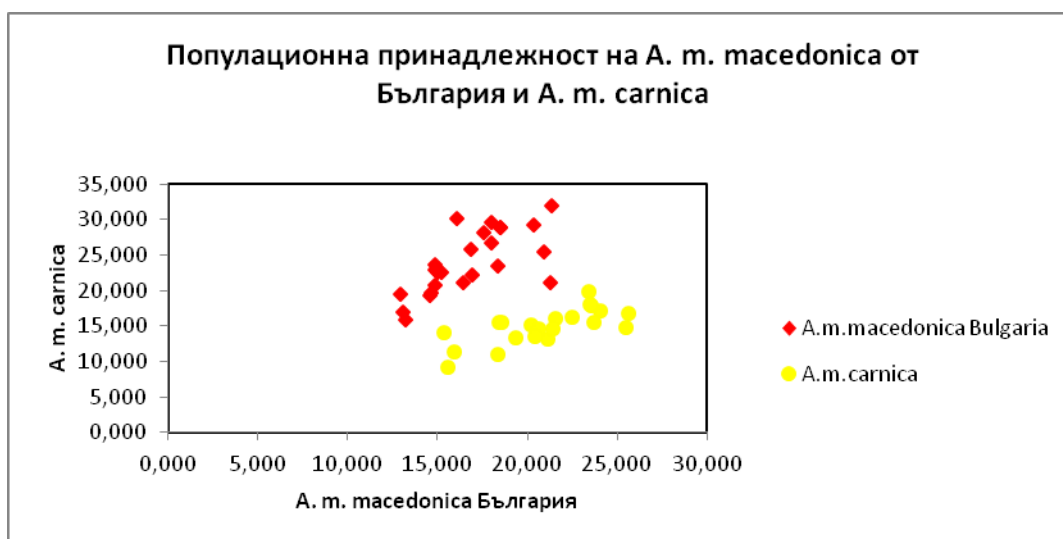
Останалите четири фигури (Фигури 14 – 17) демонстрират ясното разграничение между българската медоносна пчела и популациите на подвидовете *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* и *A. m. anatoliaca*. Тези графични данни са в съответствие с нивата на генетична диференциация между проучваните популации, базирана на описаните популационно-генетични характеристики и специфичните диагностични показатели, коментирани за всеки от включените в изследването 24 микросателитни локуси.



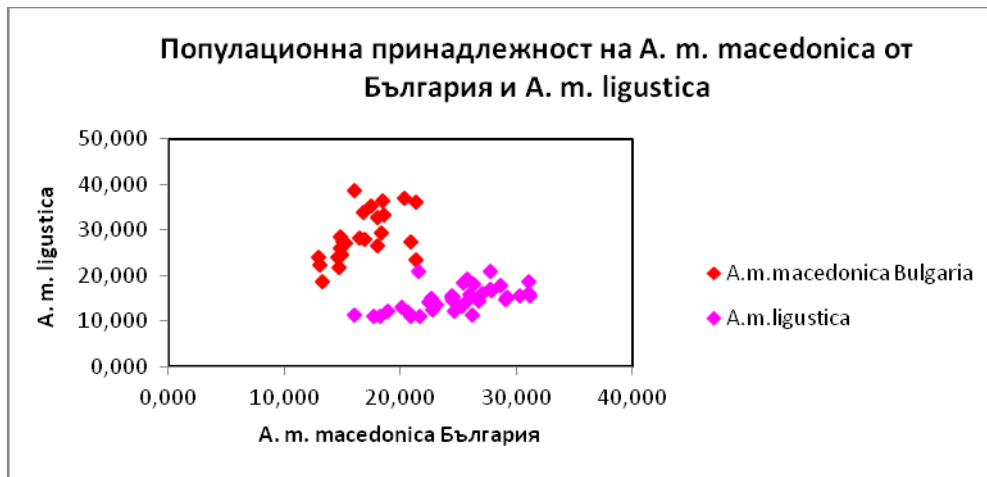
Фигура 12. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. macedonica* от Гърция



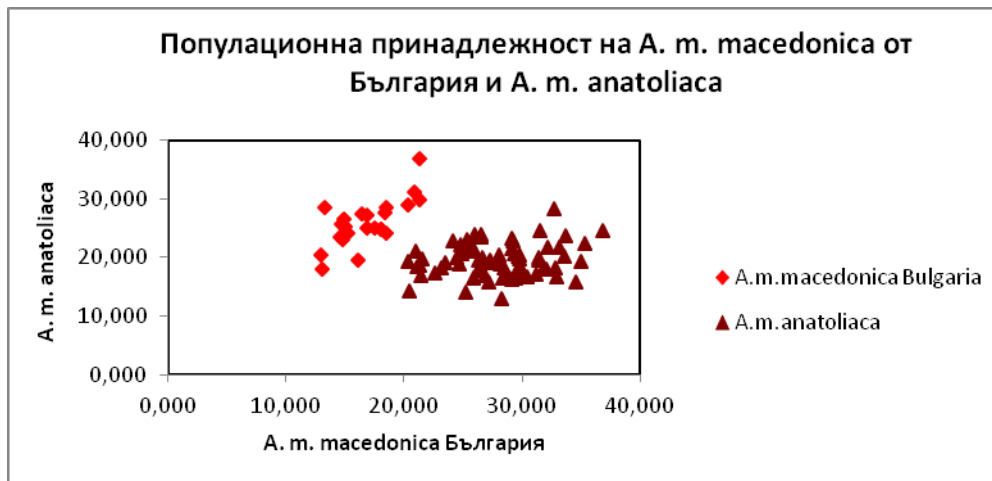
Фигура 13. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. macedonica* от Р. Македония



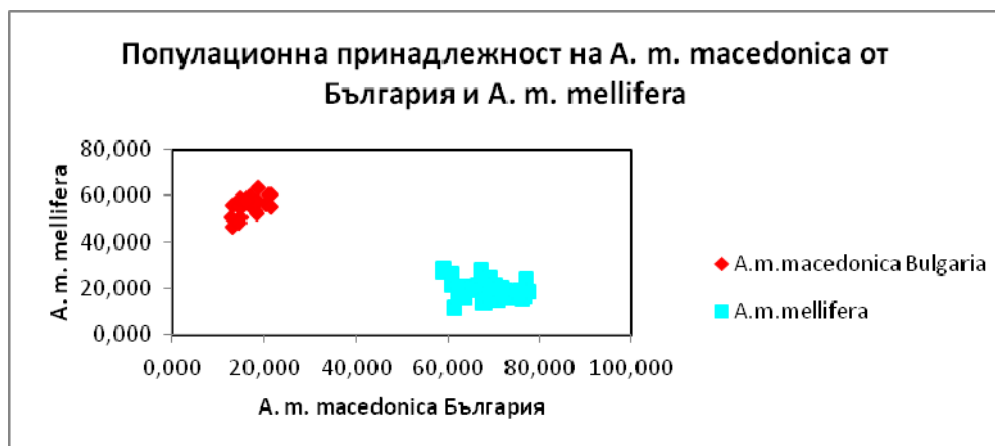
Фигура 14. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. carnica*



Фигура 15. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. ligustica*



Фигура 16. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. anatoliaca*

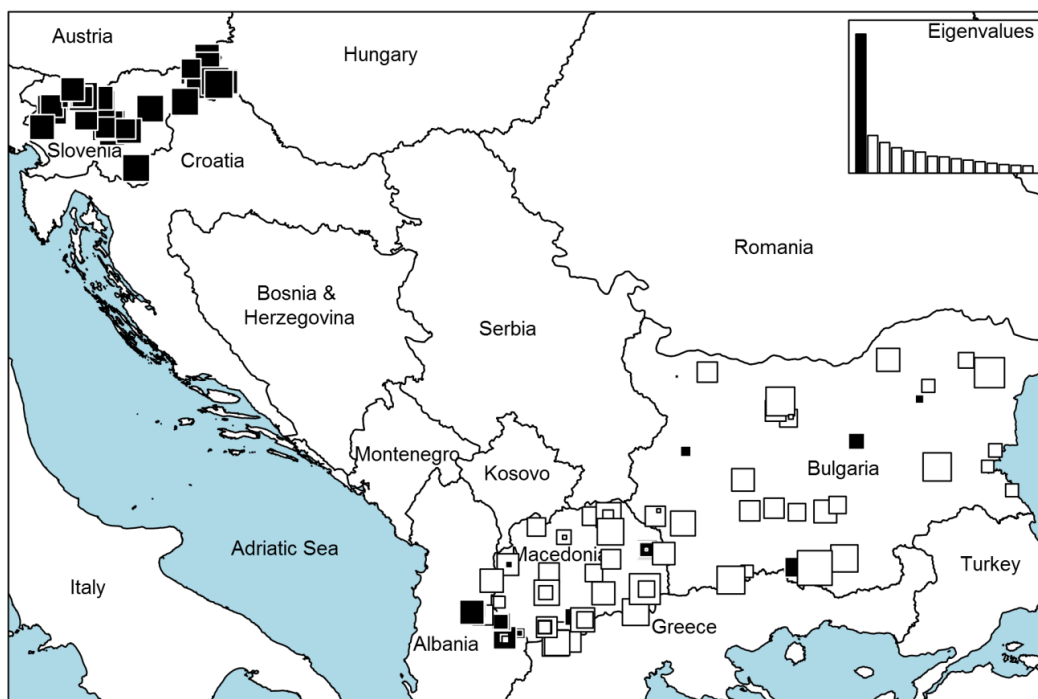


Фигура 17. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. mellifera*

Сравнението между *A. m. macedonica* с произход България и подвида *A. m. mellifera* се вписва като допълнителен мотив в сравнителната схема на проучването, предвид констатираната най-съществена генетична диференциация между тези два подвида, дължаща се, както на географска изолация, така и на факта, че липсват доказателства за изпитване на кръстоски между тях при осъществяване на селекционни мероприятия с местната медоносна пчела в България.

Представените тук резултати относно микросателитния анализ на популации *A. m. macedonica* с различни произходи (включително от България) бяха използвани за сравнително мащабно проучване за разпространението на този подвид на територията на Балканския полуостров и предоставяне на доказателства за генетичните му различия с *A. m. carnica*. Получените данни бяха публикувани от международен колектив и заключенията от анализите са съществен елемент от по-пълното характеризирание на българската медоносна пчела (Uzunov et al., 2014a).

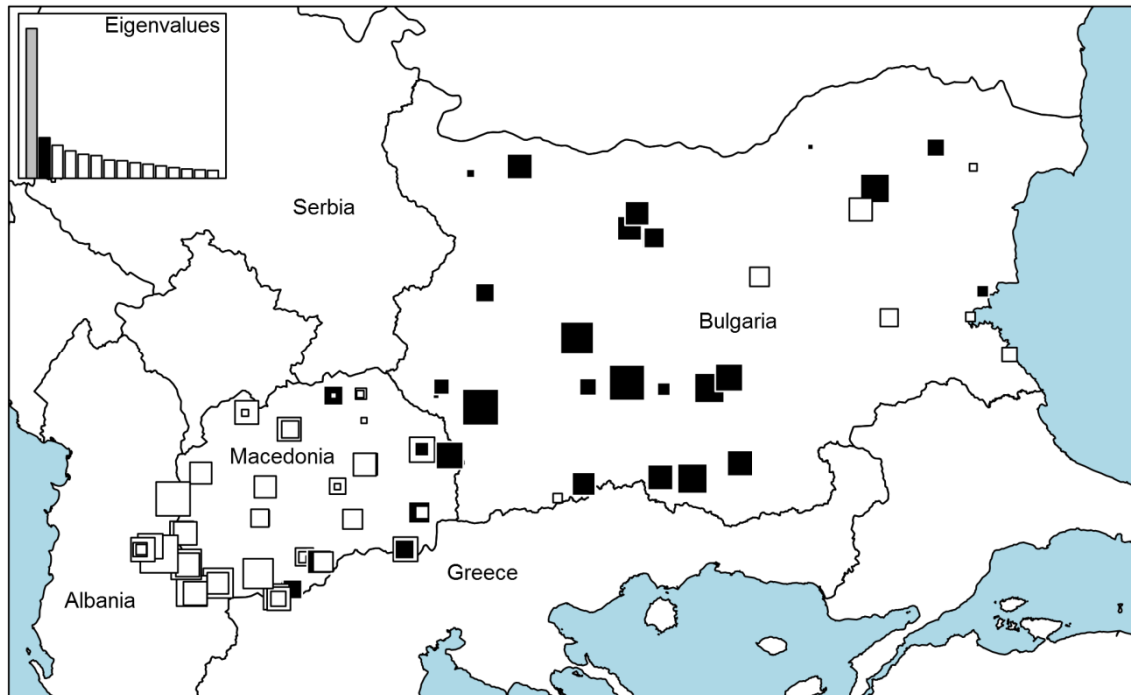
Резултатите от проучването сочат категорично, че българската медоносна пчела, описана на базата на класическа морфометрия като принадлежаща към подвида *A. m. macedonica*, притежава някои специфични генетични характеристики (вече описани в изложението по-горе), по които се отличава от другите популации на този подвид, което в значима степен дава основание да се коментира като различен екотип, адаптиран към конкретните условия на територията на сдтраната ни. Фигурите 18 и 19, представени по-долу подкрепят това заключение.



Фигура 18. sPCA общ пространствен план, базиран на географските координати на проучваните популации. С черните квадратчета са обозначени *carnica* популациите, а с белите – не-*carnica* популациите (Uzunov et al., 2014a)

Информацията от Фигура 18 показва, че изследваните популации от територията на Република Македония, България и Гърция принадлежат към подвида *A. m. macedonica*, описан от Ruttner (1988) на базата на морфометричен анализ и генетично ясно се диференцират от *A. m. carnica*. Този резултат потвърждава съществуването на двата различни подвида *A. m. carnica* и *A. m. macedonica* на територията на Балканския полуостров. Освен това, получените данни сочат различна степен на интрогресия от *A. m. carnica* в

различните изследвани райони на разпространение на *A. m. macedonica*, както по-рано е коментирано от Dedej et al., 1996; Uzunov et al., 2009; Stevanovic et al., 2010; Munoz et al., 2012. Влиянието на типа *carnica* би могло да се обясни с внос през годините на пчелни майки от този подвид, предвид широкото му разпространение на територията на Европа по комерсиални причини.



Фигура 19. sPCA общ пространствен план, базиран на географските координати на проучваните не-*carnica* популации, групирани в два субкластера. С черните квадратчета са обозначени популациите, демонстриращи специфични генетични характеристики в рамките на общата група (Uzunov et al., 2014a)

Получените резултати от пространствения анализ показват ясно подразделяне в групата на подвида *A. m. macedonica* (Фигура 19). Видно е, че пчелите от българската популация се групират отделно от пчелните популации с произход Р. Македония и Гърция. Този резултат е в съгласие с по-рано коментирани в настоящия труд и публикувани вече данни, базирани на алоензимен (Ivanova, 2010; Ivanova et al., 2010a,b; 2012) и митохондриален ДНК анализ (Ivanova et al., 2010a; Martimianakis et al., 2011), в които се съобщава за наличие на специфични генетични характеристики по отношение на *A. m. macedonica* от България, отчетени при сравнение с други популации на същия подвид и с популации от подвида *A. m. carnica*. Така, въпреки, че Ruttner (1988) в своята класификация на подвидовете не съобщава за географско субгрупиране в рамките на подвида *A. m. macedonica*, Петров (1992, 1993, 1995), базирайки се на мащабен морфометричен анализ отбелязва, че пчелите на територията на България биха могли да са отделен подвид – *A. m. rodopica*. Резултатите от настоящото проучване, базирано на микросателитен анализ по 24 локуса, демонстрират обаче различия в рамките на подвида и принадлежност на проучваните български медоносни пчели към него – заключение, потвърждаващо се и от сравнителните данни на алоензимния анализ.

**Данните за дискриминирането на българската медоносна пчела се допълват със специфични генетични характеристики, базирани на използваните в настоящото**

изследване алоензимен, митохондриален и микросателитен ДНК анализи. Те, в комплекс с класически морфометрични показатели биха могли да се използват като сериозни доказателства в подкрепа на по-рано изказана хипотеза, че местната медоносна пчела на територията на България принадлежи към различен екотип са подвид *A. m. macedonica* (екотип *rodorica*), адаптиран към конкретните условия на страната ни и различаващ се от останалите популации на същия подвид по комплекс от популационно-генетични показатели.

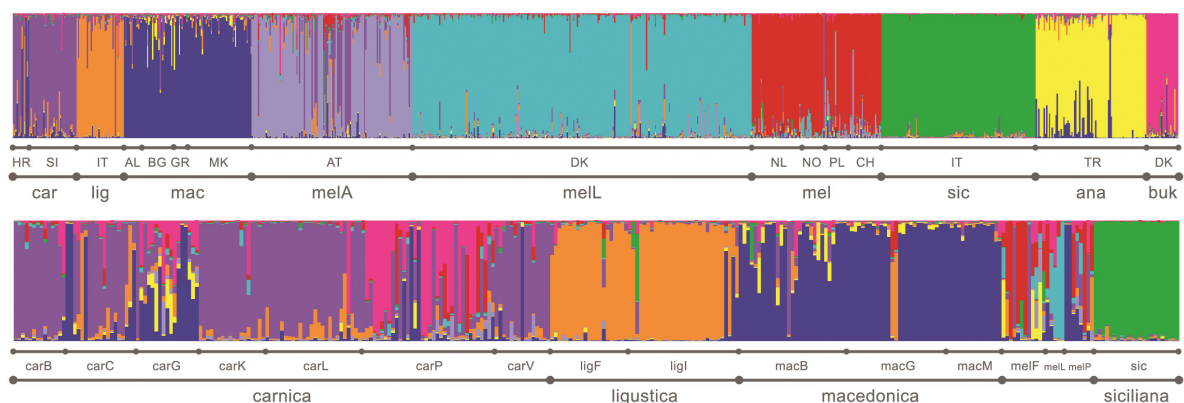
Предхождащи изследването резултати, базирани на морфометричен анализ навеждат на мисълта, че *A. m. macedonica* се среща още на север от проучвания регион, достигайки Украйна (Engel, 1999), където формира гранична хибридна зона с *A. m. mellifera* (Meixner et al., 2007). Базирайки се на митохондриален ДНК анализ Bouga et al. (2005a) коментират съществуването на ясно очертана зона на диференциация между Северна Гърция, където *A. m. macedonica* се разглежда като местен подвид и Централна Гърция и островите в Егейско море, където са отчетени хибридни зони и зони на разпространение на другите, характерни за територията на Гърция подвидове.

По мнение на Ruttner (1988), *A. m. macedonica* може да се открие и в Тракийския регион на Турция, където среща зоната на разпространение на *A. m. anatoliaca*. Това обяснява и сходствата между двата подвида, описани по отношение на някои от редките алели на част от изследваните в настоящото проучване микросателитни локуси.

При обсъждане на въпроса за разпространението на подвида *A. m. macedonica* следва да се добави още, че по данни на Stevanovic et al. (2010) и Muñoz et al. (2012) местен за южните части на Сърбия се оказва подвидът *A. m. macedonica*, а не *A. m. carnica*, както се е приемало до скоро. Тази именно подробност обяснява в значителна степен и наличието на някои сходства, установени между двата коментирани подвида при сравнителното алоензимно проучване на техни популации от територията на Балканския полуостров.

Както вече бе съобщено, популации на българската медоносна пчела бяха включени в европейския GEI експеримент. Това позволи сравнението им на европейско ниво, както по отношение на характеризирани вече алоензимни и микросателитни локуси, така и на базата на морфометрични показатели, митохондриален ДНК анализ, поведенчески, продуктивни и други качества.

На Фигура 20 (Francis et al., 2014) е представена сравнителна информация, базирана на данните от микросателитния анализ по 24-те, включени в изследването локуси.



Фигура 20. Барплот (Structure), показващ референтните популации (на горния ред), спрямо които е извършен сравнителният анализ и обобщените резултати от европейския GEI експеримент (на долния ред) при  $K = 9$  (Francis et al., 2014).

Подложената на селекционен контрол българска популация *A. m. macedonica* В, тук обозначена като macB, е сравнена с останалите популации, принадлежащи към други европейски подвидове и произходи на *Apis mellifera*. Към групата на референтните дан-

ни за *A. m. macedonica* са включени и резултатите от неконтролираната българска популация, описани и коментирани по-горе.

От фигурата е видно, че включената в GEI експеримента българска популация, подложена на селекционен контрол (масВ = *A. m. macedonica* В), принадлежи към подвида *A. m. macedonica*. Както се вижда, и неконтролираната българска популация, включена в референтните данни, и тестовата популация с произход България притежават характеристики, по които могат да бъдат отличени от другите *A. m. macedonica* популации и в същото време отчетливо се различават от популациите на останалите подвидове.

Въпреки познанието за географското разпределение и генетичното разнообразие сред медоносните пчели през последните десетилетия (Meixner et al., 2013), адаптирането на местните популации към околната среда не е добре проучено. Търсенето на високи икономически резултати и желани етологични характеристики на пчелните семейства води до промяна на природното разнообразие чрез масов внос и търговия на пчелни майки и рояци в световен мащаб. В същото време, в някои страни на Европа (включително България) са налице и тенденции към опазване на природното наследство на местните популации с прилагането на специално законодателство. Проучванията показват, че ефектите от комерсиализацията в сферата на пчеларството са негативни и се изразяват в проявата на нови вредители и нови болести по пчелите, поради което е необходимо да се стимулират стратегиите за развъждане на местни популации, които са добре адаптирани към конкретните условия на средата.

Проведеният и обобщен сравнителен микросателитен анализ показва, че в България, Гърция и Македония, селекционните дейности са базирани на местни популации, което се свързва с относително високата степен на хомогенност, констатирана сред тях. Линиите (произходите), които са били под селекционен контрол, но обитават географските райони, от които произхождат, повече приличат на изходните си популации. Такива са данните за *A. m. ligustica*, *A. m. siciliana* и *A. m. macedonica* (Francis et al., 2014a). Данните сочат още, че на територията на Европа е изявено генетично „примесване“ по отношение на някои от включените в сравнението произходи, което не е изненада, тъй като са налице (и се прилагат) различни стратегии на управление на пчелните популации и стремеж към хетерозисен ефект, свързан с продуктивност по комерсиални причини.

Важно е да се акцентува върху обстоятелството, че хибридизацията крие сериозни опасности за генофонда и генотипната структура на местните популации и че генетичното разнообразие сред медоносните пчели в Европа, като цяло, е под влиянието на различните стратегии за управление.

Европейският GEI експеримент излиза от границите на класически генетичен експеримент, защото цели разрешаването на сериозни и значими за апидологията като наука задачи. Експериментът е дело на обединени усилия и конкретен труд на много европейски учени (включително двама от България) и е предхождан от задълбочен литературен обзор по отношение използваните методи за дискриминация на медоносните пчели на територията на Европа, който показва, че до момента на проучването липсват единни стандартизирани методи, с помощта на които медоносните пчели да бъдат сравнително характеризирани (Bouga et al., 2011). Екипът на научната работна група WG4 „Diversity and Vitality“ от COST акцията FA0803 COLOSS за периода от 2008 до 2014 г. разработи и публикува стандартизирани методи за генетичен и селекционен анализ, които бяха използвани в GEI експеримента (Costa et al., 2012; Meixner et al., 2013). Работната група планира и реализира сравнителни анализи, прилагайки описаните стандартизирани методи, което позволи включените в обединеното проучване подвидове с различни произходи да бъдат детайлно характеризирани, както по отношение на генетичните им показатели, така и по отношение на продуктивни и поведенчески селекционно значими качества. Получените резултати бяха публикувани в поредица от статии, посветени на различни аспекти от взаимовръзката



„генотип – околна среда“ и допринасят за: 1) генетичното характеризиране на европейските медоносни пчели – Meixner et al., 2009, 2013, Francis et al., 2014a; 2) характеризиране на значимите селекционни качества (продуктивност и численост, зимоустойчивост, качества на пчелните майки) по отношение на европейските подвидове с различен произход – Büchler et al., 2014, Hatjina et al., 2014a, Meixner et al., 2015; 3) характеризиране на популационна динамика и важни поведенчески особености (ройливост, агресивност, хигиенно поведение) на европейските медоносни пчели – Hatjina et al., 2014b, Uzunov et al., 2014b; 4) характеризиране на здравния статус и устойчивостта към заболявания – Meixner et al., 2014. При всички тези изследвания българските пчели, като част от генетичното разнообразие на *Apis mellifera* на територията на европейския континент, са сравнени с останалите европейски популации.

Вникването в детайлите на европейския GEI експеримент показва (Costa et al., 2012; Meixner et al., 2013; Francis et al., 2014a; Meixner et al., 2015), че в него са сравнени селекционни линии, местни пчелни популации, неподложени на селекционен контрол и линии, включени в консервационни програми, принадлежащи към 5 подвида на *Apis mellifera*. При това, минимум 10 пчелни семейства от всяка тест-група участват в сравнителен анализ като същите са разположени на поне 3 от 21 тест-локации (пчелини) на територията на Европа (4 + 3 + 3). На всеки от тези пчелини местната пчела се сравнява с поне 2 различни произхода, без прилагането на каквито и да е мадикаменти.

При това, конкретните резултати показват следното:

- 1) местните популации преживяват по-дълго (553 дни) от внесените (470 дни) – Meixner et al. (2015);
- 2) хибридизацията повлиява негативно поведенческите особености на пчелите (Uzunov et al., 2014b);
- 3) сред причините за пчелни загуби в Европа са *Varroa* (38%), проблеми с пчелната майка и търтеити (17%), *Nosema* (8%), гладуване, кражби между пчелни семейства, презимуване и загуби през този период, други болести и неизвестни причини – общо 37%.

По отношение на българската медоносна пчела, данните сочат конкретно, че:

- 1) при най-високо ниво на опаразитяване с *Varroa*, включената в изследването българска популация на *A. m. macedonica* проявява **най-висока преживяемост** в сравнение с всички включени в GEI експеримент популации, принадлежащи към други подвидове, както и в сравнение с другите произходи на подвида *A. m. macedonica* – Büchler et al., 2014, Hatjina et al., 2014b; Meixner et al., 2014 b;
- 2) при открити в българската популация като налични **вирусите ABPV** (предизвикващ парализа при пчелите) и **DWV** (предизвикващ деформация на крилето), както и **опаразитяване с *Nosema cerana*** като нов „ключов“ патоген на мястото на *Nosema apis*, същата се характеризира с **най-голяма сравнителна преживяемост** – Meixner et al., 2014 b; Büchler et al., 2014;
- 3) При анализ за **склонността към роене**, българската медоносна пчела се подрежда на 4-то място от 21 тествани популации, след трите най-малко склонни към роене (CarK, LigF и Sic) популации, с показател 3.30 по четиристепенната скала на Ruttner (1972), при която с 4 се обозначава незабележима тенденция към роене, а с 1 – силно роене, което може да се предотврати със сериозна човешка намеса – Uzunov et al. (2014b);
- 4) При анализ на **защитното поведение**, българската медоносна пчела е с показател 3.36 по четиристепенната скала на Ruttner (1972), при която с 4 се обозначава миролюбивост при която с медоносните пчели се работи спокойно, включително без предпазни средства, а с 1 – силно агресивно поведение, което задължително изисква предпазни средства за защита – Uzunov et al. (2014b);

- 5) При анализ на *хигиенното поведение*, българската медоносна пчела се групира на първо място сред сравняваните 21 произхода заедно с CaгV (стойности 47.56 и 49.15, съответно, между които няма статистически достоверна разлика) – Uzunov et al. (2014b);
- 6) По отношение *качествата на пчелната майка*, българската медоносна пчела се характеризира с *висока плодовитост*, като в националната селекционна програма, прилагана в страната ни, са разработени строги критерии за оценка на качествата ѝ – Петров и Ганев (2013); Natjina et al. (2014a);
- 7) По отношение *продуктивност на пчелен мед*, българската медоносна пчела се характеризира със средна продуктивност от 20 и над 20 кг пчелен мед от семейство при конкретните за страната ни условия (Агростатистика, 2016) и около 20% до 30% по-висока продуктивност на пчелен мед в сравнение с други произходи, интродуцирани и селекционно изпитвани в България през годините.

Таблица 38. Обобщена информация относно ценни етологични и продуктивни качества на българската медоносна пчела в сравнение с други местни популации на *A. m. macedonica*

Характеристика	Изява	Възможности за разграничаване на българската <i>A. m. macedonica</i> в сравнение с другите <i>A. m. macedonica</i> популации
Преживяемост при налично опаразитяване с <i>Varroa</i> , <i>Nosema</i> , ABPV, DWV	Най-висока сред всички сравнявани	Най-висока сред групата популации на <i>A. m. macedonica</i>
Склонност към роене	3.30 (при максимално отчетено 3.55) – по четиристепенната скала на Ruttner (1972)	2.62 за <i>A. m. macedonica</i> от Гърция и 3.27 за <i>A. m. macedonica</i> от Р. Македония
Защитно поведение (миролюбивост – агресивност)	3.36 (при максимално отчетено 3.71) – по четиристепенната скала на Ruttner (1972)	3.08 за <i>A. m. macedonica</i> от Гърция и 2.68 за <i>A. m. macedonica</i> от Р. Македония
Хигиенно поведение	47.6 (при максимално отчетено 49.15) – силно изразено сред всички сравнявани	35.31 за <i>A. m. macedonica</i> от Гърция и 30.38 за <i>A. m. macedonica</i> от Р. Македония
Качества на пчелната майка	Висока плодовитост – повече от 2000 яйца за 24 ч., не повече от 10% празни килийки и др. показатели	Сходни при подбор и развъждане на пчелни майки за <i>A. m. macedonica</i> от Гърция и Р. Македония
Продуктивност на пчелен мед	20 и над 20 кг от семейство при конкретните за страната ни условия; 20% до 30% по-висока продуктивност на пчелен мед в сравнение с други произходи, интродуцирани и селекционно изпитвани в България	20 и под 20 кг от семейство за <i>A. m. macedonica</i> от Гърция и Р. Македония при характерните условия

**Предвид представената информация относно ценните стопански и етологични качества на българската медоносна пчела и получените резултати от комплексния генетичен анализ в настоящия дисертационен труд е възможно да се направи система от подходящи популационни генетични маркери за оценка и разграничаване на българската медоносна пчела *A. m. macedonica*, съпоставима с нейните ценни биологични и стопански качества и приложима в бъдещи дейности по консервацията и селекцията ѝ в България.**

В таблици 38 – 40 са представени данни за констатираната генетична изменчивост сред контролираните и неконтролирани популации на българската медоносна пчела, които успешно биха могли да се използват при характеризирането и разграничаването ѝ.

Таблица 39. Обобщени данни относно алоензимните характеристики на неконтролирани и селекционно контролирани популации на българската медоносна пчела в сравнение с други местни популации на *A. m. macedonica*

Локус	Алелно разнообразие	Обобщена алелна честота на срещане за неконтролираните популации	Честота на срещане при контролирани популации	Популационни различия с <i>A. m. macedonica</i> от Гърция и Р. Македония	Популационни маркери за разграничаване на популациите <i>A. m. macedonica</i>
MDH-1	65 100 80	0.318 – 0.496 0.503 – 0.585 0.00 – 0.097	0.337 – 0.405 0.595 – 0.685 0.00	0.130 – 0.444 0.334 – 0.0.774 0.036 – 0.222	MDH-1 <sup>80</sup> – присъствие и отсъствие в генофонда
ME	90 100 106 115	0.00 – 0.048 0.875 – 0.937 0.045 – 0.125 0.00 – 0.005	0.00 – 0.035 0.879 – 0.935 0.065 – 0.096 0.00	0.00 – 0.057 0.804 – 0.978 0.00 – 0.196 0.00	ME <sup>106</sup> – разлики в честота на срещане
EST-3	80 88 94 100 105 118	0.00 – 0.036 0.00 – 0.029 0.00 – 0.015 0.923 – 0.974 0.00 – 0.019 0.004 – 0.022	0.00 0.00 0.00 – 0.016 0.946 – 0.976 0.00 0.008 – 0.054	0.00 – 0.027 0.00 – 0.054 0.00 – 0.087 0.878 – 1.0 0.00 – 0.026 0.00 – 0.050	EST-3 <sup>88</sup> – разлики в честота на срещане
ALP	80 90 100	0.403 – 0.585 0.006 – 0.136 0.408 – 0.470	0.535 – 0.575 0.00 0.425 – 0.465	0.400 – 0.650 0.00 – 0.100 0.350 – 0.500	ALP <sup>80</sup> и ALP <sup>90</sup> – разлики в честота на срещане
PGM	80 100 114 125	0.00 – 0.001 0.915 – 0.953 0.038 – 0.081 0.00 – 0.009	0.00 0.935 – 0.957 0.043 – 0.065 0.00	0.00 0.786 – 0.981 0.019 – 0.214 0.00	PGM <sup>114</sup> – разлики в честота на срещане
HK	87 100 110	0.007 – 0.027 0.962 – 0.970 0.007 – 0.023	0.00 – 0.063 0.895 – 0.978 0.022 – 0.042	0.00 0.909 – 0.984 0.016 – 0.091	HK <sup>87</sup> – присъствие и липса в генофонда HK <sup>110</sup> – разлики в честота на срещане

Таблица 40. Обобщени данни относно микросателитната ДНК изменчивост по 24-те изследвани локуси при неконтролирани и селекционно контролирани популации на българската медоносна пчела в сравнение с други местни популации на *A. m. macedonica*

Локус	Алелни варианти	Честоти на срещане	Специфични различия в групата популации на <i>A. m. macedonica</i> с различен произход
A8	175 177 179 181	0.115 – 0.227 0.519 – 0.523 0.019 – 0.068 0.182 – 0.308	179 – с по-ниска честота при <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 181 – с по-висока честота при <i>A. m. macedonica</i> с произход България
A14	110 112 114 118	0.444 – 0.625 0.292 – 0.500 0.037 – 0.042 0.019 – 0.042	По-голямо алелно разнообразие на неконтролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 112 – по-висока честота при контролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 118 – наличен само при <i>A. m. macedonica</i> с произход България
A24	96 102 104 106 108	0.00 – 0.019 0.00 – 0.019 0.404 – 0.417 0.538 – 0.563 0.019 – 0.021	По-голямо алелно разнообразие при контролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България
A29	137 141 143 145 149 151 153 155 157 159 161 163 165 169 171	0.023 – 0.063 0.023 – 0.125 0.00 – 0.091 0.00 – 0.023 0.023 – 0.063 0.00 – 0.156 0.068 – 0.094 0.031 – 0.114 0.094 – 0.114 0.063 – 0.205 0.00 – 0.023 0.063 – 0.068 0.00 – 0.045 0.031 – 0.068 0.114 – 0.156	137 – само при <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 175 – само при селекционно контролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България
A43	123 128 137 139	0.167 – 0.300 0.00 – 0.020 0.680 – 0.813 0.00 – 0.021	128 – частен (0.02) в контролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 124 – само при популациите от Р. Македония; 141 – само при популацията от Гърция
A79	91 97 99 101 103 105 107 109 111 115 117 119	0.00 – 0.019 0.019 – 0.188 0.00 – 0.019 0.074 – 0.101 0.250 – 0.352 0.188 – 0.278 0.104 – 0.148 0.056 – 0.083 0.019 – 0.021 0.00 – 0.042 0.00 – 0.021 0.00 – 0.019	105 с най-висока честота в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> с произход България; Най-голямо алелно разнообразие при <i>A. m. macedonica</i> с произход България

A88	137 141 147 149	0.196 – 0.222 0.087 – 0.167 0.130 – 0.217 0.481 – 0.500	137 и 141 с по-висока честота в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 147 с по-ниска честота в сравнение с популациите <i>A. m. macedonica</i> с произход Гърция и Р. Македония; По-голяма алелно разнообразие за <i>A. m. macedonica</i> с произход Гърция
A113	214 216 220 222 226 228 230 232 234	0.630 – 0.654 0.043 – 0.058 0.019 – 0.022 0.043 – 0.096 0.065 – 0.096 0.038 – 0.109 0.00 – 0.022 0.019 – 0.022 0.019 – 0.043	222 – наличен само при <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 220 – с по-ниска честота при <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 216 – с по-висока честота или наличен само при <i>A. m. macedonica</i> с произход България Най-голямо алелно разнообразие при <i>A. m. macedonica</i> с произход България
Ac11	111 113 115 117 119 123 127	0.196 – 0.304 0.087 – 0.089 0.283 – 0.446 0.250 – 0.261 0.018 – 0.022 0.00 – 0.022 0.00 – 0.022	123 и 127 – само при <i>A. m. macedonica</i> с произход от България; Най-голямо алелно разнообразие при <i>A. m. macedonica</i> с произход България
Ac88	214 220	0.776 – 0.813 0.188 – 0.224	214 – с по-ниска честота, а 220 – с по-висока честота при <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 216 и 230 – не присъстват в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> с произход България; По-голямо алелно разнообразие при <i>A. m. macedonica</i> с произход Гърция и Р. Македония
Ac139	327 329 331 333	0.400 – 0.656 0.250 – 0.467 0.063 – 0.133 0.00 – 0.031	333 – сама при контролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България
Ap15	202 208 212 220	0.870 – 0.925 0.025 – 0.043 0.025 – 0.087 0.00 – 0.025	По-висока честота на срещане на 204 при <i>A. m. macedonica</i> с произход Р. Македония; По-висока честота на срещане на 212 при <i>A. m. macedonica</i> с произход Гърция; По-голямо алелно разнообразие на <i>A. m. macedonica</i> с произход България
Ap68	152 154 156 158 160 162 164	0.021 – 0.024 0.071 – 0.083 0.310 – 0.313 0.458 – 0.524 0.048 – 0.083 0.00 – 0.021 0.021 – 0.024	По-голямо алелно разнообразие на <i>A. m. macedonica</i> с произход България и Р. Македония

Ap85	186 188 190 194 200 202 204	0.429 – 0.522 0.071 – 0.109 0.00 – 0.024 0.043 – 0.095 0.00 – 0.048 0.261 – 0.310 0.024 – 0.065	188 с по-ниска честота на срещане в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 206 частен за <i>A. m. macedonica</i> с произход Р. Македония; 190 – само в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> с произход България; По-голяма алелно разнообразие на <i>A. m. macedonica</i> с произход България и Р. Македония
Ap90	129 131 133 135 151	0.083 – 0.120 0.500 – 0.600 0.200 – 0.313 0.060 – 0.083 0.00 – 0.021	133 с по-висока честота при <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 137 и 141 – само в <i>A. m. macedonica</i> с произход Р. Македония; 139 – само в <i>A. m. macedonica</i> с произход Гърция; 151 – само в неконтролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 155 – само в селекционно контролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България
Ap223	173 183 187	0.083 – 0.130 0.625 – 0.648 0.222 – 0.292	166 – частен за <i>A. m. macedonica</i> G от Гърция; 182 – частен за за <i>A. m. macedonica</i> с произход Р. Македония; Най-голямо алелно разнообразие за <i>A. m. macedonica</i> с произход Р. Македония
Ap224	279 281 283 287 289 291	0.00 – 0.017 0.138 – 0.182 0.086 – 0.182 0.386 – 0.569 0.182 – 0.190 0.00 – 0.68	279 – присъства само в генофонда на контролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 285 не присъства в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> с произход България
Ap226	233 237 239 247	0.00 – 0.019 0.269 – 0.326 0.522 – 0.615 0.096 – 0.152	235 – присъства само в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> от Р. Македония; 239 и 247 – с различна честотата на срещане в популациите на <i>A. m. macedonica</i> ;
Ap249	209 211 215 217 219 223 225	0.352 – 0.563 0.00 – 0.021 0.00 – 0.074 0.125 – 0.259 0.259 – 0.271 0.021 – 0.037 0.00 – 0.019	208 – само в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> от Р. Македония; 211 – таксономичен маркер за подвида <i>A. m. macedonica</i> ; 219 – с различна честотата на срещане в популациите на <i>A. m. macedonica</i> ; 225 – само в генофонда на контролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България; По-голямо алелно разнообразие в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> B и <i>A. m. macedonica</i> Mac
Ap273	104 106 108	0.021 – 0.080 0.920 – 0.958 0.00 – 0.021	102 не присъства в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> с произход България
Ap274	120 122	0.979 – 1.00 0.00 – 0.021	122 не присъства в генофонда на <i>A. m. macedonica</i> от Р. Македония
Ap288	123 124 130 131 139	0.722 – 0.729 0.00 – 0.021 0.00 – 0.019 0.241 – 0.250 0.00 – 0.019	121 – частен за <i>A. m. macedonica</i> с произход Р. Македония; 124 – частен за <i>A. m. macedonica</i> с произход България; 130 – само при контролираната <i>A. m. macedonica</i> с произход България

At168	128	0.625 – 0.680	130 – само при <i>A. m. macedonica</i> с произход Р. Македония; 136 – само при <i>A. m. macedonica</i> с произход България; По-голямо аелно разнообразие при <i>A. m. macedonica</i> с произход България;
	134	0.300 – 0.354	
	136	0.020 – 0.021	
At188	189	0.739 – 0.804	207 и 209 – при <i>A. m. macedonica</i> с произход Гърция и Р. Македония; 211 – само при <i>A. m. macedonica</i> с произход България
	199	0.00 – 0.109	
	205	0.036 – 0.043	
	211	0.018 – 0.022	
	212	0.00 – 0.018	
	213	0.065 – 0.089	
	217	0.018 – 0.022	
	219	0.00 – 0.018	

Представените обобщени резултати от европейския GEI експеримент относно ценни биологични и стопански качества на медоносните пчели, както и данните в таблици 40 – 42 показват, че българската медоносна пчела, която е най-адаптирана към конкретните условия на страната ни, се характеризира и с високо ниво на преживяемост, с висока плодовитост и продуктивност, със силно изявено хигиенно поведение, със слаба склонност към роене и др. значими показатели (Meixner et al., 2015). Нейният генофонд трябва да бъде съхранен, а за провеждането на научно обосновани мероприятия по консервацията и селекцията ѝ, е необходима система от надеждни генетични критерии, характеризиращи изменчивостта ѝ на популационно ниво. В този смисъл, настоящиящото проучване е актуално и предоставя оригинални данни относно популационно-генетичната изменчивост на *A. m. macedonica* в България, както и възможности за дискриминирането ѝ от популациите на същия подвид на територията на Балканите и от другите подвидове на *Apis mellifera*. В това проучване се засяга и темата за възможността българската медоносна пчела да е различен екотип на подвида *A. m. macedonica*, адаптирал се успешно към условията на страната ни и запазил при тази адаптация ценните си биологични и стопански качества. Представените обобщени специфични генетични характеристики за българската медоносна пчела, съпоставени с данните за анализирания в GEI експеримента биологични и стопански нейни качества, са в подкрепа на това предположение.

Формирането на български екотип следва да е резултат не само от географска диференциация по отношение на местните популации на *A. m. macedonica* на територията на България, Гърция и Р. Македония, но също и на целенасочена селекционна дейност с българската медоносна пчела. В този смисъл, тук е мястото да се отбележи, че в „Развъдната програма за съхраняване на местната за страната българска медоносна пчела“ (Петров и Ганев, 2013) е отбелязано: „Основна цел на развъдната работа е запазване на генофонда и генетичната разнообразие на българската медоносна пчела, възстановяване и поддържане на нейните чисти популации, устойчивото им използване чрез затвърждаване на биологичните и продуктивни качества на пчелните семейства, осигуряващи тяхната типичност и устойчивост на заболявания“.

Националната програма се прилага в България вече повече от 15 години. В стараната ни официално е забранен вносът на чужди майки от други подвидове. В глава четвърта от Закона за пчеларството (последно изм. и доп. ДВ. бр. 61 от 25 Юли 2014 г.), в чл. 18. (1) се казва „В Република България се отглеждат само местни отродия пчели и/или вътрелинейните им и междулинейните кръстоски“, а в чл. 20. (1) – „Забраняват се:

1. вносът, разпространението и отглеждането на пчелни майки, семейства и рояци извън определените по чл. 18, ал. 1...“. Базите на Националната развъдна асоциация по

пчеларство функционират на територията на цялата страна, произвеждайки и продавайки пчелни майки и пчелни рояци от местната медоносна пчела в България. Тези важни обстоятелства, в комплекс с географска диференциация, са в основата генетичното разнообразие сред местните популации на българската медоносна пчела. Представените в Таблица 39 алоензимни показатели демонстрират високо ниво на генетично сходство сред контролираните и неконтролирани популации на *A. m. macedonica*. Именно тази консолидация е в основата и на възможностите за ясно разграничаване на българската *A. m. macedonica* от другите популации на този подвид, както и причина за съществуването на местен екотип – „*rodopica*“ на подвида *A. m. macedonica* на територията на България.

## ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ИЗВОДИ

*Проведеното изследване и получените на базата на разнообразни генетични подходи резултати позволяват детайлното характеризиране на генетичната изменчивост сред изследваните популации на българската медоносна пчела от всички географски райони и подрайони на територията на България.*

*Приложеният в хода на настоящото изследване комплексен сравнителен генетичен анализ предоставя обоснована теза за принадлежност на българските медоносни пчели към подвида *Apis mellifera macedonica* и за наличието на специфични генетични характеристики, които ги определят като различен екотип на територията на България, именуван по-рано от Петров (1990) като „*rodopica*“.*

*Проведеното комплексно изследване предоставя обобщена, систематизирана и обогатена информация относно генетичния полиморфизъм в популациите на българската медоносна пчела като характеризира нивото на генетичната ѝ диференциация спрямо други популации на подвида *Apis mellifera macedonica* от територията на Балканския полуостров и спрямо други подвидове на *Apis mellifera*, обитаващи територията на Европа.*

*Обобщените популационно-генетични резултати от настоящото изследване предоставят значима информация относно наличието на надеждни генетични маркери, приложими за формирането на система от дейности по консервацията на националните генетични ресурси от *A. mellifera* и за оценка на популациите българска медоносна пчела като изходен материал за научно обоснована селекционна дейност.*

Получените в настоящото изследване резултати и направените сравнителни анализи дават основание за формулирането на следните конкретни изводи:

### I. В таксономичен аспект

1. Обитаващият територията на България подвид медоносни пчели е *Apis mellifera macedonica*. Същият е ясно генетично различим от подвидовете *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. caucasica*, *A. m. mellifera* и *A. m. siciliana* по комплекс от алоензимни и микросателитни показатели;
2. Установените стойности на генетична дистанция, фиксационен индекс  $F_{ST}$  и поток от гени  $Nm$  демонстрират ниски нива на генетична диференциация между популациите на подвида *A. m. macedonica* и *A. m. carnica*, умерени нива на генетична диференциация между популациите на подвида *A. m. macedonica* и *A. m.*



*ligustica* и между *A. m. macedonica* и *A. m. anatoliaca*; значително високи нива на генетична диференциация между *A. m. macedonica* и *A. m. mellifera*;

3. Приложеният тест за принадлежност на базата на алоензимни и ДНК микросателитни показатели демонстрира отчетлива диференциация по отношение на сравняваните подвидове на *Apis mellifera*.

## II. В популационен аспект

4. На територията на България обитава подвидът *Apis mellifera macedonica*, микроеволюционно диференциран от пулациите му от територията на Гърция и Република Македония по комплекс от алоензимни, митохондриални и микросателитни ДНК характеристики;
5. При сравнителния филогенетичен анализ, базиран на установените генетични дистанции, популациите на подвида *A. m. macedonica* с различен произход са групирани в общ подкластер, в рамките на който е налице отчетливо допълнително субкластриране на българските, гръцките и македонските популации;
6. По всичките анализирани ензимни, митохондриални и микросателитни локуси са описани генетични разлики с потенциал на популационни маркери, които отличават популациите на българската медоносна пчела от останалите популации на *A. m. macedonica*;
7. На базата на установените стойности на фиксационния индекс  $F_{ST}$  и потока от гени  $Nm$  са отчетени ниски нива на генетична диференциация между българските популации и популациите на подвида *A. m. macedonica* от територията на Гърция и Република Македония;
8. По анализираните алоензимни и микросателитни локуси са описани конкретни популационно-генетични разлики, засягащи особености на алелното разнообразие в генофонда и значими различия в честотите на срещане на определени алелни варианти, които отличават популациите на българската медоносна пчела от останалите популации на *A. m. macedonica*. Установени са алели, налични само в генофонда на изследваните български популации.

## III. Специфични генетични характеристики на българската медоносна пчела *A. m. macedonica*

9. Обитаващите територията на България неконтролирани локални популации на местната медоносна пчела *A. m. macedonica* в по-голямата си част са генетично близки със селекционно контролираните. Констатираното алелно разнообразие и честотите на срещане на отделните алели по всички алоензимни и по повечето микросателитни локуси демонстрира значимо генетично сходство между анализираните популации на подвида *Apis mellifera macedonica* в България;
10. Общата топология на филогенетичните схеми по отношение на изследваните популации на българската медоносна пчела демонстрира вътрешно подразделяне на южните пчелни популации от северните;
11. Базираните на алоензимен и микросателитен ДНК анализи стойности на фиксационния индекс  $F_{ST}$ , потокът от гени  $Nm$  и генетичната дистанция между изследваните неконтролирани и селекционно контролирани популации на българската медоносна пчела сочат ниски нива на генетична диференциация, високи нива на поток от гени и значимо генетично сходство;
12. Не е установена вътрепопулационна и междупопулационна изменчивост сред анализираните популации на българската медоносна пчела на базата на проведеня митохондриален ДНК анализ;
13. Обобщените данни от проведеня комплексен генетичен анализ, сочат наличие на специфични генетични характеристики, отличаващи българската медоносна

пчела от останалите популации на подвида *A. m. macedonica*. Те са достатъчно основание за обсъждане и приемане на обстоятелството, че на територията на България обитава различен екотип на подвида *A. m. macedonica*, който би могъл да носи предложеното от Петров (1990) наименование „*rodopica*“;

14. Направен е избор и е представена система от подходящи генетични маркери за оценка и разграничаване на българската медоносна пчела *A. m. macedonica*, съпоставима с нейните ценни биологични и стопански качества и приложима в бъдещи дейности по консервацията на националните генетични ресурси на *A. m. macedonica* и селекцията ѝ в България.

## ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Приноси с оригинален научен характер

1. Оригинален научен принос е характеризирането на генетичния полиморфизъм и степента на генетична хетерогенност в популации на местната медоносна пчела *Apis mellifera macedonica* от територията на България на базата на комплексен генетичен подход, обединяващ ензимен, митохондриален и микросателитен ДНК анализи по общо 33 локуси.
2. Оригинален научен принос е констатираната липса на вътрепопулационна и междупопулационна изменчивост на базата на митохондриален ДНК анализ.
3. Петнадесет от включените в изследването 24-те микросателитни локуси са използвани за първи път при характеризиране на генетичния полиморфизъм сред българските популации медоносни пчели.
4. Оригинален научен принос е сравнението между популации на българската медоносна пчела с други произходи на *A. m. macedonica* и с други подвидове на *Apis mellifera* на базата на комплексен генетичен подход, обединяващ ензимен, митохондриален и микросателитен ДНК анализи. Отчетени са общо 23 алелни варианта за 6-те ензимни локуса и 260 варианта за 24-те микросателитни локуси.
5. За първи път на базата на алоензимен анализ по 6 локуса е направена детайлна сравнителна характеристика на генетичната изменчивост в популации с различна принадлежност към произходи и подвидове на вида *Apis mellifera*.
6. Оригинален научен принос са отчетените популационно-генетични различия при сравнение на местните популации *A. m. macedonica* от България с популации медоносни пчели, принадлежащи към различни генетични произходи и подвидове на *Apis mellifera*.
7. Оригинален научен принос са проучените и характеризирани филогенетични връзки между популациите на българската медоносна пчела и изследваните европейски популации на вида *Apis mellifera*.
8. За първи път на базата на комплексен генетичен подход, обединяващ ензимен, митохондриален ДНК и микросателитен ДНК анализи, е характеризирана подвидовата принадлежност на българските медоносни пчели и са описани биохимико-генетични, митохондриални и микросателитни ДНК маркери за разграничаването ѝ като различен екотип на подвида *A. m. macedonica*.

### Приноси с оригинален научно-приложен характер

9. Описани са надеждни ензимни, митохондриални и микросателитни ДНК маркери, приложими за формирането на система от дейности по консервацията на националните генетични ресурси от *A. mellifera* и за оценка на популациите *A. m. macedonica* на територията на България като изходен материал за научно обоснована селекционна дейност.

10. На базата на ензимен и микросателитен ДНК анализ са характеризирани подложени на селекционен контрол популации медоносни пчели от България и Европа и получените резултати са предоставени за сравнение в общ европейски експеримент, целящ проучване на взаимовръзката „генотип – околна среда“ и корелацията между генетични характеристики и комплекс от биологични и стопанско значеми качества на медоносните пчели.

#### Приноси с потвърдителен характер

11. На базата на комплексен генетичен подход е потвърдена тезата на Петров (1990), базирана на класически морфометричен анализ, че българската медоносна пчела притежава специфични характеристики, отличаващи я от другите популации на балканските подвидове, както и основанието му на тази база да я именува като „*A. m. rodopica*“, с уточнението, че не става въпрос за различен подвид на *Apis mellifera*, а за вероятен екотип на подвида *A. m. macedonica*, адаптиран към конкретните за България условия на средата.

### **СПИСЪК**

**на научните трудове на проф. д-р Евгения Нешова Иванова,**

които са по темата на настоящия дисертационен труд и извън списъка с публикации, представен към дисертационния труд за получаване на научната и образователна степен „доктор“

**I. Научни публикации в списания, поредици и сборници по темата на настоящия дисертационен труд, рецензирани във връзка с получаване на академичната длъжност „доцент“ (2006 г.):**

1. Ivanova E., Popov P., Dobrovolov I., Tersieva P. (1996) Polymorphismus der MDH-loci bei Imagines von *Apis mellifera* L. aus Bulgarien. *Animalia*. 32 (6), 43-51.
2. Ivanova E., Popov P., Dobrovolov I., Tersieva P. (1997) Untersuchungen uber Superoxyddismutasen (SOD) bei Honigbienen, *Apis mellifera* L. in Ontogeneseverlauf. *Animalia*. 33 (6), 55-59.
3. Иванова Е., Стоянов И. (1997) Органна специфичност на LDH-изоензимната изява в хода на онтогенезата при *Apis mellifera* L. *Animalia*. 33 (6), 61-66.
4. Ivanova E., Popov P. (1997) Untersuchungen uber Isoformen der LDH bei *Apis mellifera* L. im Verlauf der Ontogenese. *Apidologie*. 28, 17-24 – IF – 0.767.
5. Ivanova E. (1998) Electrophoretic studies on NAD P-dependent malate dehydrogenases (ME) during ontogenesis of *Apis mellifera* L. in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarika*. 50 (2/3), 141-146.
6. Ivanova E., Popov P., Dobrovolov I. (1998) Dynamics in the expression during ontogenesis of NAD-dependent MDH in *Apis mellifera* L. in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarika*. 50 (2/3), 133-139.
7. Иванова Е. (1999) Органна специфичност в изявата на естеразните изоензими в ларвен и предкакавиден стадий от онтогенезата на *Apis mellifera* L. *Animalia*. 35 (6), 91-98.
8. Иванова Е., Попов П., Доброволов И., Терзиева П. (1999) Проучвания върху супероксиддисмутази при медоносните пчели *Apis mellifera* L. в хода на онтогенезата. Сборник доклади по биология и география. Юбилейна научна конференция „25 години Шуменски Университет“ Шумен 30.X. – 1. XI. 1996 г., 83-85.
9. Popov P., Ivanova E., Dobrovolov I., Dimitrov B., Tersieva P. (2000) Population-genetic Study of *Apis mellifera* L., Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 6, 433-438.

10. Иванова Е., Джеферова М. (2000) Електрофоретично проучване на изявата и генетичния контрол на неспецифичните естерази в хемолимфа на пчели-работнички от *Apis mellifera*. Научни трудове на Съюза на учените в България – Пловдив, серия Б. Естествени и хуманитарни науки. I, 409-412.
11. Иванова Е., Рашева Д., Ирикова Т. (2000) Електрофоретично проучване на изявата и генетичния контрол на неспецифичните естерази в средно черво при работни индивиди от *Apis mellifera*. Научни трудове на Съюза на учените в България – Пловдив, серия Б. Естествени и хуманитарни науки. I, 413-416.
12. Ivanova E. (2000) Elektrophoretische Untersuchungen zur Organspezifität der wasserlöslichen Proteine in der Ontogenese von Drohnen (*Apis mellifera* L.). // *Apidologie*. 31, 671-677. **IF – 1.384**
13. Ivanova E., Popov P., Dobrovolev I. (2000) Elektrophoretische Untersuchungen der wasserlöslichen Proteine bei der Honigbiene *Apis mellifera* L. im Verlauf der Ontogenese. *Apidologie*. 31, 679-687. **IF – 1.384**
14. Ivanova E., Dobrovolev I., Tersieva P. (2001) Isoelectrophoretic Studies of stage specificity of soluble protein expression of *Apis mellifera* L., Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 7, 73-76.
15. Ivanova E., Dobrovolev I., Tersieva P. (2001) Variability of Isoelectrophoretic Spectra of Total Water-Soluble proteins Depending on Honeybee Susceptibility to *Bacillus* larvae. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 7, 348-350.
16. Ivanova E. (2001/2002) Electrophoretic investigation of the expression of non-specific esterases in haemolymph, heart, Malpighian tubules, fat body and eyes of workers of *Apis mellifera* L. *Genetics and Breeding*. 31 (3-4), 61-64.
17. Иванова Е. (2003) Генетичен контрол на органната специфичност в изявата на NAD – зависимите малатдеhidрогенази (MDH) в хода на онтогенезата при медоносните пчели (*Apis mellifera* L.). *Microbiologia et Cytologia*. 39 (8), 45-51.
18. Ivanova E. (2003) Electroforetic investigations on the tissue and organ specificity of expression of water-soluble proteins of female imago forms of *Apis mellifera* L. *Genetics and Breeding*. 32 (3-4), 23-27.
19. Ivanova E. (2004) Comparative electrophoretic investigation on the age and organ specificity of expression of soluble proteins of male imago forms of *Apis mellifera* L. *Genetics and Breeding*. 33 (1-2), 23-28.
20. Ivanova E. (2004) Dynamics in the expression of non-specific esterases (EST) and NAD-dependent malate dehydrogenases (MDH) in mucus, bulbous and cornual glands in drones of honeybees *Apis mellifera* L. *Genetics and Breeding*. 33 (3-4), 55-62.

**II. Научни публикации в списания, поредици и сборници по темата на настоящия дисертационен труд, рецензирани във връзка с получаване на академичната длъжност „професор“:**

***II.A. Публикации в реферирани списания с импакт фактор и SJR***

21. 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. **IF – 0.743**
22. Ivanova E., Staykova T. (2007) Stage specificity in the expression of proteins of honey bee fat body (*Apis mellifera* L.) in the course of ontogenesis. *Journal of Cell and Molecular Biology*. 6 (2), 129-135. **SJR – 0.03**

23. Ivanova E., Petrov P. (2010) Regional differences in honey bee winter losses in Bulgaria during the period 2006-9. *Journal of Apicultural Research*. 49 (1), 102-103. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.17. **IF – 1.028**
24. Meixner M., Costa C., Kryger P., Hatjina F., Bouga M., Ivanova E., Büchler R. (2010) Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *Journal of Apicultural Research*. 49 (1), 85-92. DOI 10.3896/IBRA.1.49.1.12. **IF – 1.028**
25. Ivanova E., Petrov P., Bouga M., Emmanouel N., Ivgin-Tunka R., Kence M. (2010) Genetic Variation In Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Populations From Bulgaria. *Journal of Apicultural Science*. 54 (2), 49-60. **IF – 0.489**
26. Bouga M., Alaux C., Bienkowska M., Büchler R., Carreck N., Cauia E., Chlebo R., Dahle B., Dall'Olio R., De la Rúa P., Gregorc A., Ivanova E., Kence A., Kence M., Kezic N., Kiprijanovska H., Kozmus P., Kryger P., Le Conte Y., Lodesani M., Murilhas A. M., Siceanu A., Soland G., Uzunov A., Wilde J. (2011) A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping (Review article). *Journal of Apicultural Research*. 50 (1), 51-84. DOI 10.3896/IBRA.1.50.1.06. **IF – 1.028**
27. Ivanova E. N., Bienkowska M., Petrov P. P. (2011) Allozyme Polymorphism and Phylogenetic Relationships in *Apis mellifera* Subspecies Selectively Reared in Poland and Bulgaria. *Folia biologica (Kraków)*. 59 (3-4). DOI:10.3409/fb59\_3-4.09-13. **IF – 0.761**.
28. Nikolova S. N., Ivanova E. N. (2012) Genetic variability in a local Bulgarian honey bee population. *Acta Zoologica Bulgarica*. 64 (1), 199 – 204. **IF – 0.269**

### ***II.B. Публикации в реферирани списания без импакт фактор***

29. Иванова Е., Стайкова Т. (2005) Възрастова специфичност в експресията на протеините от мастното тяло на медоносната пчела (*Apis mellifera* L.) в хода на ларвното развитие. *Аграрен Университет – Пловдив, Научни трудове*. L, 3, 35 – 40.
30. Ivanova E., Staykova T., Petrov P. (2006) Some preliminary data about genetic variability in local Bulgarian honeybee *Apis mellifere*. *Proceedings of International Apimondia Symposium „Selection and Queen Breeding“*. Bulgaria, 1-3 September 2006, 1-11.
31. Ivanova E., Petrov P. (2009) *La Bulgarie La diversite, l'apiculture et la vitalite – la situation actuelle des abeilles bulgares*. *Bulletin Technique Apicole*. 146, 36 (2), 67. ISSN 0335 3710.
32. Ivanova E., Bouga M. (2009) Genetic variability in honey bee population from Northern Bulgaria. *Proceedings of the 41<sup>st</sup> Congress Apimondia*, 15-20 September, 2009, Montpellier – France.
33. Ivanova E. (2010) Investigation on genetic variability in honeybee populations from Bulgaria, Greece and Serbia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 24 (2), 385–389.
34. Staykova T., Ivanova E. (2011) Concerning genetic variability and usable isozyme markers for characterization of *A. mellifera* L. populations and *B. mori* L. breeds in Bulgaria. *Advances in Bulgarian Science*. 20-28.
35. Иванова Е., Николова С. (2012) Създаване на банка с ДНК образци от популации *Apis mellifera*, обитаващи територията на България. *Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“ Юбилеен сборник „Биологически науки за по-добро бъдеще“*. 77 – 88.
36. 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.

### III. Научни публикации по темата на дисертационния труд, извън представените за академичните длъжности „доцент“ и „професор“:

37. Ivanova E., Staykova T., Petrov P. (2007) ALP as population-genetic markers for *Apis mellifera*. Science, education and time as our concern. III, 23-26.
38. Ivanova E., Ivgin-Tunka R., Staykova T. (2009) Genetic characterization of honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Bulgaria using allozymes. Genetics and Breeding. 38 (1), 67-74.
39. Petrov P., Ivanova E. (2009) Morpho-ethological and biochemical-genetic characteristics of the local Bulgarian honey bee *Apis mellifera rodopica*. Proceedings of the 41st Congress Apimondia, 15-20 September, 2009, Montpellier – France. цитирана в списание с IF
40. Ivanova E., Staykova T., Petrov P. (2010) Allozyme variability in populations of local Bulgarian honey bee. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 24 (2), 371 – 374. цитирана в списание с IF
41. Costa C., Büchler R., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Bubalo D., Charistos L., Conte Y. L., Drazic M., Dyrba W., Fillipi J., Hatjina F., Ivanova E., Kezic N., Kiprijanovska H., Kokinis M., Korpela S., Kryger P., Lodesani, M., Meixner M., Panasiuk B., Pechhacker H., Petrov P., Oliveri E., Ruottinen L., Uzunov A., Vaccari G., Wilde J. (2012) A Europe-wide experiment for assessing the impact of genotype-environment interactions on the vitality of honey bee colonies: methodology. Journal of Apicultural Science. 56 (1), 147-158. DOI: 10.2478/v10289-012-0015-9. IF – 0.674.
42. Ivanova E., Bouga M., Staykova T., Mladenovic M., Rasic S., Charistos L., Hatjina F., Petrov P. (2012) The genetic variability of honey bees from the Southern Balkan Peninsula, based on alloenzymic data. Journal of Apicultural Research. 51(4), 329-335. DOI 10.3896/IBRA.1.51.4.06. IF – 1.531.
43. Ivanova E., Bienkowska M., Panasiuk B., Wilde J., Staykova T., Stoyanov I. (2012) Allozyme Variability in Populations of *Apis mellifera mellifera*, (Linnaeus 1758.), *A. m. carnica* (Pollman, 1879) and *A. m. caucasica* (Gorbachev, 1916) from Poland. Acta zoologica Bulgarica. 4, 79-86. IF – 0.309.
44. Meixner M., Pinto M. A., Bouga M., Kryger P., Ivanova E. and Fuchs S. (2013) Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. Journal of Apicultural Research. 52 (4), 27 (2013) © IBRA 2013 DOI 10.3896/IBRA.1.52.4.05. IF – 1.926.
45. Uzunov A., Meixner M., Kiprijanovska H., Andonov S., Gregorc A., Ivanova E., Bouga M., Dobi P., Büchler R., Francis R. and Kryger P. (2014) Genetic structure of *Apis mellifera macedonica* in the Balkan Peninsula based on microsatellite DNA polymorphism. Journal of Apicultural Research. 53 (2), 288-295 (2014) © IBRA 2014 DOI 10.3896/IBRA.1.53.2.10 IF – 1.926.
46. 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. and Wilde J. (2014) The genetic origin of honey bee colonies used in the COLOSS Genotype-Environment Interactions Experiment: a comparison of methods. Journal of Apicultural Research. 53(2): 188-204 (2014) © IBRA 2014 DOI 10.3896/IBRA.1.53.2.02 IF – 1.926.
47. Meixner M., Francis R., Gajda A., Kryger P., Andonov S., Uzunov A., Topolska G., Costa C., Amiri E., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Dyrba W., Gurgulova K., Hatjina F., Ivanova E., Janes M., Kezic N., Korpela S., Le Conte Y., Panasiuk B., Pechhacker H., Tsoktouridis G., Vaccari G. and Wilde J. (2014) Occurrence of parasites and pathogens in honey bee colonies used in a European genotype-environment interactions experiment. Journal of Apicultural Research. 53 (2), 215-229 (2014) © IBRA 2014 DOI 10.3896/IBRA.1.53.2.04 IF – 1.926.

48. Uzunov A., Costa C., Panasiuk B., Meixner M., 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., Büchler R. (2014) 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 (2014) © IBRA 2014 DOI 10.3896/IBRA.1.53.2.06 **IF – 1.926**.
49. Francis R., Amiri E., Meixner M., Kryger P., Gajda A., Andonov S., Uzunov A., Topolska G., Charistos L., Costa C., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Dyrba W., Hatjina F., Ivanova E., Kezic N., Korpela S., Le Conte Y., Panasiuk B., Pechhacker H., Tsoktouridis G. and Wilde J. (2014) Effect of genotype and environment on parasite and pathogen levels in one apiary – a case study. *Journal of Apicultural Research*. 53 (2), 230-232 (2014) © IBRA 2014 DOI 10.3896/IBRA.1.53.2.14 **IF – 1.926**.
50. Hatjina F., Bieńkowska M., Charistos L., Chlebo R., Costa C., Dražić M., Filipi J., Gregorc A., Ivanova E., Kezić N., Kopernicky J., Kryger P., Lodesani M., Lokar V., Mladenovic M., Panasiuk B., Petrov P., Rašić S., Smodis Sker M., Vejsnæs F. and Wilde J. (2014) A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *Journal of Apicultural Research*. 53 (3), 337-363 (2014) © IBRA 2014 DOI 10.3896/IBRA.1.53.3.02 **IF – 1.926**.
51. Peševa V., Stoyanov I., Andjelkovic B., Mladenović :M., Georgieva V., Ivanova E. (2015) Allozyme Genetic analysis of selectively reared in Kosovo *Apis mellifera carnica* lines. *Acta Zoologica Bulgarica* 67, 4567-572. **IF – 0.532**.
52. Nikolova S., Bienkowska M., Gerula D., Ivanova E. (2015) Microsatellite DNA polymorphism in selectively controlled *D. m. carnica* and *A. m. caucasica* populations from Poland. *Archives of Biological Sciences*. 67 (3), 889-894. DOI: 10.2298/ABS141102048N. **IF – 0.718**.
53. Meixner M., Büchler R., Costa C., Andonov S., Bienkowska M., Bouga M., Janja Filipi, Hatjina F., Ivanova E., Kezic N., Kryger P., Le Conte Y., Panasiuk B., Petrov P., Lauri Ruottinen, Uzunov A., and Wilde J. (2015) Looking for „the Best Bee“ An experiment about interactions between origin and environment of honey bee strains in Europe. *American Bee Journal*. 155 (6), 663 – 666. **IF – 0.042**.
54. Ivanova E. (2015) Additional information concerning allozyme variability of Bulgarian honey bees. *Acta Zoologica Bulgarica*. 67 (4), 573-578. **IF – 0.532**.
55. 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.
56. 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. **JI – 0.41; SJR – 0.212**

**Резултатите от настоящото проучване са популяризирани чрез 46 участия в международни форуми (без публикувани доклади).**

**По данни на Scopus посочените публикации са цитирани над 200 пъти и е отчетен H-индекс – 8 на автора на дисертационния труд.**

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

*ИЗКАЗВАМ БЛАГОДАРНОСТ на всички колеги от България и Европа, подпомогнали настоящото изследване!*

*БЛАГОДАРЯ на катедра „Биология на развитието“ и на Биологическия факултет за предоставените ми условия и творческа свобода за реализирането му!*

*Благодаря на колегите от сектора по генетика и на техническия екип за конкретната помощ в моменти на напрежение и съпричастността с това проучване!*

*ИЗКАЗВАМ БЛАГОДАРНОСТ НА:*

- *Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“;*
- *Министерството на образованието и науката;*
- *Министерството на земеделието и храните;*
- *Проектните системи на Европейския съюз – мярка Е по едногодишна и тригодишна програми за 2009 и 2011 г. и COST – FA0803 – COLOSS – за предоставените средства и възможности за широко сътрудничество по проектна дейност, без които не би било възможно събирането на материал, закупуването на реактиви и апаратура, провеждането на експерименти, анализирането и популяризирането на получените резултати;*
- *Националната Развъдна Асоциация по Пчеларство – за предоставения материал и за оказваната помощ!*

*БЛАГОДАРЯ НА:*

- *проф. д-р Пламен Павлов Петров – за проведените дискусии, за съпричастността и за вдъхновяващата работа в екип;*
- *доц. д-р Теодора Атанасова Стайкова – за дългите години вълнуваща съвместна работа, за професионализма и доброто приятелство;*
- *моя съпруг – за обичта и подкрепата;*
- *майка ми и брат ми – за корените;*
- *цялото ми семейство – ЗА ВЯРАТА И ЛЮБОВТА!*