

Евгения Нешова Иванова

**ПОПУЛАЦИОННО-ГЕНЕТИЧНОТО БОГАТСТВО
НА БЪЛГАРСКАТА МЕДОНОСНА ПЧЕЛА
И ИСТОРИЯТА
НА ЕДНО 25-ГОДИШНО НАУЧНО ПЪТУВАНЕ**

**УНИВЕРСИТЕТСКО ИЗДАТЕЛСТВО
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“**

*Рецензенти
на научния труд:*

проф. д.б.н. Параскева Владимирова Михайлова
проф. д.б.н. Георги Георгиев Марков
проф. д.с.н. Светозар Пенев Тянков

*Изготвили
становища:*

проф. д.б.н. Павел Атанасов Ангелов
проф. д.с.н. Дияна Лилова Светлева
доц. д-р Петя Павлова Иванова
доц. д-р Ценка Георгиева Часовникарова

© Евгения Нешова Иванова – автор, 2018

© Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, 2018

ISBN 978-619-202-393-5

СЪДЪРЖАНИЕ

<i>Към читателя</i>	5
МИСИЯ <i>APIS MELLIFERA</i> – ТЪРСЕНИЯ, ПОСОКИ И ПРОЗРЕНИЯ	9
1992 – 1996.....	11
1997 – 2001.....	21
2002 – 2007.....	26
2008 – 2012.....	31
2013 – 2017.....	45
НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ	53
УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ.....	60
ПРОЕКТИ	66
ПОПУЛАЦИОННО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА <i>APIS MELLIFERA</i> L. В БЪЛГАРИЯ.....	78
ВЪВЕДЕНИЕ	80
ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	85
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	109
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ.....	111
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	130
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	264
ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ИЗВОДИ	285
ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	288
ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА	290
БЛАГОДАРНОСТИ	314

Към читателя

*Настоящата книга поради синкретичния си характер би могла да има немалко читатели. Това е така, защото в нея съм се опитала да отправя послания към по-широка аудитория от четящи и мислещи хора. Определено това не е роман или новела с драматичен и много динамичен сюжет, но като четиво не е лишено от основна идея, поставени цели и задачи, споделени истории, разсъждения и лични преживявания, както и от конкретни и сериозни научни резултати. Затова книгата има основния характер на научна монография – в нея са представени подробните данни от дисертационното ми проучване за придобиване на научната степен „доктор на науките“ в професионалното направление 4.3. „Биологични науки“ и научната специалност „Генетика“. В книгата монография съм използвала донякъде популярен, отчасти – поетичен, но основно – строго научен стил на изразяване. Посветила съм я на българската медоносна пчела, която лично за мен се превърна в особена творческа съдба, знак и откровение. Имам очакването и надеждата книгата да бъде възприета и като зов за спасяването на *Apis mellifera*, макар че за това почти не се говори конкретно в текста – чете се между редовете. Основният аспект на представеното проучване е свързан с популационно-генетичното разнообразие на българската медоносна пчела, но е обогатен и с историята на това проучване, случвала се във времето за период от четвърт век. Книгата съм разработила в две части: първата – популярна и в известна степен справочна, в която по периоди разказвам за хората, местата, ситуацията, работата и резултатите, решенията и колебанията, които срещнах по пътя на това научно пътешествие; втората – строго научна, в която запознавам читателя със същността на изследването, литературните проучвания, поставените цели, използваните методи и конкретните получени резултати заедно с анализите и обсъжданията им. С цел предоставяне на максимална информация за интересующите се от проучвания проблем в тази част съм представила почти пълното съдържание на дисертационното ми изследване. Направила съм определени редакции и допълнения за улеснение на читателите, които не е задължително да са непременно биолози.*

Синтезираната и предоставена в настоящата книга монография информация адресирам: 1) към младите хора, изкушени от научно развитие – защото трябва да знаят, че то изисква натрупани знания, усвоени умения, обща компетентност, усет към загадката,

смелост, действие, търпение, безкористност и благодарност; 2) изследователите на *Apis mellifera* в България – защото има още много, което дължим на нашите медоносни пчели, и 3) българските пчелари, независимо от това в какви организации, асоциации или дружества членуват – защото те са основни действащи лица в процеса на общуването с пчелите и защото, освен че полагат грижа за медоносните пчели, също така използват труда им и предоставят събраните от неуморната им работа блага на други потребители. Мисля, че четейки книгата, макар и да срещнат трудности при разбирането на значима част от научната терминология, занимаващите се с професионално или любителско пчеларство трябва да обърнат особено внимание на обобщените текстове, представящи данни за ценните качества на българската медоносна пчела, които са установени в обективен и безпристрастен сравнителен европейски експеримент, отчетени и публикувани в престижни научни списания от независими експерти.

Иска ми се по-младите от мен изследователи в областта на апидологията и конкретно в сферата на генетиката на медоносните пчели: да са добре литературно подготвени – затова представям и пълния литературен обзор към това проучване, както и богат списък с цитираната в него литература; да знаят какво точно, как и от кого е направено до момента – затова представям информация за работата ми през годините, хората и екипите, с които съм работила, и научните проекти, в които съм участвала или съм ръководела; да използват събраната информация като база за сравнение или за надграждане – защото постигнатото с много труд и за дълъг период от време не бива да се разпилява и е правилно да бъде продължено, осъвременено и надградено и защото тенденциите не могат да се отчитат без налична база; да осъзнаят преимуществата на екипната работа като гарант за по-голяма обективност, както и нейния богат идеен и приложен потенциал, и винаги, когато имат възможност, да я предпочитат пред индивидуализма – защото комплексният подход на това изследване и осъщественото сътрудничество в хода му го потвърждават. Споделила съм мои разсъждения, лични прозрения и случили се истории, които по различен начин са докоснали сетивността ми, единствено с надеждата, че в своята работа младите изследователи трябва да търсят и намират вдъхновение от всички обстоятелства и хора, срещнати по пътя на научното дирене.

Надявам се резултатите и заключенията от това проучване да достигнат до повече хора – изследователи и пчелари, да бъдат осъзнати и разбрани от тях. Бъдещи промени в състава на генофонда и в генетичната структура на пчелните популации в България на практика не са изключени – те са провокирани както от разнообразни естествени фактори на средата, така и от некомпетентно човешко вмешателство. Все по-често в интернет пчеларските форуми се появяват обяви за продажба на пчелни майки с чужд произход, които замърсяват генетичното богатство на българската медоносна пчела, намаляват устойчивостта и продуктивността ѝ – продават се майки карника, лигустика, дори Бъкфаст (!), без да се знаят подробности за точния им произход и специфичните им качества. Добре е българските пчелари да осъзнаят, че хибридни пчелни майки като Бъкфастките, притежаващи смесена наследственост с неизвестен произход, ще създадат разпадащо се потомство с неуточнени продуктивни и поведенчески характеристики, чрез което силно негативно би се повлиял съставът на генофонда на местната за България медоносна пчела. Не е трудно да се проумее, че при развъждането и отглеждането на медоносните пчели е нужна отговорност.

Иска ми се нашите майкопроизводители и майкоразпространители, както и родните ни пчелари да осъзнаят силата на пчелите с български произход – проучванията на независими изследователи доказват, че те са най-добре адаптирани към местните за страната ни условия и в същото време при тези условия са достатъчно жизнеспособни и устойчиви, продуктивни, миролюбиви, с висок хигиенен потенциал. Иска ми се да добият по-голямо доверие към нас – изследователите, защото заедно трябва да съхраним националния генетичен ресурс на българската медоносна пчела. Ако желаем, можем заедно, базирайки се на научно обосновани принципи, да развъждаме и отглеждаме българската медоносна пчела, да сме милостиви към нея и благодарни за всичко, което ни дарява. Има защо...

МИСИЯ *APIS MELLIFERA* – ТЪРСЕНИЯ, ПОСОКИ И ПРОЗРЕНИЯ

„Кошерите опустяват. Едно от най-домашните същества губи способността да се върне вкъщи, изгубва се, умира. Запомнете тази диагноза. Colony Collapse Disorder. Разпад на пчелното семейство, синдром на разрушената колония... Ако това се случва с тях, какво остава за човека и несигурното му семейство. В това има повече апокалипсис, отколкото във всички други абри-кадабри. Пчелите са първият знак. Бръмчащите ангели на апокалипсиса. Чакаме йерихонски тръби, а се чува само бззззз...бзззз... бзззз..., затихващо и чезнещо. Това е сигналът. Не го чувате? Просто си извадете слушалките на айпода от ушите.“

Из „Физика на тъгата“ от Георги Господинов

1992 – 1996

*Пробуди се нещо в душата ми.
И не успя да го заличи
буреносният облак от мисли,
нито проливният дъжд на Сърцето.*

*Пробуди се нещо в душата ми.
И само онази,
лятяща високо в простора,
Самотница-птица разбра...*

1996

Когато през януари 1992 г. почина моят баща, аз вече знаех как ще продължи пътят ми на млад изследовател. Нямаше съмнение – щях да посветя много от времето си – вероятно дни и нощи – на медоносните пчели.

Татко бе забележителен човек – тих, неразговарящ много, но изключително енергичен... Беше активен във всичко, което правеше – в работата си, в отношението си към хората, в способността си простичко да ги разбере или да ги подкрепи в труден момент, във всеотдайността си и... в начина си на вълнение... Да, тишината на вълнението му бе най-невероятната черта, която той притежаваше и която, струва ми се, бях наследила от него... И днес в особени ситуации използвам моя таен „вълномер“ за действие – следя вълнението чрез пулса на сърцето си и знам от кой момент нататък не мога да стоя безучастна...



Моят баща

Нешо Стоянов Баиров

Татко от младежките си години обичаше пчелите. И това бе една завладяваща обич, която предаде на много от нас. Обучи в пчеларство семейството си – своите деца, близки, приятели, колеги и непознати, у които съзря потенциала на пчелар. В последните си години бе проверител и лектор за пчеларското дружество в родния ни град Панагюрище и като такъв сподели много от наученото и от опита си с десетки свои колеги.

Той почина внезапно през зимата на 1992 г. по време на свое изказване на пчеларско събрание, а последните му думи били „Проща-

вайте“... И за пчелите започнаха да се грижат моят брат и моят съпруг. Те разпределиха кошерите в два пчелина, разположени в сърцето на Средна гора, и до днес изпълняват поетата отговорност, отглеждайки ги с обич и събирайки с тяхната помощ най-сладкия и ароматен средногорски пчелен мед.



40-те години на XX век – баба ми Куна и дядо ми Стоян Баирови (двамата вдясно), леля ми Парашкева и други родственици след работа в гората



40-те години на XX век – баща ми като млад пчелар и с пчелари от Баировия род (баща ми е вдясно на първата снимка и вторият вляво – на втората)

През периода 1992 – 1996 г. аз направих своята дисертация на тема „*Apis mellifera* – онтогенетични и популационно-генетични аспекти“ и я посветих на моя баща.

Направеното литературно проучване през този период ми бе показало, че българските медоносни пчели не са били проучвани от ге-

нетична гледна точка. Нещо повече – съществуваша много неизяснени въпроси, засягащи както детайли от онтогенезата им (медоносните пчели се развиват с пълна метаморфоза), така и техния таксономичен статус, който до момента бе уточняван само на базата на морфометричини и етологични показатели. Провежданата селекционна дейност през годините бе довела до значимо объркване по отношение на генетичната същност на българските пчелни популации заради факта, че на територията на страната ни бяха селекционно изпитвани чрез хибридизация подвидове на *Apis mellifera* с чужд произход – *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. caucasica*. От друга страна, методът, който бях избрала за популационно-генетичните си търсения, не бе прилаган в България до момента, въпреки че по света се използваше. Също така не бяха проучвани въобще по отношение на медоносните пчели и някои от ензимните системи, които привлякоха вниманието ми. Това правеше планираната работа трудна и вълнуваща задача – с много неизвестни и липса на сигурност относно крайния резултат.

Днес много от младите хора избягват неизвестното. Странно, но ги привлича сигурното и... за съжаление, залагат на него. А за истинския изследовател най-важна е загадката. Тя създава вътрешната динамика и вълнението, тя генерира идеи, тя дава сили за осъществяването им. Така се случи и с мен. Завладяна от тази многопосочна загадъчност, аз започнах от малкото. За дисертацията си използвах няколко пчелни популации, различаващи се по местообитание – равнинно и планинско. Работех с индивиди от двата пола в различни етапи от индивидуалното им развитие. Включих в експериментите си яйца, извити и прави ларви, белооки и тъмнооки какавиди и имагинални форми от двата пола. Тъй като вече бях запозната с метода на електрофореза в полиакриламиден и скорбелен гел, това ми помогна да избира подходящи изоензимни маркери и да построя удачни сравнителни схеми за планираното проучване.

Започнах с групите на водноразтворимите протеини, неспецифичните естерази, малатдехидрогеназите (НАД и НАДФ-зависими), супероксиддисмутазите и лактатдехидрогеназите. Работех с тотални екстракти (цял индивид) по етапи от онтогенезата. В крайна сметка, когато защитих дисертацията си през 1996 г., аз бях извела две групи от изводи – онтогенетични и популационно-генетични.

В частта „Обобщения и изводи“ акцентирах върху качествата на вида *Apis mellifera* като подходящ обект за генетични изследвания поради следните причини: 1) обществен начин на живот и разпределение на труда сред индивидите в пчелното семейство, оказващи влияние върху диференцирането им и изявата на конкретни признаци;

2) индивидуално развитие чрез пълна метаморфоза, позволяващо изучаването в дълбочина на диференциалния тип на генна регулация;

3) детерминиране на двата пола чрез механизма на хапло-диплоидията (развитие на женски и мъжки индивиди от оплодени и неоплодени яйца) и възможността единственият фертилен женски индивид в семейството да се опложда от много на брой търтеи – фактори, притежаващи голям потенциал за изследване на генетичната изменчивост в рамките на отделното пчелно семейство и на популацията като цяло.

В този дисертационен труд на базата на проведения електрофоретичен анализ бяха изведени следните обобщени изводи:

1. Синтезът на установените общи протеини в хода на онтогенезата на медоносните пчели се контролира от 24 гена, действащи избирателно през отделните стадии. Налице са разлики в генната активност при мъжки и женски имагинални форми, което е свързано, от една страна – с полов диморфизъм, и от друга страна – с фертилност и стерилност на индивидите в пчелното семейство. Само за един от изследваните протеинови локуси е констатиран двуалелен полиморфизъм с наличие на нулев алел;
2. Синтезът на неспецифичните естерази при *Apis mellifera* се контролира от осем (8) независими гена, които се включват избирателно в хода на онтогенезата по етапи, както следва: при яйца – Est 4; при извити ларви – Est 1, Est 4, Est 5, Est 7 и Est 8; при прави ларви и белооки какавиди – Est 1, Est 2, Est 4, Est 5, Est 6, Est 7 и Est 8; при тъмнооки какавиди – Est 2, Est 4, Est 6 и Est 8; при имагинални форми – Est 2, Est 3, Est 4, Est 6 и Est 8. За един от осемте анализирани естеразни локуса е установена двуалелна система на унаследяване с наличие на нулев алел;
3. Синтезът на NAD-зависимите лактатдехидрогенази в хода на онтогенезата при *Apis mellifera* се контролира от шест (6) локуса, действащи избирателно през отделните стадии, както следва: при яйца – Ldh D и Ldh F; при извити ларви – Ldh B, Ldh D и Ldh F; при прави ларви, белооки и тъмнооки какавиди – Ldh A, Ldh B, Ldh C и Ldh F; при пчели работнички – Ldh A и Ldh D; при царици – Ldh A, Ldh D и Ldh E; при търтеи – Ldh A, Ldh B, Ldh C, Ldh D и Ldh E. Не е установен полиморфизъм по анализираните лактатдехидрогеназни локуси. Локусът Ldh E, характерен за пчелните майки и половозрелите мъжки индивиди, е вероятно асоцииран с фертилността им;

4. Синтезът на NAD-зависимите малатдехидрогенази при *Apis mellifera* се контролира от четири (4) гена, включващи се избирателно през отделните етапи на онтогенезата, както следва: при яйца – Mdh B; при извити ларви – Mdh B и Mdh D; при прави ларви – Mdh A, Mdh B, Mdh C и Mdh D, при белооки и тъмнооки какавиди – Mdh A, Mdh B и Mdh C; при имагинални форми от двата пола – Mdh B, Mdh C и Mdh D. Изказана е хипотеза за скаченост между гените Mdh A и Mdh B и между гените Mdh C и Mdh D. И за четирите анализирани малатдехидрогеназни локуса е констатиран полиморфизъм, като за Mdh B локуса – с триалелна система на унаследяване;
5. Синтезът на NAD P-зависимите MDH (малат ензими – ME) при медоносните пчели се контролира от два (2) независими гена – Me A и Me B, и двата с вероятен двуалелен полиморфизъм;
6. Синтезът на супероксиддисмутазите при медоносните пчели е под контрола на два (2) локуса – Sod A и Sod B, единият от които полиморфен;
7. На базата на проведения популационно-генетичен анализ по отношение на общо 46-те проучвани протеинови и ензимни локуса е установено ниво на полиморфизъм 0.2 (20%) и е изчислена честота на установените алели по локуси;
8. Не са констатирани полово свързани, полово ограничени и полово зависещи различия по отношение на проучваните неспецифични естерази, NAD и NAD P-зависими малатдехидрогенази и супероксиддисмутази в хода на онтогенезата на медоносните пчели.

Бе отбелязано, че това проучване може да послужи като база за биохимико-генетичен мониторинг на местната медоносна пчела с цел проследяване на генетичното замърсяване и като основа на селекционна програма. Само по себе си това заключение бе доста амбициозно, но сега от позицията на времето си давам сметка, че е било напълно уместно и правилно.

Не ми се иска да разсъждавам по темата „Как се изготвя дисертационен труд днес“, но мога да споделя от собствен опит, че освен време, материална база, конкретна среда, микроклимат и личен изследователски потенциал са нужни още упоритост, убеденост, интерес (любопитство), стремеж и... подкрепа, подкрепа от различно естество...

Ако някой ви каже, че е изработил дисертацията си сам и че никой не му е помогнал, подложете това на съмнение. Той може да е работил от сутрин до вечер, през нощите, без почивки и т.н., но пак не

би могъл да се справи сам. Необходима му е била база, създадена вероятно от някой друг, нужни са му били хора, с които да споделя идеите си, и чуждо мнение (не задължително подкрепящо неговото!), за да „сверява часовника си“, трябвали са му и учители, които да го учат, и близки, които да го подкрепят...

В хода на разработването на този дисертационен труд аз имах пълна подкрепа от страна на моя съпруг, който ми помагаше с всичко, което бе във възможностите му, включително и за изготвянето на първата ми компютърна презентация за вътрешната защита на дисертацията (беше все още времето на диапозитивите и шрайбпроекторите!). Винаги срещах деликатната му съпричастност и всеотдайност... Моята колега д-р Мария Бинева често казваше, че „сме вечеряли с Бога, щом имаме такива съпрузи“. И това си е самата истина! Моят съпруг никога и в нищо не ме е ограничавал. Знаейки цената на свободата, той винаги ми я е предоставял. За да изработя дисертацията си, аз пътувах до Варна и работех в генетичната лаборатория на Аквариума поне два пъти годишно. Провеждах основната си експериментална работа в Пловдив през всяко свободно от преподаване време, включително през ваканции и почивни дни. В първите години от работата ми като асистент извеждах по над 1000 ч. упражнения по генетика, в някои учебни години – по 1600, при норматив от 360 ч. за учебна година (за сведение отбелязвам – преподавах без наднормено заплащане, не съм и помисляла за такова!). Вкъщи се стремях да отделям достатъчно време за синовете ни и да поддържам дома. Времето беше особено – динамично, интересно и несигурно – почти 9 години живяхме на свободен наем, със заплати на асистент и инженер се справяхме, както можем, и успяхме. Днес, поглеждайки назад във времето, си казвам, че то ни помогна да пораснем житейски, да се научим да оцеляваме, да знаем цената и смисъла на малкото...

В лабораторията по генетика се научих на основните стъпки при прилагане на електрофоретичния метод от химика София Костова. Тя беше много добра в работата си, даде ми ценни уроци (не само методични, но и човешки) и аз често, с мило чувство и благодарност се връщам към онзи период, за да си поговоря отново с нея, да чуя мнението ѝ, да обмисля напътствията ѝ, да споделя нещо...

Научен ръководител на дисертационния ми труд бе проф. Петър Попов (тогава доцент), а научен консултант – проф. д.б.н. Иван Доброволов. На тяхната помощ и на мъдростта, която почерпих от общуването си с тях, дължа много...

Проф. Попов ми предостави свободата да избира сама научния проблем, по който да работя. С него обсъждах идеите си и всяка стъп-

ка от изследванията. Той притежаваше брилянтен академичен стил на изразяване и аз се стараех да уча колкото се може повече от него. Понякога редакциите му в представения от мен научен текст бяха толкова много, че се плаших, но с времето ставах все по-добра в писането, а бележките в страничните полета и по листовете намаляваха...

С проф. Попов понякога спорехме разпалено, понякога обсъждахме спокойно, понякога премълчавахме и преглъщахме разни неща, но винаги, винаги намирахме време за истината. И си я казвахме. Може би съм го огорчавала понякога – той не бе злопамятен, винаги прощаваше. И на мен ми е било мъчно за някои неща, но понеже говоря за истина, ще я назова тук такава, каквато винаги съм я чувствала – аз уважавах и обичах този човек като мой учител още от студентските си години, когато бях негова дипломантка по генетика, през времето, в което се учех от него да преподавам и изпитвам като асистент по генетика, и после по пътя, по който бях избрала да вървя. Проф. Петър Попов винаги ме бе учил – професионално и житейски... И за наученото съм много благодарна!

Проф. Иван Доброволов беше самата доброта, която някой някога можеше да срещне. И не просто само доброта, а добрата воля, към която всеки би трябвало да се стреми в хода на своя живот. Повярвайте ми, той я бе постигнал или се бе родил с нея...

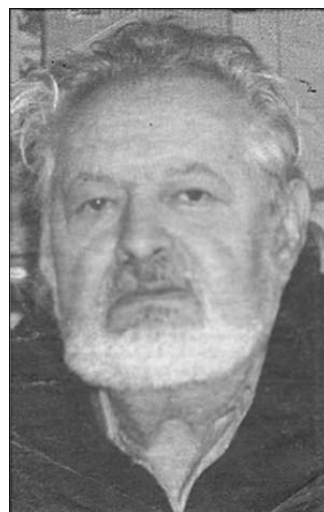
Когато за първи път попаднах на втория етаж в Аквариума, в лабораторията му по генетика във Варна, аз вдишах не само аромат на море, примесен с миризма на всякакви реактиви и химикали, а атмосфера, пропита с изследователски дух и академичност, загадъчност, вълнение, трепет... В Аквариума работех почти денонощно, обикновено за по двадесет дни в годината. Там на практика проведох значима част от експерименталната си работа – изоензимния анализ в скорбелен гел, изоелектричното фокусиране в тънък и ултратънък полиакриламиден гел. В тази лаборатория имах много време, освен за експериментална работа, за обсъждане на получените вече резултати и за разговори с проф. Доброволов. Такива разговори учат, обогатяват, изграждат и вдъхновяват... Проф. Иван Доброволов бе завършил Московския държавен университет преди много години и като изследовател бе високо ценен в сферата на популационната генетика. Той имаше усет към историята и художественото слово и обичаше да раздава от натрупаното знание. Рисуваше, харесваше хубавата музика, ценеше славянските напеви. Беше ерудит, жива енциклопедия... Разговорите с него и споделеният опит бяха неизмеримо богатство. В лабораторията му аз работих за кратко и с неговата съпруга – биолога Светлана Доброволова, както и с негови дипломанти или докторанти,

сред които и с до днес уважаваната и обичана от мен колега и приятел, понастоящем доцент в Института по океанология на БАН, д-р Петя Иванова. С тях споделяхме обща работна среда, много експериментална работа и идеи, обсъждахме и решавахме проблеми, радвахме се взаимно на успехите и сътрудничеството си.

Не знаех как, а ми се искаше да изразя благодарността си към моите учители и веднъж споделих това с проф. Иван Доброволов. С лекия си руски акцент, сякаш пренасяйки се в годините на младостта си, замислено и някак носталгично той ми каза: „Женичка, и аз зададох същия въпрос на моя Професор, а той ми отговори простичко така: Иване, ще учиш, ще даваш знание на по-младите поне толкова всеотдайно, колкото мислиш, че го правя аз, и по този начин винаги ще ми се отблагодаряваш...“. Разбрах казаното, лесно и осъзнато го превърнах в принцип на работата си. И до днес го спазвам... Друг е въпросът колко и къде са младите хора, искрено отворени към знание, част от което биха могли да почерпят и от мен. Оптимистичното е, че все пак съм ги срещала (т. е. има ги!) или ги срещам, или ще ги срещам, за да мога чрез тях да благодаря на обичани хора, които са ме учили...



Проф. д.б.н. Петър Попов



Проф. д.б.н. Иван Доброволов

Защитата на докторската ми дисертация бе на 4 юли 1996 г. в Специализирания научен съвет по генетика при БАН. Оказах се единственият изследовател от нашия факултет, защитил дисертацията си по генетика пред този съвет. Рецензенти на докторската ми дисертация бяха проф. Тодор Николов, биохимик, и проф. Георги Николов, генетик. Защитата ѝ продължи около 4 часа и получи 22 положителни гласа при тайното гласуване на присъстващите 22 изявени учени в сферата на генетиката. Това бе невероятно изживяване за мен – вълнуваща

първа крачка по пътя ми на изследовател. Получих толкова много искрени поздравления и толкова много цветя, че не знаех как да ги обгърна с ръцете си. На тази защита присъстваха моите ръководители, моите колеги и приятели от катедра „Биология на развитието“, колеги от други катедри и мои дипломанти – за щастие, сега и главни асистенти по генетика в катедрата ни, които трепереха по време на чакането и самата защита заедно с мен...

Спомням си, че когато всичко приключи, аз успях да благодаря за подкрепата... Знам, че в този момент усещах огромната добронамереност и съпричастност от страна на всички.

В интерес на истината трябва да добавя, че по пътя не всичко е толкова „розово“. Седем години по-късно същият научен съвет при тайно гласуване в конкурс за доцент по генетика с участието на двама кандидати и две положителни рецензии в моя полза пусна достатъчно бели бюлетини, с помощта на които спря временно академичното ми развитие. Тези бюлетини се разиграха и на по-високото ниво – в Подкомисията на ВАК, където при наличен положителен експертен доклад в полза на представените от мен документи от 12-те присъстващи 11 бяха пуснали бели бюлетини. Получих прекрасен житейски урок – усетих цената на средното положение, а познатата ми отдавна „златна среда“ ми припомни за себе си – това бе един утвърден и удобен начин да избегнеш казването или правенето на нещо, което би могло да създаде неприятности или да провокира неприятели... Каквото и да е това действие, каквото и да носи то на човека, който го е предприел, според мен е просто вид бягство от отговорност и проява на някакъв вид страх или малодушие... Именно тогава подложих на съмнение експертността и доброжелателността на експертите, защото знаех, че ако бяха такива, те щяха да изразят конкретното мнение честно – „да“ или „не“, а не „нещо“ по средата. Като казах „нещо“, си припомних заглавие на разказ от Уилям Сароян – „Нещо като нож, нещо като цвете, и изобщо като нищо на света“... Така неопределена беше и тази история... Това, което усетих тогава и към което се връщам в спомените си и днес, се дължи на вкоренената, наслоена или вродена у мен непримиримост към средното положение... Сигурно защото хората от моя роден край са си такива. За тях средно положение няма, има или свобода, или смърт, както го е извезала на знаме и самата Райна Княгиня. Нямам и не търся обяснение защо съм точно такъв човек, защо приемам нещата по този начин, защо защитавам определени каузи докрай, защо изпитвам непримиримост към нещо или защо преценките ми са такива. Просто го споделям! Никога повече не потърсих компетентното мнение на този научен съвет, въпреки че в състава му имаше изключител-

ни учени, които и до днес уважавам и високо ценя като хора – нямаше как да приема „професионализма“ на преобладаващите бели бюлети-ни... По-късно научната ми продукция бе оценявана в Съвета по животновъдство към Селскостопанската академия.

Защитата на дисертационния ми труд през лятото на 1996 г. съвпадна с едно незабравимо и изключително за мен и семейството ми изживяване – ваканцията в Рила планина и първото изкачване на връх Мусала...

Онези от вас, които обичат планината и разкриващия се от планинските върхове необят, ще ме разберат лесно. Тук думите са излишни, защото във висините властват само усещания – дълбоки, всеобхватни, истински... Когато погледът се зарее в пространството, човек осъзнава колко малка част от цялото е и как в същото време го изпълва със същността си. Усеща как сърцето му бие ведно с това на планината, със сърцето на Земята и с това на Вселената... Усеща свободата и всемирната обич...

1997 – 2001

*От няколко дни
столям с дъха си
един катинар...
И той ми отваря
вратата
за някъде...*

1997

Мислех си, че след защитата ще имам дълга почивка от експерименталната работа, посветена на нови търсения, а планината само в един миг ме бе събудила и вдъхновила, бе изпълнила съзнанието и същността ми с куп идеи и прозрения, които предстоеше да осмисля, проверя и осъществя...

Насочих вниманието си към органната специфичност в изявата на проучваните от мен ензимни системи. За читателите небииолози ще поясня, че в хода на индивидуалното развитие при осъществяването на пълната метаморфоза в организма на медоносната пчела протичат сложни и разнообразни процеси. От яйцето се развива ларва и нейният живот е свързан с работата на ларвните органи и системи, които се диференцират и функционират в хода на няколко ларвни възрасти. После в етапа на предкакавида организмът се подготвя за сложното преобразуване, което се осъществява през какавидния стадий. Това е времето, когато ларвните органи се разграждат (т. нар. хистолиза), а имагиналните органи се изграждат (т. нар. хистогенеза). Ларвата се превръща в имаго – възрастен индивид с оформени и функциониращи органи и системи, разположени в глава, гърди и коремче – тяло, снабдено с крила, крачка, хоботче...

Това е сложно развитие, в хода на което гените променят експресията си и продуктите, които са под техен контрол, се изявяват избирателно (диференцирано). Знае се, че само малка част от генома е активно функционираща в живата клетка (около 6%) и че в клетките на организма с различна диференциация именно тези 6% са в основата на различията.

Така аз включих в електрофоретичния си анализ изучаването на органната специфичност в изявата на водноразтворимите протеини и подбрани изоензимни системи (включително нови, непроучвани в докторската ми дисертация) и си поставих за цел да установя промените в генната експресия чрез промените в експресията на изявените електрофоретични продукти. Давах си сметка, че едно такова изслед-

ване би подпомогнало детайлното изучаване на протеиновия и ензимния полиморфизъм при медоносните пчели, уточнявайки кой продукт в кой орган (тъкан) се изявява. От друга страна, то би предоставило допълнителна информация относно диференциалната регулация на генната активност при *Apis mellifera*.

В експерименталната работа ми помагаха някои от моите дипломанти (аз имах щастието да съм научен ръководител на 25 дипломанти, някои от тях прекрасни млади изследователи, желаещи да надникнат в света на науката през прозореца на генетиката), а много от получените резултати обсъждахме задълбочено с колегата си и добър приятел Теодора Стайкова, тогава докторант, а сега вече професор.

На електрофоретичен анализ бяха подложени торакални мускули, хемолимфа, сърце, мастно тяло, храносмилателен канал по дялове – медови стомах, средно, тънко и дебело черво, и сетивни органи – очи.

Изследванията ми през този период бяха подпомогнати от Националния фонд за научни изследвания, който финансира два наши проекта – „Изследване на генетичната структура на популации *Apis mellifera* в България“ и „Тъканна и органна специфичност на експресията на протеини и някои изоензими в хода на онтогенезата на *Apis mellifera*“, и от университетския фонд за научни изследвания чрез проектите „Онтогенетични и популационно-генетични изследвания на представители от клас *Insecta*“ и „Органна специфичност в експресията на разтворими протеини и неспецифични естерази при *Apis mellifera*“. Всеки от проектите бе разработен с много трепет и страст и това правеше професионалния ни живот интересен и вълнуващ. Освен това изготвянето им бе въпрос на личен избор и желание за работа извън преките отговорности на университетския преподавател. В изследователската си работа аз често увличах студенти, които впоследствие разработваха дипломните си работи по генетика, а получените резултати публикувахме или докладвахме в екип и това им носеше голямо и заслужено удовлетворение.

През този период страната ни вече бе отворена към света. Преди бяхме живели в повече или по-малко затворена система. Хората от академичните среди, които имаха подготовката и куража да обменят опит с колеги от други университети и научни институции извън страната, бяха определено обогатени. За себе си аз осъзнах, че бих могла да оценя постигнатото до момента единствено ако го сравня с направеното от други и ако получа независима оценка от научни експерти в Европа... Най-престижното тогава (а и днес) списание, което публикуваше научни материали за медоносните пчели на три езика (английски, немски и френски), бе „*Apidologie*“. Аз изпратих проучванията си за

лактатдехидрогеназите именно там. Тази ензимна група не бе проучена до момента при медоносните пчели и материалът привлече вниманието на редакторите. Изпратих го в немски превод, защото имах горчив опит от по-рано изпращани материали на английски език, които се връщаха с недобра оценка заради превода. А немският превод бе направен от моята колега Ерика, която работеше в Катедрата по ботаника на нашия факултет като научен сътрудник. Немският бе майчиният ѝ език, а тя самата бе изследовател, владеещ добре биологичната терминология. След поправки, препоръчани от рецензентите, нашата първа публикация в списание с импакт фактор беше факт (Ivanova and Popov, 1997). Три години по-късно в „Apidologie“ бяха публикувани и други наши резултати, свързани с протеиновата експресия, и това ни донесе много радост и удовлетворение от постигнатото и оценения труд (Ivanova, 2000; Ivanova et al., 2000).

В началото на 90-те години аз осъзнах необходимостта от използването на английски език за достъп до информация и като възможност за професионално сътрудничество. Бях навършила 30 години, когато започнах да го изучавам, посещавайки езикови курсове с различна продължителност – шестмесечни, тримесечни..., първо, второ, трето ниво.... пак назад и пак напред – след тридесетте усвояването на нов език за мен не бе никак лесна задача. И нямах никаква увереност, че мога да го използвам занапред... Руския език владеех добре – него бяхме изучавали в училище и в университета. Можех да чета и да говоря с лекота на руски, но с английския език имах проблеми.

През 2000 г. си поставих амбициозната задача да направя опит за научна специализация в чужбина. Германия отпускаше на конкурсен принцип стипендии за научни изследвания, включително в областта на биологията. Аз бях твърдо решена да опитам и затова отправих запитване към единствения колега, когото „познавах“ от кореспонденцията ми с „Apidologie“ – д-р Гудрун Кьонигер (Gudrun Koeniger). Описах ѝ моите интереси и потърсих съдействие за възможна специализация, финансирана от ДААД.

Германската служба за академичен обмен (The German Academic Exchange Service), или накратко ДААД (на немски: DAAD, Deutscher Akademischer Austauschdienst), е най-голямата организация в Германия, подкрепяща международното академично сътрудничество. В състава ѝ са включени 100 класически и технически университета, 162 университета по приложни науки и 52 колежа по музика и изкуство (<https://www.daad.de/en/>).

По това време ДААД работеше на територията на България чрез Международната фондация „Св. св. Кирил и Методий“, чиято основ-

на мисия се определяше като подкрепа в изграждането на интелектуален капацитет чрез осигуряване на достъп до най-престижните световни образователни центрове на талантиливи и способни млади българи, които да посрещнат предизвикателствата на промяната, както и да спомогнат за интегрирането на България в Обединена Европа и света (<http://www.cmfn.org/?lang=bg>).

Изпратих проект, посветен на популационно-генетични проучвания на медоносните пчели, който бе утвърден от Института по науки за пчелите в Оберурсел – поделение на „Гьоте“ университета във Франкфурт на Майн. Проектът ни премина през етапите на оценка и бе класиран за финансиране през пролетта на 2001 г. Това съвпадна с навършването на моята 40-годишнина и издаването на стихосбирката ми „В едно небе, олекнало от бели облаци“, за което дължа голямата си благодарност на тогавашния декан на Биологическия факултет доц. Атанас Донев и на издателство „Екобелан“, Асеновград. На човешчината и на доброто му сърце неведнъж съм се възхищавала – светла му памет!

Заминах за Оберурсел вдъхновена и мобилизирана и там се оказах в невероятен капан. Нямаше други българи. Нямаше дори говорещи руски език колеги... Моят английски език на този етап се оказа недостатъчен за качествена комуникация с хора, изучавали го от шестгодишни и практикували го дълги години в реална среда на общуване, наблюдения и експерименти. Нещо повече, професорът, който бе поел ангажимент да ръководи моя проект, се бе разболял сериозно и нямаше никакъв шанс да осъществи проучването така, както бе планирано. С директора на института, проф. Николаус Кьонигер (Nicolaus Koeniger – всички го наричаха Нико, аз също), бързо изработихме нов проект за анализ на мастни киселини и липиди в трите репродуктивни жлези на търтеите. Работата ми се усложни, защото трябваше да използвам непозната за мен до момента методика и да работя напълно неподготвена по зададената тема. Институтът разполагаше с богата библиотека и аз използвах всичкото си свободно време извън лабораторията, за да търся, копирам и чета научни материали в обсега на интересите ми. Овладях новата техника с помощта на колеги от института по химия към Франкфуртския университет и към края на първия месец вече я прилагах успешно за нуждите на изследването в Оберурсел. Давам си сметка, че съм се справяла нелошо, защото на втория месец от специализацията ми вече имахме конкретни резултати. С езика започнах бавно и полека да се справям... Говорех по-спокойно с колегите си, а и отчитах резултатите си на английски. Общувах с други специализанти от Тайланд, Полша и Словения, както и с всичките си колеги в института. Със семейството ми и с моите

колеги и приятели – Илияна Велчева (сега професор по екология) и Теодора Стайкова, поддържахме ежедневни контакти по електронната поща и това ми даваше кураж и сили.

Институтът по науки за пчелите в Оберурсел е утвърдено международно научно звено, ръководено дълги години от класика на световната апидология проф. Фридрих Рутнер (Friedrich Ruttner). Този институт бе и остава едно от най-предпочитаните места в Европа за придобиване на водещи знания в областта на апидологията и за обмяна на опит в науката за медоносните пчели. Аз бях попаднала там. В Оберурсел се запознах с изследователи, които отново щях да срещна след години (например д-р Марина Мейкснер и д-р Шефан Берг), с които щях да обменям и споделям идеи, знания и опит и с които щях да съм в общ отбор при работата по значим европейски проект. Там аз направих важна стъпка в израстването си като изследовател и университетски преподавател. В Оберурсел имаше спечелено доверие и установен потенциал за бъдещи нови проекти...

Именно там аз представих писмено и устно първия си научен отчет на английски език пред комисия от експерти на Франкфуртския университет и службата по академичен обмен на Федерална република Германия (ДААД) и получих висока оценка в официално изпратен до мен документ. Проектът ми „Fatty acids and lipids in three reproductive glands of the honeybee drone (*Apis mellifera* L)“ през 2001 г. бе приключил успешно. Разбрах, че няма недостижими върхове, ако катерачът е търпелив, смел и подготвен... Разбрах, че не се отличавам от европейските си колеги, че макар и в ранен етап от сътрудничеството ни, те оценяват труда и опита ми.

В Оберурсел се научих да се катеря с въже по високи дървета, губих се и се намирах, и... писах отново стихове – един прекрасен начин за справяне със стреса и чудно средство за оцеляване в трудни моменти. Хората, които обичат словото и които усещат връзката между думи и усещания, ще ме разберат добре.

2002 – 2007

*Прокрадва се слънцето
закачливо и весело
сред короните
на високия бук.
Пак се скрива,
намизва,
изчаква
и изпраща отново лъч
от небето
до тук.*

...

2001/2002

Пребиваването в Германия ме бе променило, но не драстично. Стъпвах си на земята съвсем нормално, но вече бях по-уверена, по-смела и... отново окрилена от мисълта за нови проекти. В съзнанието ми постепенно се насложаваше идеята за запознанство с нивото на научни изследвания по генетика на медоносните пчели и с опита на изследователи в това направление от научни институции в съседните ни държави Турция и Гърция. Започнах проучвания относно възможността за научна специализация в Турция и установих, че такава би могла да се осъществи чрез подкрепата на турската правителствена академична служба TUBİTAK.

TUBİTAK (на турски: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, TÜBİTAK) е национална агенция, осигуряваща развитие на политики в сферата на науката, технологиите и иновациите и подкрепяща научноизследователската и развойната дейност. Агенцията има водещата роля в създаването на „научна и технологична култура“ чрез стимулиране на международно академично сътрудничество на територията на Република Турция (<https://www.tubitak.gov.tr/en>).

Оказа се, че в държавния международен университет на Турция – Middle East Technical University, накратко METU, работи екип от изследователи, изучаващи медоносните пчели в популационно-генетичен аспект. Изоензимите бяха част от използваните генетични маркери в изследванията им. В биологическия факултет на METU имаше лаборатория по популационна и молекулярна генетика, ръководена от професора по генетика д-р Айкут Кенче (Aykut Kence). Екипът на проф. Кенче включваше още съпругата му доц. Мерал Кенче (Meral Kence) и голяма група от докторанти и асистенти по генетика (основно по популационна генетика). Аз се свързах електронно с проф. Кенче, запознах го с идеите

си за съвместни проучвания и получих официална покана за специализация в лабораторията му. Изготвеният от двама ни изследователски проект бе представен пред научния съвет на TUBITAK. За щастие, не след дълго предложението ни бе оценено, класирано и финансирано. Така получих възможността да специализирам за период от 9 месеца в METU, намиращ се в столицата на Турция – Анкара.

Техническият университет на Близкия изток (METU) е държавен университет, създаден в Турция през 1956 г. В него годишно се обучават около 27 000 студенти. Обучението е изцяло на английски език. Всички университетски преподаватели са специализирали задължително в САЩ, Канада, Англия или други европейски страни. Немалко от тях са гост-преподаватели от водещи световни университети и научни институции.

Аз заминах за Анкара през август 2003 г. и работих активно в лабораторията на проф. А. Кенче в продължение на 5 месеца – до края на декември 2003 г.

Лабораторията по генетика не бе голяма и съобразно с моите представи за научноекспериментално пространство не бе добре подредена и достатъчно удобна за работа (няколко години по-късно при построяването на новата сграда и преместването на биологическия факултет в нея лабораторията придоби съвсем различен облик и се превърна наистина в модерно експериментално пространство), но наличната апаратура позволяваше провеждането на изoenзимен анализ чрез електрофореза в скорбелен гел, както и молекулярногенетични проучвания чрез прилагане на RAPD, микросателитен и митохондриален ДНК анализ. В лабораторията работеха по свои магистърски и докторски проекти няколко магистранти и докторанти. Една съществена истина се изяви пред мен още в самото начало – тези студенти бяха оставени от научните им ръководители да се справят абсолютно самостоятелно с проучванията си. Обикновено веднъж месечно те провеждаха консултации и можеха да споделят трудностите си или да задават въпроси, но методиката на работа трябваше да усвояват сами или с помощта на свои колеги (също дипломанти или докторанти), както и сами да развиват идеята на проучването си. Този тип работа, макар и подходящ за предварително добре обучени студенти, за прохождащи изследователи не бе удачен. Той бе причината част от тях да са подложени на непрестанен стрес и липса на навременна подкрепа, което бе и причината за отказа на някои да продължат разработването на дипломните си проекти или за допускането на много фактически грешки и излишно изразходване на ценни и скъпоструващи консумативи. Работата с дипломантите в България, или по-точно в нашата университетс-

ка лаборатория по генетика, бе съвсем различна. Ние обучавахме задължително дипломантите си в методиката, за известен период работехме неотклонно до тях, за да се убедим, че експерименталният метод е добре усвоен, и едва тогава ги оставяхме да работят самостоятелно. При докторантите по генетика в METU нещата бяха по-различни. Това основно бяха млади, добре обучени хора, които упорито работеха за осъществяване на конкретния си дисертационен труд, участваха в международни форуми, финансирани от университета им, разработваха тезите си на английски език и ги защитаваха пред научно жури, в състава на което бяха включени и водещи в съответната област международни изследователи.

Попадайки в тази нова ситуация, аз се оказах в необичайна позиция – от една страна, започнах да обучавам на електрофоретични техники дипломанти и да провеждам дискусии с тях относно отчитането и тълкуването на резултатите, от друга страна, извеждах планираните в проекта ни към TUBITAK проучвания, като в същото време полагах усилия да усвоя нови за мен морфометрични и молекулярно-генетични подходи. В края на пребиваването си в Анкара аз представих официален отчет с конкретни резултати, който бе приет и положително оценен от експертите на TUBITAK.

По време на специализацията ми в METU аз въведох в изследванията си две нови полиморфни алоензимни групи – хексокинази и фосфоглюкомутази, подходящи за биохимичен популационно-генетичен анализ, и усвоих техниката за RAPD ДНК анализ. Като резултат от това успях да направя сравнителен изоензимен анализ на популации медоносни пчели от България и от Тракийския район на Турция. Заедно с колегите ми Рахсан Ивджин Тунка (Rahsan Ivgin Tunka – по онова време докторант в METU, сега д-р и университетски преподавател по генетика и селекция), проф. А. Кенче и доц. М. Кенче съпоставихме резултатите от двата анализа (изоензимен и RAPD) и представихме получените обобщени данни година по-късно на Първата европейска конференция по апидология EurBee 2004, която се състоя в гр. Удине, Италия.

Напуснах Турция с усещане за добре свършена работа и обогатена със знания, опит, нови колеги и приятели. Контактите ми с турските изследователи продължиха и напред в годините. Успяхме заедно да представим съвместните проучвания на още два международни форума, но за съжаление, някои обстоятелства ни попречиха да публикуваме съществени данни относно първите проучвания, свързани с установения ДНК полиморфизъм при изследваните популации български медоносни пчели.

След 2003 г. посетих METU и Анкара още няколко пъти с цел научни изследвания или заради участията ми в международни и европейски срещи, посветени на сериозния проблем, свързан с нарастващите случаи на изчезващи пчелни семейства и популации в Америка и Европа, както и на идеята за изработване на общ европейски проект, посветен на този феномен.

Освен в Анкара, такива международни научни срещи бяха организирани и се проведоха и в гръцката столица Атина. За мен бе огромна отговорност да представлявам България, Пловдивския университет, Биологическия факултет и моята катедра „Биология на развитието“ на тези форуми, както и да участвам в обсъждането на бъдещия проект, особено в частта му, засягаща генетичното разнообразие на медоносните пчели.

Времето до 2007 г. бе изключително активно за мен по отношение на научноизследователската ми работа (включително в България), популяризирането на научните ми изследвания, участията във важни международни форуми, създаването и укрепването на професионални контакти. През 2004 г. участвах в Първата европейска конференция по апидология EurBee 1, която бе организирана в Италия и се състоя в Университета на гр. Удине. Това бе времето, когато станах официален член на Европейската асоциация по апидология EurBee. На тази конференция аз имах постерно участие – все още не бях събрала смелост да представям резултатите от работата си под формата на устни доклади, въпреки че вече по-спокойно използвах английския език. В Удине срещнах много мои колеги от Германия, Турция, Словения и Тайланд, които познавах от осъществените до момента мои специализации. Запознах се с още колеги изследователи от Полша, Гърция, Италия, Египет, Йордания и много други държави. Бях част от международна академична общност, посветила основните си търсения на медоносните пчели. Бях удовлетворена, но и наясно с това, че пред мен като изследовател има нелек път и че постигнатото до момента е малка част от възможното...

През 2006 г. на Втората европейска конференция по апидология EurBee 2 в столицата на Чехия – Прага, аз за първи път представих свои резултати чрез доклад на английски език пред голяма аудитория. Сега си давам сметка колко взискателна съм била към себе си, как непрестанно съм си поставяла предизвикателства, как съм се впускала в тях и в страха, за да ги преодоля, и... колко смелост ми е била необходима за това. Всичко случило се ме изненадваше, а аз все повече се стремях да изучавам себе си, както и пределите на своите възможности. В Прага кръгът от колеги и приятели се бе увеличил

още повече. Ние вече се групирахме по интереси и обсъждахме смели идеи за съвместна работа. Обменяхме опит и знания както по отношение на изследванията, посветени на общия ни обект, така и по отношение на университетското образование, критериите за академично израстване, работата със студентите и т.н.

През 2007 г. с финансовата подкрепа на договор по национален проект заедно с моята колега, вече професор, Теодора Стайкова осъществихме съвместна едномесечна специализация в METU – Анкара. През този период посветихме времето си на усвояване, усъвършенстване и прилагане на RAPD техниката за нуждите на популационно-генетичния анализ на двата стопанско значими вида насекоми – *Apis mellifera* и *Bombyx mori*.

В Пловдив работата ми в лабораторията бе непрестанна. Аз продължавах изследванията си както по отношение на органната и стадийната специфичност в изявата на използваните от мен ензимни системи, така и във връзка с популационно-генетичното анализиране на българските медоносни пчели.

Проектната ни дейност беше много активна. Първият ни спечелен инфраструктурен проект, посветен на изграждането на мултифункционална лаборатория по генетични и молекулярни маркери за оценка и инвентаризация на национално значими растителни и животински ресурси, бе също факт. Чрез финансирането по този проект, чийто координатор бях, ние осъществихме базово съвременно оборудване на университетската ни научна лаборатория по генетика и снабдихме с микроскопска техника учебната лаборатория.

....
*Такова време е,
че ми се иска
да бъда птица,
сгушена в листата...
Да вдъхвам аромат,
да тия нежност
и да сънувам
забързани
далечни
сънища*
...

Посоченият период бе най-активният за мен като изследовател. Той бе и най-продуктивният, и най-благодатният по отношение на създадените контакти, реално осъществените сътрудничества, натрупания и обменен професионален опит.

През пролетта на 2008 г. в столицата на Гърция – Атина, се проведе важна европейска организационна среща, посветена на все по-тревожната и нарастваща тенденция към загуба на множество пчелни семейства и цели популации медоносни пчели по света. Европейските учени бяха осъзнали огромния риск за природата и човечеството, тъй като медоносните пчели не бяха просто опитомен вид, използван за производство на мед и други пчелни продукти. Те бяха основните опрашители в природата. Изчезването им би повлияло не само на продукцията на пчелен мед, восък, прополис, прашец и др., но и на опрашването на цъфтящите и плододайни растения в световен мащаб. А липсата на кръстосано опрашване сред културните растения би довела до драстично намаление на очакваните добиви, което от своя страна би променило хранителните запаси на планетата ни до неузнаваемост...

По бъдещия проект се работеше от години. Както споменах и по-рано, бяха провеждани дискуссионни срещи много преди тази. Няколко работни екипа, доминирани от научния потенциал на различни държави, развиваха идеите си за конкретна научна, организационна и приложна съвместна дейност, посветена на световния феномен „загуба на пчелни семейства“ (известен още като „синдром на празния кошер“ или просто CCD – от английското му наименование colony collapse disorder). Като представител на България в този ранен етап на европейско сътрудничество с цел изучаване на причините за сериозния проблем, аз също бях част от работата на тези групи. В Атина по

това време в директен интелектуален двубой се оказаха групите, ръководени от изследователи на Италия и Германия. Всъщност идеята за проект, посветен на обединените усилия на апидолози от Европа да противопоставят научния потенциал на тревожното явление, произхождаше от Италия още от времето, когато през 2004 г. проф. Норберто Милани (Norberto Milani) от университета в Удине, Италия, заедно с други свои колеги апидолози предложи и организира създаването на Европейската асоциация по апидология (EurBee). Сегашната италианска група бе под ръководството на колегата Антонио Нанети (Antonio Nanetti), представител на най-стария университет в света – Болонския. От друга страна, силен екип от млади изследователи от Германия бе поел инициативата да детайлизира целите и задачите на бъдещия проект и това му даваше основание да претендира за реалното лидерство. Начело на този екип бе д-р Питър Нойман (Peter Neumann), понастоящем професор в Университета в Берн и водещ изследовател в Института по здраве на пчелите, Швейцария. Питър Нойман проявяваше качества на изследовател с голям потенциал. Той бе част от научния екип на проф. Робин Мориц (Robin Moritz) от Университета в Хале, Германия, много активен и амбициозен, много отдаден на стремежа си да оглави бъдещия европейски екип и много ерудиран. В крайна сметка именно той бе избран за ръководител на европейската COST акция FA 0803 COLOSS и по-късно – за президент на световната асоциация COLOSS, работеща по организирането на превенция по отношение на загубите на пчелни семейства в Европа и в света (<http://www.coloss.org/>).

Всъщност именно по време на работната среща в Атина през пролетта на 2008 г. бе взето официалното решение за проекта COLOSS – „Prevention of honey bee colony losses“. Меморандумът за него бе подписан от страните учредителки, сред които и България, през ноември 2008 г. в Брюксел, Белгия.

При подписването на Меморандума за разбирателство аз бях единственият представител от България и това ме натовари с огромни отговорности. Съзнавах ясно, че за работата по такъв проект трябва да бъдат привлечени най-добрите и отговорни специалисти в тази област от България. И такъв според мен най-добър сред всички, работещ неуморно и безкористно от дълги години по селекцията на медоносните пчели в страната ни, най-отдаден на пчеларството и организираното опазване на генофонда на българската медоносна пчела, бе д-р Пламен Петров, тогава доцент, сега професор в Аграрния университет – Пловдив, и президент на Националната развъдна асоциация по пчеларство (НРАП). Сътрудничеството и приятелството ми с него

датираха от началото на 90-те години на 20-ото столетие, когато, завърнал се след защитата на доктората си в московската Тимирязевска академия и започнал работа като асистент по ентомология и преподавател по пчеларство в Аграрния университет – Пловдив, той бе открил мои първи статии, посветени на генетичното разнообразие на медоносните пчели в България, и ме бе потърсил лично, за да ми предложи да обединим усилията си в обща цел. На практика от края на 2008 г. до завършването на COST акцията FA 0803 COLOSS ние работихме в строен екип заедно с проф. Пламен Петров и ръководената от него Национална развъдна асоциация по пчеларство. Аз отговарях за генетичните проучвания, той – за проучванията в сферата на селекционните подходи и дейности на територията на страната.

Подписването на Меморандума и активната работа в продължение реално на повече от 5 години по COST FA 0803 акцията COLOSS бе предхождано от друго много важно за европейската научна общност събитие – Европейската конференция по апидология EurBee 3, която се състоя през септември 2008 г. в Белфаст – столицата на Северна Ирландия. Там аз трябваше да представя информация относно ситуацията в страната ни, като обърна внимание на генетичното разнообразие, селекционните подходи и жизнеността на българските медоносни пчели. Отделно от това в екип с проф. Пламен Петров и колегите от Турция и Гърция бяхме подготвили за представяне обобщени данни за генетичната изменчивост сред популациите медоносни пчели в България и възможностите за разграничаването им при сравнение с популации от гранични на страната ни райони в Турция.

Почти десетдневното ми пребиваване на това място бе много натоварено и емоционално. И тук, както и на други научни форуми до момента, аз участвах реално сама. Но в Белфаст имаше едно приятно изключение – в програмата на конгреса бе отбелязано, че единият от пленарните доклади ще бъде представен от проф. Вася Банкова от България. Не я познавах до този момент, но чаках с нетърпение да я видя и чуя и се чувствах горда, че български изследовател щеше да е пленарен докладчик на този значим европейски форум. Член-кореспондент на БАН, проф. д.х.н. Вася Банкова е завеждаща Лабораторията по химия на природните вещества към Института по органична химия с Център по фитохимия. На форума в Белфаст тя представи резултати от своите изследвания, посветени на ценните качества на прополиса. След доклада ѝ ние се запознахме и разговаряхме. По време на последвалите европейски конференции по апидология винаги общувахме, обменяйки информация и дискутирайки интересни теми и значими ситуации, засягащи работата ни с медоносните пчели.

За мен Белфаст бе поредно изпитание на сили, емоционален и интелектуален потенциал. Пребиваването ми там бе съпроводено освен с професионални ангажименти, но още с комични и драматични ситуации, които ме поставяха „на ръба на бръснача“... Справих се и с тях и често се усмихвам при спомените за разменения ми паспорт, за оставените заедно с него в Германия английски лири (Германия бе междинна спирка в пътуването ми през Бирмингам за Белфаст), за разнородните реакции на моите европейски колеги при новината, че пристигам на форума само с личната си карта, без международен паспорт (Северна Ирландия бе със специален ограничителен режим при пропускане на пътници на територията ѝ) и с много малко налични пари в евро... Струваше ми се, че пътуването и пристигането ми бе екстремно изпитване на възможностите ми за оцеляване... И като завършек на всичко това след заключителната вечер и желанието ми да се прибера, разхождайки се сама към хотела, аз се загубих из белфастските улици. Напразно разчитах картата под уличните лампи и треперех от мисълта да не попадна в критично обстоятелство сред непознати, когато осъзнах, че каквито и да са те (непознатите!), аз се нуждаех от тях, за да ми помогнат в ориентацията... В тъмнината съзрях движещи се към мен силуети, в които не след дълго разпознах фигурите на двама ирландци – млади хора, говорещи много бързо, типично шумно, като че ли малко плашещи ме до момента, в който ме запитаха откъде съм, а аз отговорих: „От България.“. Можете ли да си представите – те възкликнаха: „От България!!! О!!! Толкова прекрасна страна! Толкова мили хора! Върнахме се преди месец оттам и обмисляме възможностите отново да я посетим“. Така моите „спасители“ ме поведоха по пътя за хотела и стопиха страха ми с динамичен и вълнуващ разговор. Разказаха ми за българското море и за Варна (!), за приятелите, които са открили там, за новите си идеи... Бяха студенти в Кралския университет на Белфаст – университета домакин и на нашата Европейска конференция. Проявиха интерес към проучванията за медоносните пчели, изказаха лични мнения по въпроса и любезно ме изпратиха...

След фактическия старт на COST акцията FA 0803 COLOSS, удостоверен с подписването на официалния договор за сътрудничество в Брюксел през ноември 2008 г., започна дълъг, интересен и натоварен период на експериментална работа в сътрудничество и по обща програма, богатa поредица от научни форуми и работни срещи в много европейски страни (включително и в България). Така всички идеи и получени сравнителни резултати от общата експериментална дейност бяха представени и обсъждани поетапно, както следва: през

2009 г. в Загреб (Хърватия), Монпелие (Франция) и Кирххайн (Германия); през 2010 г. в Атина (Гърция), Слагелсе (Дания) и Анкара (Турция); през 2011 г. в Пловдив (България), Пулави (Полша) и Белград (Сърбия); през 2012 г. в Йокиойнен (Jokioinen, Финландия), Хале (Германия), Атина (Гърция) и Палермо (Италия). Всички COLOSS конференции бяха комбинирани със значимите Apimondia и EurBee конгреси и конференции, които за този период се провеждаха в следния ред: 41-ви световен конгрес на Apimondia – в Монпелие през 2009 г.; 4-та европейска конференция по апидология EurBee 4 – в Анкара през 2010 г., и 5-а европейска конференция по апидология EurBee 5 – в Хале през 2012 г. На всички посочени по-горе научни форуми (с изключение на този в Палермо) аз участвах реално, самостоятелно или в екип с проф. Пламен Петров, и докладвах исканата и събрана от нас представителна информация за проучванията в България. През 2010 г. към българския ни екип се присъедини и проф. Калинка Гургулова – експерт в сферата на пчелното здраве и представител на Националния диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт „Проф. д-р Г. Павлов“.

Разказвайки за мащабната COLOSS акция, тук е мястото да представя по-детайлна информация относно конкретните ѝ цели, задачи, очаквани резултати и цялостната ѝ визия, както и да конкретизирам инструментите за работа, същността и целите на работните групи и нашето участие в тях.

Основните цели на COLOSS бяха насочени към: 1) събиране на надеждна и стандартизирана информация за загубите на пчелни семейства; 2) идентифициране на факторите за констатираните големи загуби; 3) разграничаване на по-незначителните (с ограничено разпространение, с местно значение) от по-значимите фактори (с широк мащаб на разпространение, имащи глобална величина); 4) дешифриране на синергичните ефекти между различните фактори и тяхното значение; 5) разработване и разпространение на спешни мерки и стратегии за устойчив контрол, които да бъдат предоставени на пчеларите и държавните институции.

Очакваните резултати от успешното провеждане на акцията бяха: 1) точна информация за загубите на пчелни семейства в глобален мащаб; 2) идентифициране на основните фактори и механизми (включително синергични ефекти), застрашаващи пчелните семейства и популации; 3) разработване на спешни мерки и методи за устойчив контрол за пчеларите и компетентните органи с цел ограничаване на загубите; 4) намалени загуби от пчелни семейства и популации и по-

нижено негативно въздействие като цяло върху човешкото общество и природното биологично разнообразие.

Видно е, че целите на COLOSS акцията бяха грандиозни и насочени както към европейските икономически и обществени потребности, така и към научно-технологичния прогрес. За да се гарантира решаващата връзка между научноизследователската и развойната дейност, акцията предвиждаше интегрирането на широк кръг от заинтересовани страни в осъществяване на планираните дейности – учени, държавни институции, национални и местни пчеларски асоциации и организации, пчелари. Планирани бяха по две годишни конференции, летни тренировъчни лагери за млади учени и краткосрочни научни мисии.

Въпреки че основните цели на европейските COST акции по принцип бяха насочени към коопериране и обмяна на опит в сферата на науката и технологиите, без финансиране на конкретни научни изследвания, FA 0803 COST акцията COLOSS имаше и своите амбициозни научни цели и на практика успя да осъществи значим комплексен научен експеримент в сферата на генетичните проучвания и стандартизирането на методите за селекционна изследователска дейност в Европа.

Научната програма на акцията включваше дейности по координиране на следните общи изследователски задачи, имащи съществено значение за откриването и разбирането на причините, водещи до загуба на пчелни семейства, както и разработването на цялостна европейска стратегия за предотвратяването на тези загуби: *мониторинг* – в тази връзка бе необходимо да се разработи стандартизиран протокол за количествено определяне на загубите, което да осигури впоследствие и правилна диагностика; *диагностика* – това изискваше разработване на стандартизиран подход за идентифициране на загуби (Loss Detection Kit), включващ метагеномно проучване, базирано на най-новите постижения от молекулярните анализи за характеризиране на генома на медоносните пчели. На тази база се предвиждаше широкомащабен скрининг за идентифициране на кандидат-факторите, свързани със загуби на пчелни семейства, включително нови патогени и екологични стресови фактори. Предвиждаше се още на базата на проведения скрининг да се изготви изчерпателно обобщение на причини и причинители, тяхното разпределение, честота на срещане и относителната им значимост; *фактори и механизми, причиняващи загуби на пчелни семейства* – тук се планираше акцията да координира експериментите за изучаване и характеризиране на ролята на установените основни и второстепенни фактори, свързани с пчелните загуби. В тази връзка в полеви и лабораторни условия се очакваше да бъдат изпитани установени патогени, както и да

се разпознаят и характеризират синергичните ефекти между отделните фактори и тяхната значимост; *регулаторни мерки* – на базата на установеното следваше да се предложат подходящи спешни мерки за овладяване на тревожното явление; *стратегии за устойчив контрол* – акцията предвиждаше в тясно сътрудничество с институции, асоциации, професионални организации и пчелари да осъществи ефективен пренос на знания от наука към практика.

През годините на работа по проекта функционираха, осъществявайки конкретни дейности, четири работни групи: WG 1 „Мониторинг и диагностика“; WG 2 „Вредители и патогени“; WG 3 „Околна среда и пчеларство“ и WG 4 „Жизненост и разнообразие“. Аз, както и проф. Пламен Петров бяхме членове на четвъртата група. Това бе групата на изследователите по генетика и селекция в сферата на пчеларството. Групата ни искаше да докаже органичната връзка между генетичното разнообразие, адаптацията на местните популации към конкретната среда и в този контекст – тяхната жизненост и сили за оцеляване в условията на осъществила се адаптация. Генетичното звено в работната група бе представено от д-р Марина Мейкснер (Marina Meixner) от Германия, д-р Пер Кригер (Per Kryger) от Дания, д-р Мария Боуга (Maria Bouga) от Гърция и от мен. Към него се присъединяваха с конкретни задачи и други колеги, и така успявахме да съчетаем генетичните и селекционните тенденции в работата на екипа. Проф. Пламен Петров работеше в селекционния екип заедно с водещи изследователи като д-р Ралф Бюхлер (R. Büchler) от Германия, д-р Малгожата Биенковска (M. Bienkowska) от Полша, д-р Сесилия Коста (C. Costa) от Италия, д-р Фани Хатжина (F. Hatjina) от Гърция и др.

Именно в рамките на WG 4 „Жизненост и разнообразие“ бе разработен и осъществен европейският GEI (genotype-environment interactions – взаимодействия „генотип – околна среда“) експеримент. Искане ми се да отбележа, че в идейната композиция на този мащабен труд имаше значима българска следа. Спомням си, че когато на една от ранните ни работни срещи в Атина предложих конкретна схема на комплексен сравнителен генетичен анализ, колегата от Дания, у когото всички откриваха новаторския дух и нескрития стремеж към научно приключение, възкликна: „Та това е толкова просто! Как не сме се сетили досега!“...

От своята работа в България аз бях натрупала немалко знания и опит, но все пак – недостатъчни за комплексни заключения, които можеха да бъдат постигнати само с обединени подходи и работа на голям екип от изследователи съмишленици. Такъв тип експерименти

обмислях и за такива проучвания мечтаех, но нямах все още необходимите условия и нужните умения – инструменти, за да ги осъществя. Стремях се към разгръщане, към ново познание. Като генетик бях уверена, че за детайлното изследване на генетичното разнообразие в рамките на вида (в случая медоносната пчела) са необходими комплексни подходи, обединяващи както класически (морфологични, морфометрични, етологични, изоензимни и др.), така и нови разнообразни ДНК методи, сред които митохондриален, микросателитен и др. ДНК анализи, които позволяват проучвания на молекулярно, клетъчно, организмово и популационно ниво. Тази именно идея споделих с колегите си тогава, предлагайки им примерна сравнителна експериментална схема на работа, която те харесаха. Впоследствие след сериозни обсъждания идеята бе обогатена и работната група започна организирани дейности по осъществяването ѝ.

Основният метод, който прилагам от самото начало в хода на популационно-генетичните си проучвания, беше изоензимната електрофореза. Този анализ ми бе позволил да характеризирам стадийна, тъканна и органна специфичност в изявата на определени общи протеинови и ензимни групи, както и да характеризирам сравнително вътрепопулационен и междупопулационен полиморфизъм сред популации *Apis mellifera* от територията на България и извън нея. Независимо от добрите резултати, повечето от които публикувани в уважавани научни издания, „моят“ метод на изследване се подлагаше на съмнения и критики от някои колеги в Биологическия факултет на Пловдивския университет. Макар да познавах неговите предимства и недостатъци (каквито всъщност притежава всеки научен метод на изследване!), в определени моменти аз изпитвах несигурност и у мен растеше стремежът да науча и използвам в популационно-генетичните си търсения и други подходи. Този стремеж, както вече разказвах, ме насочи към прилагането на нови техники за изследване първо в Анкара, в METU, където използвахме RAPD и микросателитен ДНК анализ за първи път при характеризиране на български популации медоносни пчели и по-късно в Атина – в Аграрния университет, където за първи път приложихме митохондриалния ДНК анализ. Този анализ показва, че популациите на българската медоносна пчела притежават специфични характеристики, чрез които е възможно надеждното ѝ разграничаване при сравнение с популации на същия подвид, обитаващ територията на Гърция и Македония.

В този период аз осъзнах, че в рамките на европейския ни екип (Работна група 4 и COLOSS като цяло) се ползвам с доверие от стра-

на на моите колеги, които зачитаха работата ми като изследовател и очакваха от мен решаването на конкретни задачи в контекста на сравнителния европейски GEI експеримент. Изоензимният анализ бе включен в сравнителната му схема, провеждането му бе възложено на мен и аз осъществих всички анализи по сравнението на европейски подвидове и произходи от схемата на GEI експеримента в нашата лаборатория тук, в Пловдивския университет. Така лабораторията ни по генетика се бе превърнала в част от европейско научно пространство именно заради прилагания от мен при проучване на *Apis mellifera* класически изоензимен популационно-генетичен анализ, а аз бях поканена и бях част от авторския колектив на международния двутомник за медоносните пчели „COLOSS BeeBook“, разработвайки с моите колеги генетици главата „Standard methods for characterizing subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*“ (Meixner et al., 2013).

Но за мен признанието бе и от друго естество! По време на 41-вия световен конгрес на Apimondia в Монпелие през 2009 г. една среща по странен начин обогати себеусещането ми. С колегите от работната група планирахме неформална дискуссионна среща на вечеря с други изследователи, сред които и уважаваният професор Антонио Феличиоли (Antonio Felicioli) – преподавател по протеомика в Университета на Пиза, Италия. Той бе изследовател на моята възраст. Познавах го от първата EurBee конференция в Италия през 2004 г., когато бе положил усилия да ме издири и да сподели интереса си към моите изоензимни изследвания. След тази среща, без да поддържаме активен професионален контакт, ние следяхме изявите и публикацииите си. На вечерята в Монпелие той дойде с група свои студенти. Оживените разговори бяха в разгара си, когато чух, че някой споменава името ми и до ушите ми достигна възклицанието на д-р Феличиоли: „Евгения Иванова! Тя къде е, къде е?!“. Почувствах се страшно неловко, защото, щом ме видя, той скочи, дотърча при мен от другия край на залата и силно ме прегърна, а неговите студенти станаха на крака. Не знаех какво точно се случва, но Антонио Феличиоли обясни пред всички: „Познавам д-р Евгения Иванова от пет години, дълго следя работата ѝ и винаги давам за пример на моите студенти как с обикновения метод на изоензимна електрофореза могат да се правят сериозни научни изследвания, каквито тя прави. Винаги ѝ се възхищавам...“. Последва кратко мълчание и поредица от ръкостискания между мен и неговите студенти, в очите на които четях толкова странно и вълнуващо признание, че сама не можех да повярвам...

Като университетски преподавател и изследовател с понатрупан опит, ръководил през годините много дипломанти по генетика, през 2010 г. поех научното ръководство и на първия си докторант. Докторското изследване на Станимила Николова бе посветено на генетичната изменчивост при популации *Apis mellifera* L. в България на базата на микросателитен ДНК анализ. Цел на проучването бе характеризиране на генетичния полиморфизъм в популации медоносни пчели, обитаващи различни райони на територията на България, и уточняване на расовия им статут чрез сравнение с други европейски подвидове на *Apis mellifera* на базата на ДНК анализ по 9 микросателитни локуса. В изследването бяха включени популации от 14 области на страната ни, както и такива от Гърция, Сърбия, Румъния, Германия и Полша, таксономично определени на базата на класически морфометричен анализ като подвидовете *A. m. macedonica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica*.

Изводите от това проучване, изключително интересни и значими за популационно-генетичното характеризиране на българската медоносна пчела, представям по-долу (Николова, 2012):

1. Избрана е оптимална методика за изолиране и пречистване на ДНК от *A. mellifera* с оглед на време, добив, цена, количество и качество на изолираната ДНК;
2. Създадена е банка с ДНК образци от различни популации *A. mellifera*, обитаващи територията на България, както и с образци от други европейски популации;
3. Установено е, че 9-те анализирани микросателитни локуса са полиморфни в изследваните популации и за тях е отчетено наличието на общо 121 алела. В 19 от изследваните популации е констатирано наличие на 35 частни алела, като всичките са и диагностични за българските популации медоносни пчели;
4. Констатирана е обща средна стойност на наблюдаваната и очакваната хетерозиготност за всички изследвани български популации от порядъка на 0.586 и 0.566 съответно;
5. Данните за F_{ST} в българските популации сочат ниски до умерени нива на генетична диференциация, а при сравнителния анализ с останалите европейски популации – средни към високи нива на генетична диференциация;
6. В изследваните български популации е отчетена стойност на Nm , по-висока от 2, при всички анализирани микросателитни локуси с изключение на Ar238, което демонстрира ниска степен на генетична диференциация. При сравнителния анализ на българските

популации с тези от Гърция, Румъния, Сърбия, Германия и Полша е установено, че за деветте микросателитни локуса *Nm* варира и по отношение на 5 от тях *Nm* стойностите са по-ниски от 2, което доказва висока степен на генетична диференциация;

7. Популациите на територията на България са групирани в две големи филогенетични групи с шест подклъстера в първата и три – във втората група. Популациите от Западна България отчетливо са групирани отделно от останалите. Популациите от Централна и Източна България са групирани общо, но в подклъстери, които демонстрират подразделяне на източните популации от централните;
8. При сравнителния филогенетичен анализ съпоставяните популации ясно се групират в три клъстера: първи, включващ изследваните български популации; втори, включващ популациите *A. m. macedonica* от Гърция и популациите *A. m. carnica* от Сърбия, Германия и Полша, и трети, включващ популацията на *A. m. carnica* от Румъния и *A. m. caucasica* с произход от Полша. Ясното разграничаване на българските от гръцките популации медоносни пчели дава основание те да се разглеждат като принадлежащи към различни екотипове на подвида *A. m. macedonica*;
9. Установените диагностични алели могат да се използват като надеждни генетични маркери за формиране на система от мероприятия по консервацията на националните генетични ресурси от *A. mellifera* и за оценка на изходните популации като материал за селекционна дейност.

Значим принос на това проучване, както е отбелязано и в посочените изводи, бе създаването на банка с ДНК образци. Банката се съхранява в лабораторията по генетика на Биологическия факултет и понастоящем съдържа над 1400 проби от изолирана и пречистена ДНК от пчели работнички. Всяка проба е със собствен баркод, носещ информация за конкретната популация, нейното местоположение, количеството на материала, позицията му в банката. ДНК банката би могла да се използва за още много други изследвания и в това именно се крие големият ѝ потенциал.

Днес д-р Станимила Николова продължава да работи в Центъра за контрол и профилактика на болестите (CDC – Centers for disease control and prevention) в Атланта – САЩ, където ръководи звено, участва в научни изследвания по генетика на човека и е част от авторските колективи на много научни изяви и публикации. Отбелязвам този факт, защото е хубав пример за това как възпитаник на Пловдивския университет и конкретно на Биологическия му факултет може да

осъществи потенциала си навсякъде по света – с постоянство, търпение и непрестанен стремеж към развитие. Радвам се на Станимила и в сърцето си освен обич изпитвам и гордост, защото тя бе моя дипломантка и първият ми успешен докторант по генетика.

Иска ми се да разкажа малко повече и за проведената през зимата на 2011 г. поредна работна среща на COLOSS 4 групата, на която Пловдив бе домакин и двамата с проф. Петров бяхме основните организатори (http://www.coloss.org/publications/Proceedings_WG4_March_2011_Plovdiv_Bulgaria.pdf). За мен това бе първият международен форум, за чиято организация отговорях лично. Чувствах се неуверена, но решена да се справя добре и да представя страната и университета ни подобаващо. Поканих няколко колеги от Биологическия факултет да се включат в организацията и те много ми помогнаха. Ас. Весела Митковска, ас. Пенка Василева, биолог Маргарита Шиварова, лаборант Екатерина Галинова, биолог Иванка Попова и магистър Гергана Панайотова направиха много за техническото подsigуряване на форума. Доц. Теодора Стайкова (сега професор) и доц. Анелия Стоянова бяха активни участници в провежданите дискуссионни срещи и организирани академични мероприятия. Секретарят на НРАП Николай Петков и пчеларят Калоян Кисов организираха практическата работа и провеждането на екскурзия до един от пчелините на асоциацията. Проф. Димитър Греков, тогава ректор на Аграрния университет, отвори вратите на академичните си зали за участниците във форума. Съюзът на учените в България – Пловдив, бе съорганизатор на международната среща и в Дома на учените в Стария Пловдив се проведе първите дискусии. Новоизбраният ректор на Пловдивския университет проф. Запрян Козлуджов откри форума и поднесе вълнуващо приветствие към участниците. Всъщност това бе първата международна среща, която той откриваше официално като ректор на Пловдивския университет на втория ден след избирането му. Бе впечатлен от факта, че участниците в този научен форум са представители на толкова много европейски държави. Университетското поделение „Научна и приложна дейност“, ръководено по онова време от Весела Казашка, оформи цялата финансова отчетна документация. Всичко, което направиха колегите ми тогава, бе неоценим жест на съпричастност, споделена отговорност и професионализъм, за което съм им много благодарна. Работната среща в Пловдив съвпадна с 50-годишния юбилей на Пловдивския университет и... с моята 50-годишнина, която освен със семейството си отпразнувах и с колегите си. Спомням си, че когато изпращах групата късно вечерта към

хотела им в пловдивския квартал „Капана“, бе завалял сняг. Цар-Симеоновата градина, алеята със старите величествени чинари, по която вървахме, прегръщахме дърветата и споделяхме тайни и чудеса, и центърът на града бяха толкова красиви и бели, че събудиха у нас странно усещане за друга реалност. То ни промени, сякаш като „машина на времето“ ни върна години назад. Моите колеги започнаха да се смеят, гонят и замерят със снежни топки... Германци, финландци, датчани, освободени от привичното си консервативно поведение, играеха като деца, вдигаха врява и вярваха на вълшебства... Сигурно, както се казваше в представителна реклама по онова време, бяха открили България чрез сърцето си. На другия ден моята колега от Италия Сесилия Коста потвърди това ми предположение, като сподели с мен следната история: *Преди пътуването си за България тя получила предупреждение от свои познати да внимава много, защото в страната ни навсякъде може да срещне крадци. Това напредило вниманието ѝ и събудило много съмнения у нея. В автобуса от София за Пловдив тя попитала шофьора дали знае къде се намира хотелът, в който има резервация, и дали автобусът спира близо до това място. Отговорът, разбира се, бил отрицателен. Сесилия успешно се придвижила от автогарата до хотела в „Капана“ и там осъзнала, че телефонът ѝ липсва. Първата ѝ мисъл била, че е откраднат. Макар че телефонът не струвал скъпо, за нея имал сантиментална стойност и тя много съжалявала за изчезването му до момента, в който ѝ позвънили от рецепцията, за да я уведомят, че шофьор на автобус от София за Пловдив е оставил в хотела изгубената нейна вещ... Сесилия ми каза: „Жени, не можех да си тръгна от България, без да споделя това с теб. Толкова се срамувам от мислите и предразсъдъците си. Истината е, че заобичах страната ви...“.*

През периода 2008 – 2012 г. заедно с моята колега д-р Теодора Стайкова, вече професор, както и с професорите Пламен Петров и Димитър Греков от Аграрния университет – Пловдив, изготвихме нов инфраструктурен проект. Проектът, под ръководството този път на проф. Т. Стайкова, бе насочен към изграждане и развитие на специализиран център за научни изследвания, научна и диагностична дейност за нуждите на апидологията и серикологията в България. Той бе високо оценен и финансиран. Така в рамките на 3 години ние успяхме да дооборудваме в значима степен мултифункционалната научна лаборатория по генетика, както и лаборатории на другите участници в проекта, и по този начин да създадем добри условия за бъдеща науч-

ноизследователска работа и надеждно сътрудничество в областта на генетиката и селекцията.

По отношение на проектната ни дейност е важно да отбележа и работата ни по два стопански проекта, ръководени от проф. П. Петров, финансирането на които позволи провеждането на задълбочени изследвания на българските медоносни пчели в различни аспекти. С помощта на Националната развъдна асоциация по пчеларство бяха организирани и проведени множество експедиции за събиране на материал от територията на цялата страна. Събраните проби, разделени по групи, се обработваха паралелно и независимо в няколко направления от различни изследователи. Предоставеният ми за генетичните проучвания материал обогати изключително много резултатите от популационно-генетичния анализ и ми позволи да направя ценни сравнения и обобщения относно богатството на генофонда на *Apis mellifera* в България. При осъществяването на тези проекти бяха проведени детайлни дейности по инвентаризация и паспортизация на българската медоносна пчела и установяване на генетични и морфо-етологични маркери за устойчивост на пчелните семейства към заболявания. Всичко това бе насочено към формиране на система от мероприятия по селекция и консервация на националните генетични ресурси и опазване на медоносните пчелите в България от болести и изчезване.

2013 – 2017

*Като на добър,
прилежен ученик,
уроци преподава ми
Живота.
Така се уча
да виждам през мъглата,
да слушам тишината,
да разговарям с 'самотата...
И някой ден
ще стигна
Края на това Пътуване...*

На 5 април 2013 г. по инициатива на ръководителите на COLOSS работната група 4 (WG 4) бе основана международната изследователска мрежа за устойчиво пчеларство (*Research Network for Sustainable Bee Breeding – RNSBB*). Това се случи по време на поредната ни работна среща през пролетта на 2013 г. на хърватския остров Уние (Unije), недалеч от Риека. На изолирания остров бе разположена една от най-значимите пчеларски изследователски станции, организирана под ръководството на проф. Никола Кезич (Nikola Kezić) от Аграрния факултет на Университета в Загреб, Хърватия, и директора на изследователския институт по пчеларство в Кирххайн, Германия, д-р Ралф Бюхлер (Ralf Büchler). Крайната цел на групата бе да използва научния и приложния си потенциал за подобряване на благосъстоянието на медоносните пчели чрез разработване и разпространение на всеобхватни стратегии за размножаване и консервация, които се базират на жизнеността на пчелните семейства и опазването на местно адаптираните пчелни популации. След основаването на *RNSBB* в продължение на 4 години аз и проф. Пламен Петров бяхме редовни и активни членове на изследователската мрежа, но впоследствие заради куп обстоятелства ограничихме участието си и замразихме членството си.

През този период аз вече имах мандатни административни ангажменти като директор на Университетския ни филиал в гр. Смолян, които изискваха от мен много време и бяха свързани със сериозни отговорности от различно естество. По същото време сред близките ми хора в семейството изникнаха нелеки здравословни проблеми, за решаването на които моето присъствие и активно участие бяха изключително важни. Именно тогава пред мен изникна въпросът за необходимостта от ограничаване на разнородните ми професионални занимания. Осъзнах, че

трябва да намаля забързания темп и динамиката в онази част от професионалния ми живот, която е извън университета, както и да насоча повече от енергията и вниманието си към моето семейство. Така направих осъзнатия избор постепенно да огранича работата си на европейско ниво... Това щеше да ми предостави освен лично пространство, което да споделя с близките си хора, но и допълнително време за работа със студентите. Все повече осъзнавах, че такава реакция е крайно необходима за мен като университетски преподавател в условията на променящи се житейски ценности за младите хора и при все по-отчетливата изява на тенденции за изместване на академичното и духовното от посредственото и материалното...

Усетих, че взетото решение ми донесе яснота и облекчение, както и някакъв вид нова свобода...

Моите последни изяви като активен член на COLOSS и RNSBB бяха през септември 2014 г., когато се проведе поредната COLOSS конференция и редовната, шеста по ред, EurBee европейска конференция по апидология. Тези форуми се състояха в гр. Мурсия, Испания, за периода от трети до единадесети септември и бяха организирани от екипа на проф. Пилар Де ла Руа (Pilar De la Rúa) – известна и високо ценена изследователка в сферата на молекулярната и еволюционната генетика на медоносните пчели.

Университетът в Мурсия (Universidad de Murcia) – домакин на научното събитие, е най-големият университет в района, обучаващ годишно около 38 000 студенти. Основан през 1272 г. от крал Алфонсо X от Кастилия, той е сред трите най-стари университета в Испания и сред петнайсетте най-стари университета в света.

Гледайки на европейската конференция *EurBee 6* като на възможност да представя постигнатото в продължение на много години знание, свързано с българските медоносни пчели, аз организирах презентацията си като „доклад равностметка“. В рамките на 20 минути успях да запозная аудиторията с популационно-генетичните проучвания на местната за България медоносна пчела, с установения на базата на сравнителен комплексен анализ подвидов неин статус, вътрепопулационен и междупопулационен полиморфизъм по изоензимни, митохондриални и микросателитни ДНК показатели. Очертах онези от тях, които биха могли успешно да се използват като генетични маркери за дискриминиране на българската медоносна пчела, както и за популационно-генетични сравнения сред популациите на подвида *A. m. macedonica*, и по отношение на всички останали европейски подвидове на *A. mellifera*. В края на доклада си отделих време, за да изкажа огромната си благодарност за съвместната работа и подкрепата, която получих през изминалите годи-

ни от моите колеги в България и от тези в института на Оберурсел (Германия), Биологическия факултет на METU в Анкара, работната група 4 и целия екип на COLOSS...

Всичките ми доклади презентации приключваха с фотоси от красивата природа на България. Така моите колеги можеха да видят картини от Рила и Рилските езера, горите и стръмните склонове на Балкана и Пирин, спокойната и любима за мен Средна гора, магическата Родопска планина – кътчета и цветове, запечатали скромната и невероятна красота на българската природа. Сигурно ще прозвучи натруфено, но ще го кажа, без да го чувствам по този начин – винаги съм изпитвала обич и отговорност, когато представям страната си, моя университет и моя факултет, където и да съм. И съм го правила много пъти...

Докладът ми беше изключително информативен и много емоционален. Провокира разсъждения и емоции сред присъстващите. Когато приключих с презентацията си, в залата се възцари наситена с особено чувство тишина, последвана от аплодисменти...

Много от колегите ме поздравяваха, проф. Кезич целуна ръката ми... Но дали бяха разбрали, че това е вероятно последният ми доклад, изнесен пред тях... аз не знаех. Вътрешно в себе си бях удовлетворена – изпитвах чувство за изпълнена на този етап лична мисия.

През 2013 г. заедно с проф. Пламен Петров поехме научното ръководство на задочния докторант Вида Георгиева. Темата, която ѝ възложихме, бе „Генетично характеризирание на *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*) – обект на Националната програма за развъждане на медоносните пчели в България“. Вида използва сравнителен изoenзимен популационно-генетичен анализ, разработвайки поставената тема много отговорно и през 2016 г., преди изтичане на срока за докторантурата ѝ, тя защити успешно дисертационния си труд и получи ОНС „доктор“.

По-долу представям заключенията и изводите от дисертационното ѝ проучване (Георгиева, 2016).

Проведеният в хода на настоящото изследване анализ предоставя информация за генетичния полиморфизъм и нивото на генетична диференциация и консолидация в популациите *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), подложени на селекционен контрол и използвани като обект на Националната програма за развъждане на медоносните пчели в България. Получените резултати, направените анализи и проведеното на тяхната база обсъждане дават основание за формулиране на следните основни изводи:

1. Установено е, че шестте анализирани ензимни локуса са полиморфни в изследваните популации с три-, четири- и пета-

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

Дисертацията на Вида бе ценна освен заради направените съществени изводи и поради факта, че за изследваните български популации *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), подложени на селекционен контрол и използвани като обект на Националната програма за развъждане на медоносните пчели в България, бе установено ниско ниво

на генетична диференциация, високо ниво на консолидация и общ висок селекционен потенциал. В същото време при сравнението на тези популации с други такива от страната ни констатираното ниво на диференциация бе също ниско, което ние разчитаме като индикатор за значимо генетично сходство, общо сред популациите на *Apis mellifera* на територията на България. Тази хипотеза се нуждаеше от допълнителни проучвания с прилагане и на други (освен изoenзимните) генетични подходи, както и от сериозен популационно-генетичен и статистически анализ, които да я потвърдят или отхвърлят.

През лятото на 2015 г. въпреки ограничените ми дейности в европейската изследователска група получих покана за сътрудничество от екипа на международния проект ECFP7-KBBE Project 613960 „SMARTBEES“. Част от целите на проекта бяха насочени към детайлно проучване на биологичното разнообразие на *Apis mellifera* в Европа (чрез секвениране, биоинформационен анализ, каталогизиране) и разработване на нови инструменти за охарактеризиране на европейските подвидове медоносни пчели чрез създаване на молекулни маркери за диагностика. Тъй като поставените задачи бяха значими и заради разбирането ни, че българските пчели не бива да са извън този сравнителен анализ, заедно с проф. П. Петров се включихме в екипа от колаборатори на „SMARTBEES“, като за тази цел подписахме и официален „Меморандум за разбирателство“. Така през лятото на 2015 г. успяхме да съберем, групираме, опишем и изпратим официално достатъчно представителни (като брой индивиди и брой местонахождения) проби медоносни пчели от общо 67 популации, обитаващи райони по цялата територия на България. Резултатите от тази дейност са с бъдещи недалечни измерения. Очаква се те да подпомогнат решаването на основни задачи, стоящи пред екипа на „SMARTBEES“, и да са в основата на задълбоченото сравнително геномно характеризиране на медоносната пчела. Обединените дейности в това направление засилват сътрудничеството на европейско ниво (с участието на България) и създават трайни условия за целенасочени и научно базирани акции за опазване на биологичното разнообразие сред подвидовете, екотиповете и местните адаптирани популации на *Apis mellifera* в Европа и света.

Към настоящия момент двамата с проф. Пламен Петров събираме и предоставяме данни за нуждите на ежегодните мониторингови проучвания на COLOSS в Европа, за общите цели на международната изследователската мрежа за устойчиво пчеларство (RNSBB) и поддържахме контактите си с колегите от работната група 4 на COLOSS при обсъждане на проблеми, споделяне на резултати и реализиране на идеи.

През изминалия период традиционното ни сътрудничество с колегите от Белградския университет се изрази в работата по дисертационния труд на докторантката Валентина Пешева. Аз бях поканена от проф. Мича Младенович (Белградски университет, Сърбия) като втори научен ръководител на тази дисертация и поех отговорностите по изоензимното популационно-генетично характеризиране на популации медоносни пчели от територията на Косово. Работата на Валентина обединяваше морфометрични и биохимико-генетични подходи и бе подготвена за защита в края на 2016 г. Иоензимният анализ бе изцяло проведен в научната лаборатория по генетика в нашия факултет с помощта и под вещото методично ръководство на д-р Иван Стоянов, гл. ас. по генетика в катедрата ни. За целта Валентина и колегата ѝ докторант Боян Анджелкович осъществиха двукратна специализация в лабораторията ни, където освен експерименталната работа проведохме статистическа обработка и обсъждане на получените резултати и ги подготвихме за публикуване (Peševa et al., 2015).

Наши нови проучвания относно генетичния полиморфизъм сред популациите медоносни пчели в България, както и данни за генетичното сходство между популации на българската медоносна пчела и подобрани пчелни семейства с ясно изразено хигиенно поведение бяха докладвани на международната конференция по зоология през 2016 г. в Хисаря. Получените резултати потвърдиха и по-ранни данни за това, че българската медоносна пчела *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*), която е най-добре адаптирана към местните условия, достатъчно продуктивна и жизнена (устойчива), е с много висок сравнителен хигиенен потенциал – факт, който не трябва да бъде пренебрегван от българските изследователи по апидология и пчеларите в страната ни.

Този неоспорим факт, както и установените общозначими продуктивни, поведенчески и жизнени характеристики на местната за България медоносна пчела провокираха у мен желанието на поредната Балканска научна конференция по биология през ноември 2017 г., да изнесе пленарен доклад, посветен на *Apis mellifera* (нейното генетично разнообразие и значимостта на местните адаптирани пчелни популации), спирайки се на темата „От идеята за „суперпчела“ към информирания избор на местна пчела: Българската медоносна пчела – възможности за дискриминация и основания за консервация“. Докладът се прие с интерес от аудиторията и предизвика много разсъждения и дискусии.

В периода 2013 – 2018 година бяха публикувани поредица от резултати – плод на задълбочените сравнителни изследвания, организирани от работната група 4 на COLOSS. Тези резултати, освен данни за генетичен полиморфизъм и възможности за разграничаване на подвидо-

вете на *Apis mellifera* в Европа, доказаха значимите ценни качества на местната българска медоносна пчела *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*) при сравнение с популациите на другите, включени в GEI експеримента, европейски подвидове – нейната висока устойчивост и жизнеспособност, сили за оцеляване в конкретните условия на средата за дълъг период без третиране с лекарствени препарати, висок хигиенен потенциал, неагресивно поведение и слаба ройливост, отчетени по ясни сравнителни скали, стандартизирани за Европа.

Цялата научна информация – методи, резултати, обсъждания и заключения относно генетичния полиморфизъм, установен във и сред популациите медоносни пчели в България, както и констатираните зависимости между генетични показатели и селекционно значими качества на българската медоносна пчела, е включена в дисертацията ми за придобиване на научната степен „доктор на науките“. Изработването на моя „голям докторат“ отне над 20 години лабораторен труд, дискусии и сътрудничество с колеги в България и Европа, пътувания, събиране на проби, напрежение, стрес и устрем. Това са години, които нямат нищо общо с материални стимули, които са подчинени единствено на стремеж за откриване, съпоставяне, изясняване, надграждане, израстване... Години, наситени с вдъхновение, които много ценя и които ме карат да се чувствам истински удовлетворена. Аз защитих „големия си докторат“ на 16 февруари 2017 г.

Членове на научното жури бяха утвърдени и високо ценени експерти в сферата на генетиката и селекцията. Те изработиха своите рецензии и становища, посочвайки силните и значими страни в дългогодишното ми изследване, като представиха на вниманието ми и своите бележки, въпроси и препоръки. Благодарна съм им за професионализма, за ценните идеи и съвети, които ме накараха да погледна на проучванията си и от друг ъгъл.

Залата, в която се проведе защитата, бе 14. аудитория на Биологическия факултет, преобразена от колегите ми специално за събитието. Срамежливи и нежни пролетни цветя в естествена кашпа от преплетени пръчки, като гнездо на приятелство и подкрепа, бяха поставени пред мен. И един невероятен тих участник – скромно растение, разположено в дъното на аудиторията, чието присъствие интуитивно усетих. Когато го погледнах, то сякаш ме придърпа към себе си, разгърна ръце и ме прегърна – силно, осезателно, разгърсващо – това бе една голяма красива пахира, подарък от колегите в катедрата за мен... С нежното си стъбло и гъстата зелена шапка пахирата ми даде кураж и по особен начин балансира емоционалното ми напрежение преди защитата. Наричат

растението „дърво на успеха и богатството“, дори „дърво на съдбата“. За мен и в момента то е просто дърво на обичта...

Защитата беше успешна. Един хубав край на дълго и желано от мен пътуване... Един чакан завършек на лична моя мисия, посветена на медоносните пчели, с които общувах от детството си сред зеленината, потоците и цветовете на Средна гора... Една голяма обич, благодарност и отчет към всички, съпричастни с проучването ми – професионално и емоционално, от този и от другия свят...

Мислено се вглеждам в тихото и светло лице на моя баща, в просветлелите образи на моите учители и въпросите за лични мисии, за Вселената и човека, за измеренията на човешкия живот и за знаците, които оставяме след себе си, също започват да изсветляват...

Чрез защитата на този докторат (и с публикуването на тази книга!) аз сложих поредната точка по пътя си. И тя ми даде нова свобода...

*Ще ме отвява и довява Вятъра,
когато търся себе си
сред много шум
и сред безкрайна тишина.
И ще откривам
Истината постепенно –
там някъде,
където е пределът
на моето присъствие
и мойта Свобода...*

По-долу са представени данни относно публикуваните статии, участията ми в научни форуми и осъществените проекти по периоди в хода на професионалния ми живот, посветени на генетиката на медоносните пчели.

Научни публикации 1992 – 1996

1. **Иванова Е. Н.** (1996) Изменчивост при *Apis mellifera* L. – онтогенетични и популационно-генетични аспекти. Автореферат за придобиване на научна и образователна степен „доктор“. Пловдивско университетско издателство. Пловдив. стр. 31.
2. **Иванова Е. Н.**, Доброволов, И., Попов, П. (1991) Електрофоретични проучвания върху неспецифичните естерази при *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) по време на онтогенезата. *Animalia*. 29 (6), 243 – 245.
3. **Иванова Е. Н.** (1991) Изследвания върху електрофоретичните спектри на разтворими белтъци при *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Animalia*, 29, 6, 247 – 250.
4. **Иванова Е. Н.** (1993) Електрофорезата като метод на изследване при медоносните пчели. *Пчеларство*. 5, 5 – 6.
5. **Ivanova E.**, Popov, P., Bogkova, M. (1994) Electrophoretic studies of the NAD-dependent MDH during the larvae stage from the ontogenesis of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Animalia*. 30 (6), 57 – 60.
6. Popov P., **Ivanova E.** (1994) Electrophoretic studies on the total soluble protein in imago forms of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Animalia*. 30 (6), 53 – 56.
7. **Иванова Е.**, Попов, П., Стойкова Т. (1995) Електрофоретични проучвания на полиморфизма по общи протеини и някои изоензими при *Apis mellifera* L. в България. *Animalia*. 31 (6), 51 – 56.
8. **Иванова Е. Н.** (1995) Популационно-генетични проучвания върху медоносните пчели. *Пчеларство*. 6, 5 – 7.
9. **Ivanova E. N.**, Popov P. (1996 – 1997) Electrophoretic studies of non-specific esterases during the ontogenetic course of domestic bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in Bulgaria. *Genetics and Breeding*. 28 (1 – 2), 13 – 16.

1997 – 2001

1. **Ivanova E.**, Popov P., Dobrovolo 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., Dobrovolo I., Tersieva, P. (1997) Untersuchungen über 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 – гр. Пловдив. 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 – гр. Пловдив, Б. Естествени и хуманитарни науки. I, 413 – 416.
12. **Ivanova E.** (2000) Elektrophoretische Untersuchungen zur Organspezifitdt der wasserloslichen Proteine in der Ontogenese von Drohnen (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*. 31, 671 – 677. IF – 1.43.
13. **Ivanova E.**, Popov P., Dobrovolov, I. (2000) Elektrophoretische Untersuchungen der wasserlцslichen Proteine bei der Honigbiene *Apis mellifera* L. im Verlauf der Ontogenese. *Apidologie*. 31, 679 – 687. IF – 1.43.

14. **Ivanova E.**, Dobrovolov 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.**, Dobrovolov 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.

2002 – 2007

1. **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.
2. **Иванова Е.** (2003) Генетичен контрол на органната специфичност в изявата на NAD-зависимите малатдехидрогенази (MDH) в хода на онтогенезата при медоносните пчели (*Apis mellifera* L.). Microbiologia et Cytologia. 39 (8), 45 – 51.
3. **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.
4. **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.
5. **Ivanova E.** (2004) Dynamics in the expression of non-specific esterases (EST) and NAD-dependent malate dehydrogenases (MDH) in mucus, bulbus and cornual glands in drones of honeybees *Apis mellifera* L. Genetics and Breeding. 33 (3 – 4), 55 – 62.
6. **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.
7. **Ivanova E.**, Staykova T., Petrov P. (2006) Some preliminary data about genetic variability in local Bulgarian honeybee *Apis mellifera*. Proceedings of International Apimondia Symposium „Selection and Queen Breeding“. Bulgaria, 1 – 3 September 2006, 1 – 11.

8. **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
9. **Ivanova E.**, Staykova T. (2007) Stagespecificity 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
10. **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.

2008 – 2012

1. **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.
2. 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.
3. **Ivanova E.**, Bouga M. (2009) Genetic variability in honey bee population from Northern Bulgaria. *Proceedings of the 41st Congress Apimondia*, 15 – 20 September, 2009, Montpellier – France.
4. **Ivanova E.**, Petrov P. (2009) La Bulgarie La diversité, l'apiculture et la vitalité – la situation actuelle des abeilles bulgares. *Bulletin Technique Apicole*. 146, 36 (2), 67. ISSN 0335 3710.
5. **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.
6. 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.
7. **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.
8. **Ivanova E.** (2010) Investigation on genetic variability in honeybee populations from Bulgaria, Greece and Serbia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 24 (2), 385–389.

9. **Ivanova E.**, Staykova T., Petrov P. (2010) Allozyme variability in populations of local Bulgarian honey bee. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 24 (2), 371 – 374.
10. 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., 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.
11. Staykova T., **Ivanova E.**, Grekov D., Petrov P., Tzenov P., Vasileva Y., Petkov Z., Arkova-Pantaleeva D. (2010) Development of a specialized center for scientific, training and diagnostic work for the needs of Apidology and Sericology in Bulgaria. *Advances in Bulgarian Science* (1), 63 – 67.
12. **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.
13. 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.
14. 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.
15. **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.
16. **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.
17. **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.

18. **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.

2013 – 2017

1. Meixner M., Pinto M. A., Bouga M., Kryger P., **Ivanova E.**, Fuchs S. (2013) Standard methods for characterizing 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.
2. Uzunov A., Meixner M., Kiprijanovska H., Andonov S., Gregorc A., **Ivanova E.**, Bouga M., Dobi P., Büchler R., Francis R., 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.
3. 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 2014DOI 10.3896/IBRA.1.53.2.02. IF – 1.926.
4. Meixner M., Francis R., Gajda A., Kryger P., Andonov S., Uzunov A., Topolska G., Costa C., Amiri E., Berg S., Bienkowska M., Bouga, M., Büchler¹ 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.
5. 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.1.53.2.06IF – 1.926.

6. 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.
7. 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.
8. 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, (4)567 – 572. IF – 0.532.
9. Nikolova S., Bienkowska M., Gerula D., **Ivanova E.** (2015). Microsatellite DNA polymorphism in selectively controlled *A. m. carnica* and *A. m. caucasica* populations from Poland. Archives of Biological Sciences. 67 (3), 889 – 894. DOI: 10.2298/ABS141102048N. IF – 0.718.
10. Meixner M., Büchler R., Costa C., Andonov S., Bienkowska M., Bouga, M., Filipi J., Hatjina F., **Ivanova E.**, Kezic N., Kryger P., Le Conte Y., Panasiuk B., Petrov P., Ruottinen L., 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.
11. **Ivanova E.** (2015). Additional information concerning allozyme variability of Bulgarian honey bees. Acta Zoologica Bulgarica. 67 (4), 573 – 578. IF – 0.532.
12. 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.

13. 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. SJR – 0.212

Участия в научни форуми 2002 – 2007

1. **Ivanova E.**, Ivgin R., Kence M., Kence A. (2004) Genetic variability in honeybee populations from Bulgaria and Turkey. Proceedings of the First European Conference of Apidology EurBee 1. Udine, Italy, 19 – 23 September 2004, 45.
2. **Ivanova E.**, Ivgin R., Kence M., Kence A. (2007) Determination of genetic Variation and Differentiation in Honey Bees of Turkey and Bulgaria. Proceedings of the First Balkan Countries Beekeeping Congress and Exhibition. 29 March – 1 April 2007 Istanbul, Turkey, 47 – 48.
3. **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.
4. **Ivanova E.** (2006) Age specificity in the expression of proteins of honey bee fat body in the course of ontogenesis. Proceedings of the Second European Conference of Apidology EurBee 2. Prague 10-16 September 2006.

2008 – 2012

1. **Ivanova E.**, Petrov P., Ivgin R., Kence M., Bouga M., Emmanouel N. (2008) Genetic Variation of honeybee (*Apis mellifera*) populations from Bulgaria. Proceedings of the Third European Conference of Apidology, 8 – 11 September, 2008, Belfast, Ireland, 55.
2. Ivgin R., Kence M., **Ivanova E.** (2008) Honeybees from Bulgaria analyzed morphometrically and compared with a neighbouring population from Turkey. Proceedings of the Third European Conference of Apidology, 8 – 11 September, 2008, Belfast, Ireland. 106.
3. **Ivanova E.**, Petrov P. (2009) Diversity, beekeeping and vitality – current situation of Bulgarian bees. Proceedings of the 4th COLOSS Conference – Zagreb, Croatia, 3 – 4 March 2009.

4. **Ivanova E.**, Petrov P. (2009) Bulgarian honeybee colony losses during 2008/2009. Proceedings of the III Conference of COST Action FA0803 – Prevention of honeybee COlony LOSSes, Montpellier, France 13 – 15 September, 2009.
5. **Ivanova E.**, Petrov P. (2009) Vitality and productivity of local Bulgarian honey bees. Proceedings of the III Conference of COST Action FA0803 – Prevention of honeybee COlony LOSSes, 13 – 15 September, 2009, Montpellier, France.
6. **Ivanova E.**, Petrov P. (2009) Inventory of the race belonging of honey bees in different bio-geographical regions in Bulgaria based on morpho-ethological, population-genetic and productivity characteristics. COLOSS Workshop „Standardization of Methods II“: Kirchhain, Germany, 28.07 – 02.08. 2009.
7. **Ivanova E.** (2010) Allozymes as possible markers for the discrimination of honey bee populations. COLOSS Work Shop „Standardized protocols for honey bee vitality and diversity“ 26.-27.02.2010, Athens, Greece.
8. Büchler R., Bienkowska M., Panasiuk B., Costa C., Hatjina F., Leonidas C., Michalis K., **Ivanova E.**, Petrov P., Kezic N., Drazic M., Korpela S., Uzunov A., Wilde J. (2010) Preliminary evaluation of the Coloss WG 4 genotype-environment interaction experiment. COLOSS Work Shop „Standardized protocols for honey bee vitality and diversity“ 16th to 18th June 2010, Slagelse, Denmark, 17.
9. Meixner M., Bouga M., Kryger P., Uzunov A., **Ivanova E.** (2010) Discrimination of *A. mellifera* subspecies involved in the GEI experiment. COLOSS Work Shop „Standardized protocols for honey bee vitality and diversity“ 16th to 18th June 2010, Slagelse, Denmark, 22.
10. **Ivanova E.** (2010) Preliminary data about isoenzyme variability of some *A. mellifera* subspecies involved in the WG4 GEI experiment. COLOSS Work Shop „Standardized protocols for honey bee vitality and diversity“ 16th to 18th June 2010, Slagelse, Denmark, 18.
11. Costa C., Büchler R., Meixner M., Bienkowska M., Panasiuk B., Hatjina F., Leonidas C., Michalis K., **Ivanova E.**, Petrov P., Kezic N., Drazic M., Korpela S., Uzunov A., Wilde J. (2010) Ongoing evaluations of the Coloss WG 4 genotype-environment interaction experiment. Proceedings of the 6th COLOSS Conference 5. – 6.09.2010, Hacettepe University, Ankara, Turkey, 26.
12. **Ivanova E.**, Nikolova S., Petrov P. (2010) Diversity investigation of Bulgarian honey bees based on isoenzyme and microsatellite DNA analysis. Proceedings of the 6th COLOSS Conference 5. – 6.09.2010, Hacettepe University, Ankara, Turkey, 45.

13. Meixner M., Bouga M., Kryger P., Uzunov A., **Ivanova E.** (2010) Assessing genetic variability of honey bee origins used in the GEI experiment. Proceedings of the 6th COLOSS Conference 5. – 6.09.2010, Hacettepe University, Ankara, Turkey, 52.
14. Petrov P., Gurgulova K., Valchovski R., **Ivanova E.** (2010) Concerning vitality of honey bees in Bulgaria: Nosema situation. Proceedings of the 6th COLOSS Conference 5. – 6.09.2010, Hacettepe University, Ankara, Turkey, 58.
15. **Ivanova E.**, Bouga M., Petrov P., Mladenovic M., Rasic S., Charistos L., Hatjina F. (2010) Preliminary results from a study on Balkan honey bees' genetic variability using isoenzymic approach. In Proceedings of 4th European Conference of Apidology. 7 – 9 September 2010, Ankara, Turkey, 45.
16. Büchler R., Berg S., Bienkowska M., Panasiuk B., Le Conte Y., Costa C., Dyrba W., Hatjina F., Leonidas C., **Ivanova E.**, Petrov P., Kezic N., Korpela S., Kryger P., Pechhacker H., Uzunov A., Wilde J. (2011) First results of the international genotype-environment interaction experiment. COLOSS Work Shop WG4 „Honey bee vitality and diversity – status of the GEI experiment and the subspecies discrimination methods comparison“ 01. – 03.03.2011, Plovdiv, Bulgaria, 9.
17. **Ivanova E.** (2011) Genetic variability of honey bee origins used in the GEI experiment: preliminary data of alloenzyme analysis. COLOSS Work Shop WG4 „Honey bee vitality and diversity – status of the GEI experiment and the subspecies discrimination methods comparison“ 01. – 03. 03. 2011, Plovdiv, Bulgaria, 12.
18. **Ivanova E.**, Staykova T., Petrov P. (2011) Comparison in genetic diversity of *A. m. macedonica* and *A. m. carnica* populations from Bulgaria, Greece and Serbia based on enzyme analysis. COLOSS Work Shop WG4 „Honey bee vitality and diversity – status of the GEI experiment and the subspecies discrimination methods comparison“ 01. – 03.03.2011, Plovdiv, Bulgaria, 19.
19. Nikolova S. N., **Ivanova E. N.** (2011) Investigation on genetic variability in honey bee population from Bulgaria based on microsatellite analysis. COLOSS Work Shop WG4 „Honey bee vitality and diversity – status of the GEI experiment and the subspecies discrimination methods comparison“ 01. – 03.03.2011, Plovdiv, Bulgaria, 20.
20. Ivgin-Tunka R., **Ivanova E.**, Kence M. (2011) A test of the discrimination power of traditional and geometric morphometric methods on honey bees (*Apis mellifera*) from Bulgaria and European

- part of Turkey. COLOSS Work Shop WG4 „Honey bee vitality and diversity – status of the GEI experiment and the subspecies discrimination methods comparison“ 01. – 03. 03. 2011, Plovdiv, Bulgaria, 23.
21. Meixner M., Bouga M., Charistos L., Kryger P., **Ivanova E.**, Hatjina F. (2011) Genetic variability of honey bee origins used in the GEI experiment using geometric morphometrics approach. COLOSS Work Shop WG4 „Honey bee vitality and diversity – Field observations of experimental GEI colonies“ 26. – 29. 07. 2011, Puławy, Poland.
 22. **Ivanova E.**, Bienkowska B., Petrov P., Panasiuk B., Stoyanov I. (2011) Allozyme polymorphism in *Apis mellifera* subspecies selectively reared in Poland and Bulgaria. COLOSS Work Shop WG4 „Honey bee vitality and diversity – Field observations of experimental GEI colonies“ 26. – 29.07.2011, Puławy, Poland.
 23. **Ivanova E.**, Bouga M., Staykova T., Rasic S., Charistos L., Mladenovic M., Petrov P., Stoyanov I., Hatjina F. (2011) Study on Balkan honey bees' genetic variability based on alloenzymic analysis. COLOSS Work Shop WG4 „Honey bee vitality and diversity – Field observations of experimental GEI colonies“ 26. – 29.07.2011, Puławy, Poland.
 24. Büchler R., Meixner M., Berg S., Bienkowska M., Panasiuk B., Le Conte Y., Costa C., Dyrba W., Hatjina F., Charistos L., **Ivanova E.**, Petrov P., Kezic N., Korpela S., Kryger P., Pechhacker H., Uzunov A., Wilde J. (2011) Preliminary results of the international genotype-environment interaction experiment of WG 4. Proceedings of the 7th COLOSS Conference „Prevention of honeybee COLony LOSSes“, 27th – 28th August, 2011, Belgrade, Serbia.
 25. Meixner M., Bouga M., Kryger P., **Ivanova E.**, Hatjina F., Emmanouil N. (2011) Genetic variability of honey bee origins used in the GEI experiment: mitochondrial DNA analysis. Workshop WG (2+4) „Diagnostic Surveys“, 25th – 26th August, 2011, Belgrade, Serbia.
 26. Meixner M., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Le Conte Y., Costa C., Dyrba W., Hatjina F., **Ivanova E.**, Kezic N., Korpela S., Kryger P., Panasiuk B., Pechhacker H., Petrov P., Uzunov A., Wilde J. (2011) Effects of genotype and environment for disease relevance – preliminary results from the genotype-environment experiment of WG4. Workshop WG (2+4) „Diagnostic Surveys“ 25th-26th August, 2011, Belgrade, Serbia.

27. **Ivanova E.**, Nikolova S. N. (2012) DNA bank establishment from *Apis mellifera* populations inhabiting the territory of Bulgaria. COLOSS Work Shop WG4: „Bee Book and data analyses of GEI experiment“. 23th January – 27th January, 2012, MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen, Finland.
28. Büchler R., Berg S., Bienkowska M., Panasiuk B., Le Conte Y., Costa C., Dyrba W., Bouga M., Hatjina F., Charistos L., Petrov P., **Ivanova E.**, Kezic N., Korpela S., Kryger P., Pechhacker H., Uzunov A., Wilde J. (2012) Effects of genotype and environmental factors on the survivability and productivity of European honey bee colonies. SICAMM conference, Switzerland, 31 Aug – 4 Sept, 2012.
29. Costa C., Büchler R., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Bubalo D., Charistos L., Le Conte Y., Drazic M., Dyrba W., Fillipi J., Hatjina F., **Ivanova E.**, Kezic N., Kiprijanovska H., Kokinis M., Korpela S., Kryger P., Lodesani P., Meixner M., Panasiuk B., Pechhacker H., Petrov P., Oliveri E., Ruottinen L., Uzunov A., Vaccari G., Wilde J. (2012) Results of the Europe-wide genotype – environment interactions experiment. 8th COLOSS Conference, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), 2-3 Sept. 2012, Germany.
30. Marina M., Charistos L., Hatjina F., Bouga M., Kryger P., **Ivanova E.** (2012) Genetic variability of honey bee origins used in the GEI experiment: geometric morphometry analysis. 8th COLOSS Conference, MartinLuther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), 2 – 3 Sept. 2012, Germany.
31. Nikolova S., **Ivanova E.** (2012) Microsatellite DNA polymorphism in *Apis mellifera* L. from Bulgaria. 5th European Conference of Apidology, 3 – 7th September 2012, Halle an der Saale, Germany.
32. **Ivanova E.**, Nikolova S., Petrov P. (2012) Genetic variability in a local Bulgarian honey bee population – allozyme and microsatellite DNA analysis. 8th COLOSS Conference, MartinLuther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), 2 – 3 Sept. 2012, Germany.
33. **Ivanova E.** (2012) Genetic variability of honey bee origins used in the GEI experiment: alloenzyme analysis. COLOSS Work Shop WG4: Genetic discrimination. 17 – 19.05.2012, Agricultural University of Athens, Greece.
34. Bienkowska M., Andonov S., Büchler R., Costa C., Filipi J., Hatjina F., **Ivanova E.**, Kezic N., Le Conte Y., Panasiuk B., Uzunov A., Wilde J. (2012) New breeding strategies – in order to protect honey

bee populations. COLOSS Workshop“ Revision of manuscripts and plans for sustainable breeding“ – Palermo, Italy, 5 – 9.11.2012.

2013 – 2017

1. Hatjina F., Bieńkowska M., Charistos L., Chlebo R., Costa C., Dražić M., Filipi J., Gregorc A., **Ivanova E.**, Kezic N., Kopernicky J., Kryger P., Lodesani M., Lokar V., Mladenovic M., Panasiuk P., Petrov P., Rašić S., Smadis Skerl M. I., Vejsnæs F., Wilde J. (2013) A review of methods for assessing honey bee queen quality characters used in some European countries. 9th COLOSS Conference, 27 – 29 September 2013, Kyiv, Ukraine.
2. Costa C., Andonov S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Filipi J., Hatjina F., **Ivanova E.**, Kezic N., Kryger P., Le Conte Y., Meixner M., Panasiuk B., Petrov P., Ruottinen L., Uzunov A., Wilde J. (2014) The survival and performance of colonies of local versus non-local origin in a no-Varroa treatment European experiment. ApiOrganica: 3rd World Symposium of Organic Beekeeping, 4 – 7 March 2014, Bologna, Italy.
3. **Ivanova E.**, Nikolova S. (2014). DNA bank establishment from *Apis mellifera* populations inhabiting the territory of Bulgaria. Sixth EurBee Congress, Murcia – Spain, 9th to 11th September, 2014.
4. **Ivanova E.**, Nikolova S., Petrov P. (2014) Allozyme and microsatellite DNA polymorphism and markers, usable for local Bulgarian honey bee discrimination. Sixth EurBee Congress, Murcia – Spain, 9th to 11th September 2014.
5. Hatjina F., Bieńkowska M., Charistos L., Chlebo R., Costa C., Dražić M., Filipi J., Gregorc A., **Ivanova E.**, Kezic N., Kopernicky J., Kryger P., Lodesani M., Lokar V., Mladenovic M., Panasiuk B., Petrov P., Rašić S., Smadis Skerl M. I., Vejsnæs F., Wilde J. (2014) Quality of honey bee queens through physical characters and colony performance. Sixth EurBee Congress, Murcia – Spain, 9th to 11th September 2014.
6. Costa C., Andonov S., Bienkowska M., Bouga M., Büchler R., Filipi J., Hatjina F., **Ivanova E.**, Kezic N., Kryger P., Le Conte Y., Meixner M., Panasiuk B., Petrov P., Ruottinen L., Uzunov A., Wilde J. (2014) The influence of genetic origin and environment on the survival and performance of European colonies. Sixth EurBee Congress, Murcia – Spain, 9th to 11th September 2014.
7. **Ivanova E.**, Nikolova S., Petrov P. (2016) Possibilities for discrimination of Bulgarian honey bees based on different genetic

- markers. International Conference on Zoology and Zoonoses, October 26 – 28, 2016, Hissar, Bulgaria.
8. Georgieva V., Petrov P., Staykova T., Lazarov S., Stoyanov I., **Ivanova E.** (2016) Genetic comparison between local *Apis mellifera macedonica*, selectively reared for production of bee queens and swarms in Bulgaria and honey bee colonies with indicative hygienic behaviour. International Conference on Zoology and Zoonoses, October 26 – 28, 2016, Hissar, Bulgaria.
 9. Lazarov S., Stoyanov I., Georgieva V., Zhelyazkova I., **Ivanova E.** (2016) Allozyme genetic characterization of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies from Bulgariawith different hygienic behaviour. International Conference on Zoology and Zoonoses, October 26 – 28, 2016, Hissar, Bulgaria.
 10. **Ivanova E.** (2017) From the idea for super bees to the informed choice of local bees: The Bulgarian honey bee – possibilities for discrimination and reasons for conservation. Book of abstracts. 17 – 19. 4th Balkan Scientific Conference on Biology, November 1st – 3rd, 2017, Plovdiv, Bulgaria.

Проекти

1997 – 2001

1. СС-580 „Изследване на генетичната структура на популации *Apis mellifera* в България“ (1996 – 1998) – НФНИ – МОМН – член на научния колектив.
2. МУ/БМ 04/96 „Тъканна и органна специфичност на експресията на протеини и някои изоензими в хода на онтогенезата на *Apis mellifera*“ (1997 – 1999) – НФНИ – МОМН – ръководител на научния колектив.
3. Б-12 „Онтогенетични и популационно-генетични изследвания на представители от клас *Insecta*“ (1998 – 1999) – ФНИ при ПУ – ръководител на научния колектив.
4. 01Б02 „Органна специфичност в експресията на разтворими протеини и неспецифични естерази при *Apis mellifera*“ (2001 – 2002) – ФНИ при ПУ – ръководител на научния колектив.
5. „Fatty acids and lipids in three reproductive glands of the honeybee drone (*Apis mellifera* L)“ (2001) – Международен проект, финансиран от ДААД, съвместно с Института по науки за пчелите към Гьоте Университет, Франкфурт, Германия.

2002 – 2007

1. TUBITAK 2003 „Genetic variation of Phosphoglucomutase (2.7.5.1.) in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey and Bulgaria“ (2003) – международен проект, осъществен съвместно с лабораторията по генетика на Middle East Technical University в Анкара, Турция.
2. ВУАН2. – Стимулиране на научните изследвания във ВУЗ „Инвентаризация и паспортизация на някои породи *Bombyx mori*, отглеждани в България, и популации на местната за страната *Apis mellifera* L. на базата на популационно-генетични и селекционни параметри“ (2005 – 2008) – НФНИ – МОМН – член на научния колектив.
3. Б 20 „Онтогенетични изследвания на протеините от мастното тяло на два вида полезни насекоми – черничевата копринена пеперуда (*Bombyx mori* L.) и медоносната пчела (*Apis mellifera* L.) (2005 – 2006) – ФНИ при ПУ – член на научния колектив.
4. 01Б02 „Органна специфичност в експресията на разтворими протеини и неспецифични естерази при *Apis mellifera*“ (2001 – 2002) – ФНИ при ПУ – член на научния колектив.
5. 03Б34 „Проучвания върху изменчивостта на някои протеини и изоензими в репродуктивната система при два вида полезни насекоми със селскостопанско значение“ (2003 – 2004) – ФНИ при ПУ – ръководител на научния колектив.
6. Б-21 „Популационно-генетични изследвания при два вида полезни насекоми“ (2007 – 2008) – ФНИ при ПУ – ръководител на научния колектив.
7. ИФС 2007 – Научна инфраструктура: „Изграждане на мултифункционална лаборатория по генетични и молекулярни маркери за оценка и инвентаризация на национално значими растителни и животински ресурси“ (2007 – 2009) – НФНИ – МОМН – ръководител на научния колектив.

2008 – 2012

1. ДО02-63 Развитие на научна инфраструктура: „Изграждане и развитие на специализиран център за научни изследвания, научна и диагностична дейност за нуждите на апидологията и серикологията в България“ (2008 – 2010) – НФНИ – МОМН – член на научния колектив.
2. COST Action FA 0803 „Prevention of honey bee colony losses“ (2008 – 2012) – член на Управителния съвет на акцията, представител на България в УС.
3. Проект по Едногодишна програма на Министерството на земеделието и храните 2009. „Инвентаризация и паспортизация на местната за страната *Apis mellifera* L.“ – член на научния колектив.
4. Проект по Тригодишна програма на Министерството на земеделието и храните (2011 – 2013) „Установяване на генетични и морфо-етологични маркери за устойчивост на пчелни семейства към заболявания с цел формиране на система от дейности по селекция и консервация на националните генетични ресурси и опазване на пчелите от болести и изчезване“ – член на научния колектив.

2013 – 2017

ECFP7-KBBE Project 613960 „SMARTBEES“ – колаборатор.



2011 г., Пловдив.

Част от състава на катедра „Биология на развитието“ – доц. Емилия Дамянова, аз, биологът Маргарита Шиварова, д-р Теодора Попова, д-р Пенка Василева, д-р Иван Стоянов, проф. д-р Теодора Стайкова и проф. д.б.н. Петър Попов



С проф. д.б.н. Иван Доброволов и моите колеги и приятели Теодора Стайкова, Петя и Иван Иванови във Варна – след вълнуващ работен ден в Аквариума



2001 г., Оберурсел (Германия). Проф. Николаус Кьонигер, д-р Щефан Фукс и други колеги дискутират по време на почивка в институтската градина



2001 г., Оберурсел (Германия) – едно от многото умения, които усвоих



2006 г. С моите колеги Манания от Тайланд и Ясна от Словения (светла ѝ памет) на EurVee 2 в Прага



2006 г., Прага (Чехия) – с д-р Рахсан Тунка (първа вляво) и д-р Марина Мейкснер (четвърта от ляво надясно)



2008 г.

В Белфаст с д-р М. Боуга, д-р Р. Тунка и доц. д-р М. Кенче

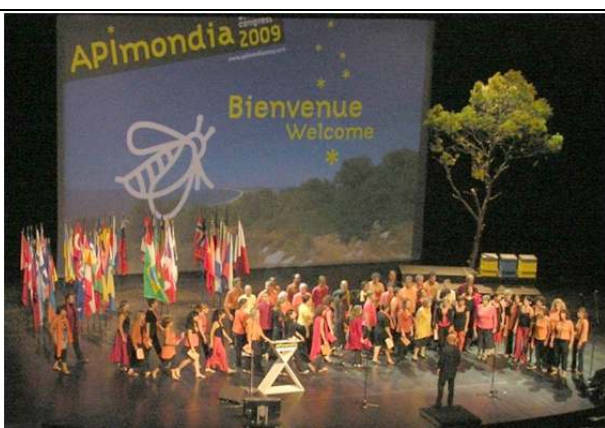


2009 г.

В Атина с моите колеги проф. Т. Стайкова, д-р М. Боуга и проф. Н. Емануел



2009 г., Монпелие (Франция). В конгресната зала с проф. Малгожата Биенковска и д-р Беата Панасиук от Полша



2009 г.

Откриването на световния конгрес Apimondia



2009 г., Монпелие (Франция)



Моят колега проф. Антонио Феличиоли



2010 г., Слагелсе (Дания).
Проф. Айкут Кенче от
Турция
Светла му памет!



2009 г. В лабораторията по генетика на Аграрния университет в Атина с колегата ми д-р Мария Боуга



2010 г. Почивка по време на работна среща в Атина (Гърция)



2010 г. Проф. Пламен Петров и секретарят на НРАП Николай Петков по време на работната ни среща в Слагелсе (Дания)



2010 г. В Слагелсе (Дания) с мои колеги



2011 г., Пулави (Полша), с колеги от Финландия, Германия, Гърция, Сърбия, Хърватия и др. На първата снимка вдясно – д-р Марина Мейкснер, ръководител на работната ни група (COLOSS WG 4 „Diversity and Vitality“); на втората снимка вляво – проф. Никола Кезич от Хърватия





2011 г., Полша. Среца след 10 години с моя добър полски приятел Мирек. Дегустация на лично приготвени специалитети с пчелни продукти по време на прием, организиран в ръководеното от него Пчеларско училище в Полша. С моя съпруг Любомир в Пулави



2011 г., Пулави (Полша). Незабравим момент – в тази полска ковачница един вълшебен ковач заедно с колегата ми от Финландия Лаури Руотинен изковаха в огън подкова, от над 50-те участници в представлението избраха точно мен и ме подковаха истински за предстоящото... После с огън записаха върху подковата името ми и годината на огненото подковаване... Пазя я в дома си...



2012 г., Хале (Германия). С моите приятели и колеги проф. Малгожата Биенковска (за мен просто Гоша!) от Полша и д-р Сладжан Рашич (на първата снимка) и проф. Мича Младенович от Сърбия (на втората снимка)



2012 г., Хале (Германия). Кафе пауза с Гоша, Фани Хаджина и проф. Мича Младенович



2013 г., Уние (Хърватия). С Фани, Гоша и проф. Джерзи Вилде (Полша) – уморени и развеселени...

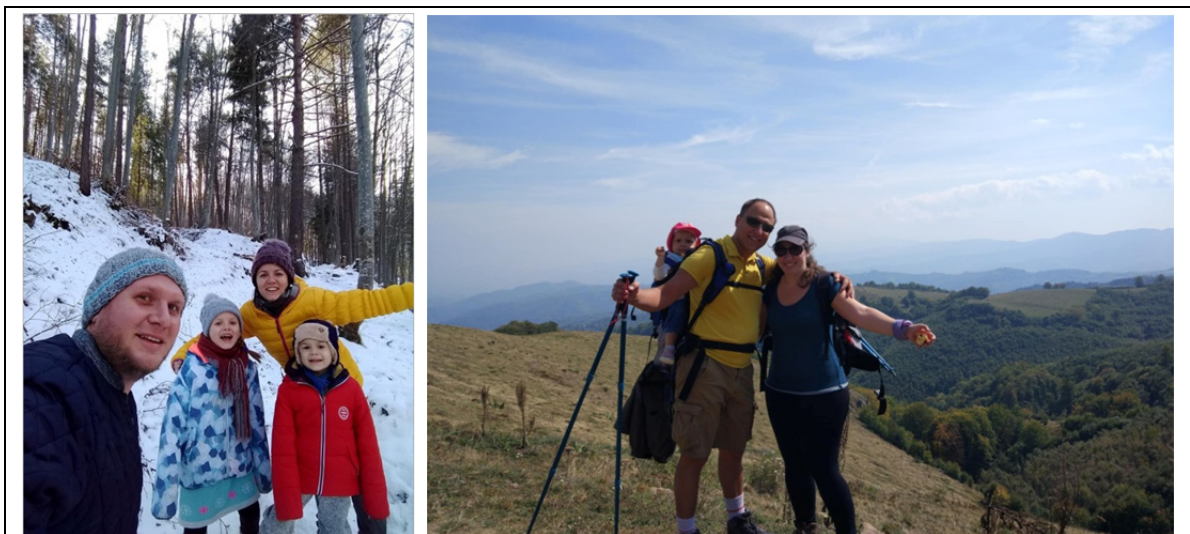


2012 г., Йокойнен (Финландия). Нощен оглед на пчелин, студ и огънове по пътя... С моите колеги Гоша, Фани, Юрек (Джерзи) Вилде и д-р Шефан Фукс (Германия)



2013 г., Уние (Хърватия).
Ние – основателите на международната изследователска мрежа
за устойчиво пчеларство
(Research Network for Sustainable Bee Breeding – RNSBB)

В единение с природата – винаги!



Синове, снахи и внуци — Митко, Галя, Юлето и Лъчко, Радост, Веско и Доби...



С моя съпруг Любомир



На кошерите в Средна гора цветовете са истински, светлината е мека и сърцето ликува...

Всички общуват с пчелите...



Съпругът ми, племенникът Димитър, големият ни син Митко и снаха ни Галина



Малкият ни син Веселин



и снаха ни Добрина



Майка ми – Надежда Баирова



Моят брат Стоян Баиров и снаха ми Таня

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

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 на еволюцията на социалното поведение. Заради хапло-диплоидията като механизъм за детерминране 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 – факт е, че около 80% от опрашването на ентомофилните растения се осъществява именно от *Apis mellifera*. Тази характерна особеност е пряко свързана и с огромното стопанско значение на вида, защото медоносните пчели са основни опрашители и на културните растения, което ги свързва с количеството растителна реколта и като цяло – с изхранването на човечеството. В този аспект пчеларството се явява важен отрасъл на селското стопанство. 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.

Заради високата му чувствителност към замърсявания в околната среда видът *Apis mellifera* се използва за биомониторингови проучвания в много райони по света.

Предвид факта, че огромен брой хора се занимават с професионално или любителско пчеларство, което предоставя възможности за получаване на основни или допълнителни доходи, медоносните пчели имат и социално значение.

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 наблюдава работата и на над 30 майкопроизводителни стопанства в страната ни с капацитет за производство на около 60 – 70 000 високопродуктивни пчелни майки годишно. По данни на Агростатистика (2016) броят на стопанствата с пчелни семейства към октомври 2015 година е 17 967, а добитият пчелен мед за 2015 г. е 11 388 тона. Данните сочат, че средният брой пчелни семейства за стопанство е

със запазваща се тенденция към увеличаване и понастоящем достига 41.5. Структурата на сектора показва, че пчеларството в страната ни 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 на 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 научноизследователска 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 honeybees“. 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, 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 действия в такава посока ще се отрази пагубно върху медоносните пчели и живата природа, с потресаващи последици 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 г. е включвала целенасочени селекционни мероприятия в две направления: чистопородно 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 на генофонда на местната българска медоносна пчела. Във връзка с тази цел в страната ни е проведен морфологичен 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 територията 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, в 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 с 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 склонност към роене. Тя се характеризира с „тиха“ смяна (самосмяна) на пчелните майки, с често бяло (сухо) или понякога смесено запечатване на меда, със сравнително миролюбив характер, което позволява на пчеларя да работи с нея спокойно и без предпазни средства. Характерна нейна особеност е бързата ѝ реакция при наличие или отсъствие на паша. При добри грижи и наличие на паша тя е в състояние да развива силни семейства с висока продуктивност, а при отсъствие на паша – икономично да изразходва хранителните запаси и да ограничава яйцеснасянето на майките. Складирането на хранителните запаси едновременно в плодника и в магазинните надставки е друга характерна нейна особеност. В условията на България местната пчела издържа както на високи, така и на ниски температури и презимува успешно. Тя охранява гнездото си добре и няма склонност към кражби в чужди семейства.

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 научнообосновани принципи.

В България през пелиода 1987 – 1990 г. е проведено сравнително широкомащабно морфо-етологично изследване на пчелни популации от територията на утвърдените резервати за местна пчела и в различни зоогеографски райони на България (Петров, 1990). То показва, че неконтролируемостта използване на хибридни майки и практическата невъзможност за контрол над разпространението им е довело до унищожаване на чистотата на много локални популации на българската медоносна пчела, както и че процесите на генетично замърсяване са проникнали и в микрорайоните на резерватите със запазени чисти български пчели (главно в планинската част на страната), което е катастрофална тенденция, поставяща под заплаха съхраняването и устойчивото използване на генофонда на българската медоносна пчела. Морфологичните проучвания на българската медоносна пчела сочат още, че в почти всички пониски 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 зимоустойчивост, 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

I. Социално поведение

Пчелното семейство може да съществува само при наличието на всички негови индивиди – пчелна майка, търтеи и пчели работнички. Общественият начин на живот се е утвърдил в борбата за съществуване чрез формиране на пчелни семейства, в които е налице диференциране на функциите на отделните индивиди. Пчелните индивиди се развиват от оплодени и неоплодени яйца чрез пълна метаморфоза. Медоносните пчели живеят в многочислени семейства от 15 – 20 000 до 60 – 70 000 индивида, съставени от три различни групи индивиди – пчелна майка (царица), няколкостотин търтея и десетки хиляди пчели работнички. Трите различни форми индивиди се намират в сложни биологични взаимодействия и са в тясно единство помежду си. Отделните пчели са загубили самостоятелността си и затова пчелното семейство се разглежда като обособена самостоятелна биологична единица.

Според Wilson (1982) и Dietz (1986) критерият, който определя социалността сред насекомите, е кооперирането на възрастните индивиди в гнездото, изразяващо се в проявата на грижи към пилото (ларви, какавиди), разпределението на труда на базата на репродуктивни способности и застъпването на поне две генерации от индивиди.

Основните теории, обясняващи възникването на социалното поведение при насекомите, са родова селекция, групова селекция, мутуализъм (взаимност в селекцията) и полиандрия (оплождане от повече от един търтей). Brian (1983) изказва предположението, че тези четири теории се опитват да отговорят на въпроса защо хапло-диплоидията при *Hymenoptera* като начин за детерминирането на пола е успешното начало в еволюцията на социалността (Pamilo et al., 1978).

II. Класификация на медоносните пчели

Медоносната пчела *Apis mellifera* L., 1758 е вид с огромно стопанско и екологично значение. Таксономичните данни сочат, че обикновената медоносна пчела принадлежи към разред Ципокрили (*Hymenoptera*), семейство Пчели (*Apidae*) и род Жилещи медоносни пчели (*Apis*). По съвременната класификация семейство *Apidae* обединява пет рода: *Bombus*, *Psithyrus*, *Melipona*, *Trigona* и *Apis*, живеещи както поединично, така и кооперирани в големи семейства. Към групата на социалните пчели се отнасят и медоносните пчели от род *Apis*. Първоначално на базата на класически морфометричен анализ (Ruttner, 1988) и впоследствие с помощта на молекулярно-генетични

подходи (Arias and Sheppard, 1996, 2005) медоносните пчели са групирани в три основни групи. Първата група е на т. нар. „гигантски“ пчели и към нея се отнася *Apis dorsata* с нейните подвидове. Втората група е на т. нар. „пчели джуджета“ и към нея спадат *Apis andreniformis* и *Apis florea*. Към третата група – т. нар. „кухинни“ (гнездящи в кухни) пчели, се отнасят *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis koschevnikovi* и *Apis nigrocincta*. Тази трета група включва две географски подгрупи – източна, към която спадат видовете *A. cerana*, *A. koschevnikovi* и *A. nigrocincta*, и западна, включваща вида *Apis mellifera* L. По данни на Smith et al. (2003) и Arias and Sheppard (1996, 2005), базирани на митохондриален ДНК и AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) анализи, видът *A. nigrocincta* е произлязъл от *A. cerana*.

На базата на класическа морфометрия, етологичен анализ и биогеографски проучвания са идентифицирани 26 (Ruttner, 1988) и 28 подвида (Engel, 1999), както и голям брой екотипове на *Apis mellifera*. Много изследователи разглеждат още подгрупи в рамките на вида, базирани на биогеографски, морфологични и поведенчески характеристики (Arias and Sheppard, 1996; Franck et al., 2000a; Garnery et al., 1993; Meixner et al., 1993, 1994, 2009, 2011; Kandemir et al., 2000; Bodur et al., 2007). Подробен списък на подвидовете *Apis mellifera* показва групирането им в следните групи: Близкоизточни; Тропически африкански; Западномедитеранеански; Централномедитеранеански и Югоизточноевропейски.

Към Близкоизточните подвидове се отнасят *Apis mellifera anatoliaca* Мaa (1953), *A. m. adami* Ruttner (1975), *A. m. cypria* Pollman (1879), *A. m. syriaca* Buttel-Reepen (1906), *A. m. meda* Skorikov (1929), *A. m. caucasica* Gorbachev (1916) и *A. m. armeniaca* Skorikov (1929).

Към Тропическите африкански подвидове се отнасят *Apis mellifera lamarckii* Cockerell (1906), *A. m. yemenitica* Ruttner (1975), *A. m. litorea* Smith (1961), *A. m. scutellata* Lepeletier (1836), *A. m. adansonii* Latreille (1804), *A. m. monticolo* Smith (1961), *A. m. capensis* Escholtz (1821) и *A. m. unicolor* Latreille (1804).

Към Западномедитеранеанските (т. нар. западно- и северноевропейски и северноафрикански) подвидове спадат *Apis mellifera sahariensis* Baldensperger (1924), *A. m. intermissa* Buttel-Reepen (1906), *A. m. iberica* Goetze (1964), *A. m. mellifera* Linnaeus (1758), *A. m. major* Ruttner (1978), а към Централномедитеранеанските и Югоизточноевропейските подвидове – *A. m. sicula* Montagano (1911), *A. m. ligustica* Spinola (1806), *A. m. cecropia* Kiesenwetter (1860), *A. m. macedonica* Ruttner (1987), *A. m. carnica* Pollman (1879), *A. m. iberica*

Goetze (1964), *A. m. mellifera* Linnaeus (1758), *A. m. major* Ruttner (1978) и *A. m. rutnerii* Sheppard et al. (1997).

Според Ruttner (1988) произходът на западните пчели може да бъде проследен и разпространените в Азия, Африка и Европа подвидове могат да се групират в четири еволюционни (родословни) клона. Видовете, населяващи Северна Африка и Западна Европа, се отнасят към клон М, видовете от Северносредиземноморския район – към клон С, тези от Южна и Централна Африка – към клон А, и видовете от района на Близкия изток по-късно са определени от Frank et al. (2000) като принадлежащи към четвъртия клон – О. М-клонът е най-широко разпространен в Европа – от Испания до Урал. Морфологично тези медоносни пчели се отличават с по-големите си размери и с тъмния цвят на абдомена. С-клонът включва подвидовете, разпределени навсякъде по Апенинския полуостров, Балканите, Южна Украйна, Сицилия и остров Крит. Индивидите от тези подвидове морфологически се характеризират с по-малки размери от характерните за тези при клон М, а цветът им варира от сиво до жълто. Освен това те са с по-къси четинки и по-голям кубитален индекс. Представителите на А-клона се характеризират с по-късо хоботче, малки крила, къси и тънки крака. Подвидовете от клон О са разпространени в Близкия изток, характеризират се с по-малките си размери и светлия цвят на тялото (Ruttner, 1998; Franck et al., 2000a).

Проучвания с цел класифициране на подвидове и характеризиране на популации медоносни пчели с различни местообитания са правени от много изследователи на базата на разнообразни методи, като класически морфометричен анализ (Kandemir et al., 2005; Arias et al., 2006), изoenзимен анализ (Kandemir et al., 2005; Arias et al., 2006; Ivanova et al., 2007, 2011; Ivanova, 2010), фрагментен полиморфизъм (RFLP) (Szalanski and McKern., 2007; Suazo and Hall, 2002), случайна амплификация на полиморфна ДНК (RAPD) (Suazo et al., 1998; Hunt and Page, 1992; Ivanova et al., 2004, 2008), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), анализ за генотипиране и генно картиране (Suazo and Hall, 1999; Smith et al., 2003), митохондриален ДНК анализ (Palmer et al., 2000; Smith et al., 2003, Ivanova and Bouga, 2009), микросателитен ДНК анализ (Bodur et al., 2007; Garnery et al., 1998a,b) и анализ на единичен нуклеотиден полиморфизъм – SNP (Whitfield et al., 2006).

Предвид това е установено, че обхватът на разпространение на подвида *A. mellifera mellifera* е от Алпите и Карпатите на север до 60°N, от Атлантическия бряг на Западна Европа източно отвъд Урал. В Германия, Австрия, Дания и Швеция все още съществуват местни популации, но като цяло територията им на разпространение е значи-

телно редуцирана. По-обширни популации от този подвид все още съществуват във Великобритания, Франция, Швейцария и Полша (Garnery et al., 1998a,b; Jensen et al., 2005; Strange et al., 2007; Meixner et al., 2007; Soland-Reckeweg et al., 2009).

Иберийските медоносни пчели *A. m. iberiensis* се срещат в Испания, Португалия и на Балеарските острови (Radloff et al., 2001; De la Rúa et al., 2002; 2003). Популации иберийски медоносни пчели все още са широко разпространени в тези територии, но в тях се отчита вече и присъствието на подвида *A. m. ligustica*.

В контраст на описаните тенденции за намаляване на популациите на *A. m. mellifera* и *A. m. iberiensis*, двата подвида – *A. m. ligustica* от Италия и *A. m. carnica* от Карниолския район (Крайна и Каринтия – Южни и Източни Алпи), оказвайки се много атрактивни за пчеларството, са увеличили значително своя обхват на разпространение. Естественят ареал на присъствие на италианските пчели *A. m. ligustica* е Апенинският полуостров, включващ територията от Алпите до Средиземно море. Franck et al. (2000) на базата на молекулярно-генетичен анализ предлага маркери за характеризиране на произхода им. Източноевропейският подвид *A. m. carnica* е разпространен в Австрия, Чехия, Словакия, Унгария, Румъния, Сърбия, Хърватия, Босна и Херцеговина, Полша и Германия (Meixner et al., 2009). Морфологически пчелите от този подвид се определят по сиво-кафявата окраска и наличието на светли ивици по тялото. Телата им са по-издължени и слаби, а хоботчетата – много дълги (Rinderer, 1986).

A. m. macedonica заема ареал в Източна Европа от Североизточна Гърция и България до Украйна (Meixner et al., 2010). По данни на Uzunov (2007) автентични популации на този подвид съществуват в Република Македония. В по-нови изследвания на Uzunov et al. (2014) се прави сравнителен анализ на популации *A. m. macedonica* от територията на Балканите, като се обсъждат и някои характерни особености на изследваните популации, позволяващи дискусии относно съществуването на отделни екотипове на този подвид. Обсъжда се и хипотезата за съществуването на местен подвид или екотип пчели, обозначен от Петров (1990, 1993, 2013) като *A. m. rodopica*. Наименованието „*A. m. rodopica*“ е посочено като синоним на *A. m. macedonica* от Engel (1999), който прави ревизия на таксономията на род *Apis*. В неговата монография под № 16 в ревизираната класификация на *Apis mellifera* е отбелязано, че *Apis mellifera rodopica* е нов синоним на *Apis mellifera macedonica* (Engel, 1999). Проучванията сочат, че популации на подвида *A. m. macedonica* могат да се открият освен в България и Македония, още по черноморското крайбрежие на Румъния, в Източ-

на Сърбия и в Северна Гърция. Според Ruttner (1988) *A. m. macedonica*, разпространена в Югоизточна Европа, и *A. m. sicula (siciliana)*, разпространена в централния Средиземноморския регион и Северна Африка, показват някои морфометрични прилики със Западните популации на *A. m. anatoliaca*. Поради тази причина Bodur et al. (2007) определят областта на Анадола, където е естественият ареал на разпространение на *A. m. Anatoliaca*, като Източен генетичен център на *A. mellifera*. Подвидът *A. m. cecropia* е разпространен на юг в цяла Южна Гърция, включително Пелопонес, и по някои острови могат да се открият все още чисти популации.

Въпреки морфологичните различия между подвидовете *A. m. adami* и *A. m. cypria* не са намерени други доказателства, базирани на ензимен и митохондриален ДНК анализ за разграничаването им (Bouga et al., 2005a, b).

Географската изолация на средиземноморските острови, чийто климат се характеризира с мека и дъждовна зима и сухо лято, е довела до диференцирането на локално адаптираните подвидове *A. m. siciliana* в Сицилия (Sinacori et al., 1998), *A. m. ruttneri* в Малта (Sheppard et al., 1997), *A. m. cypria* в Кипър (Ruttner 1988, Kandemir et al., 2006) и *A. m. adami* в Крит (Ruttner, 1980). Консервационният статус на тези пчели трябва да се разглежда като застрашен, в частност обхватът на *A. m. siciliana* е редуциран до няколко острова около главния остров Сицилия (Dall'Olio et al., 2008).

Подвидът *A. m. caucasica* е разпространен в Североизточна Анатолия (Kandemir et al., 2000) и също така се среща на територията на цяла Грузия до Азербайджан. Пчелите от този подвид са с най-дългото хоботче сред всички представители на *A. mellifera*. Тялото им е покрито с къси власинки и цветът му варира (Ruttner, 1988).

Данните, характеризиращи отделните еволюционни клонове, както и различните подвидове на *Apis mellifera*, се обогатяват непрестанно предвид прилагането на разнообразни подходи на генетични изследвания. Понастоящем посочените еволюционни клонове и подвидове медоносни пчели биха могли да се разграничат и на базата на митохондриални хаплотипове, както и на базата на проучвания, базирани на микросателитен ДНК анализ (De La Rúa et al., 2005, 2009). В това направление българската медоносна пчела е характеризирана популационно-генетично единствено в проучвания на Ivanova and Bouga (2009), Ivanova et al. (2010), Nikolova (2011), Nikolova and Ivanova (2012). Допълнителни задълбочени изследвания на местните български популации на подвида *A. m. macedonica*, базирани на комплексни генетични подходи, ще допринесат за обогатя-

тяване, детайлизиране и прецизиране както на неговите характеристики, така и на еволюционния клон С, към който той принадлежи.

III. Проучвания на генетичната изменчивост при *Apis mellifera* L. чрез прилагане на методите за протеинов и изoenзимен анализ

При изучаване на молекулните основи на развитието на организмите съществено място заемат онтогенетичните изследвания на белтъчните системи. Различните протеиновы системи намират широко приложение като високочувствителни маркери при разкриване на характерните особености на диференциация и развитие на организма. Те са индикатори на генната експресия. На всеки етап от онтогенезата съответства характерен набор от ензимни и неензимни протеини. Така промяната в експресията на гените в хода на онтогенезата определя и изменението на белтъчния профил.

Още през 1980 г. Pichot and Pichot, правейки обзор на биохимичния полиморфизъм в популациите, подчертават възможността за използване на електрофорезата като удачен метод за популационно-генетични проучвания и за анализ на полиморфизма в контекста на еволюционните промени, географските различия, а също и по отношение на генетични заболявания.

През 1982 г. Klausnitzer определя като особено перспективни при диагностика на различни видове насекоми анализи на белтъци и изoenзими, базирани на разнообразни електрофоретични методи. Той акцентува върху тезата, че за обективните проучвания е необходимо да се уточнят влиянието на пола, стадиите на развитие, сезонът и други фактори.

В този аспект чрез електрофореза в полиакриламиден гел Иванова (1996) изследва разтворимите протеини при медоносни пчели от двата пола и установява наличие на полиморфизъм с действие на нулев алел при един от анализираните локуси, а чрез методите на електрофореза в скорбелен и ПААГ и изоелектрично фокусиране в тънък и ултратънък ПААГ установява различия в електрофоретичната изява и контрола на общите разтворими белтъци при *Apis mellifera* както в хода на индивидуалното развитие, така и в зависимост от пола на индивидите. В поредица от публикации Ivanova (2003), Ivanova et al. (2000, 2001), Ivanova and Staykova (2005) констатира и характеризират установената органна, тъканната и стадийната специфичност в изявата на общите водноразтворими протеини при мъжки и женски индивиди на *Apis mellifera*.

От особен интерес за нуждите на популационната генетика са изследванията върху различни изоензимни системи.

Генетично детерминираните множествени молекулни форми на един и същ ензим, отличаващи се по първична структура, се наричат изоензими (Hunter and Markert, 1957; Markert and Hunter, 1959). Отначало понятието „изоензим“ е носело чисто оперативен характер и „изоензими“ се наричали които и да са множествени фракции, изявиени при проучване на един и същ индивид, характеризиращи се с обща субстрактна специфичност (Shaw, 1965; Markert, 1968; Корочкин, 1977). Сега на това определение се придава генетически смисъл и под изоензими се разбират генетически детерминирани варианти на един и същ ензим в един организъм, характеризиращи се със сходна субстрактна специфичност (Корочкин, 1977). Изоензимите, проявени с помощта на зонална електрофореза, по мнение на Hubby and Lewontin (1966) са идеални маркери на алелните замествания. Това е така, защото при електрофореза се проявяват само тези варианти, които довеждат до изменение на заряда на белтъчната молекула, а те съставляват около 33% от всички възможни мутации, което е достатъчно за популационните изследвания (Neel et al., 1980; Ramshow et al., 1979; Алтухов, 1989).

Немалък брой изоензимни системи при медоносните пчели са били обект на изследване от редица автори с оглед на възможностите за откриване на популационно-генетични маркери и провеждането на задълбочени популационно-генетични сравнения и анализи. Установено е, че особено подходящи за генетичен анализ на популации от *Apis mellifera* са такива ензимни групи, като MDH, ME, EST, HK, PGM, ALP, SOD и др. Хронологията на проучвания върху различни изоензимни системи при медоносните пчели може да се проследи и на базата на това да се направят изводи относно постигнатите резултати и направените заключения, както и относно възможностите за по-нататъшни изследвания и сравнителни анализи.

Сред най-проучваните ензимни системи са малатдехидрогеназите (MDH). Прегледът на литературните данни относно проучвания върху тази група изоензими при *Apis mellifera* показва следното: през 1979 г. Cornuout изследва MDH при медоносни пчели от Гваделупа и установява наличие на полиморфизъм с триалелна система на унаследяване по един малатдехидрогеназен локус. По-късно Garstidae (1980) изследва имагинални форми на *Apis mellifera* от Австралия и Южна Африка и констатира полиморфизъм също по един MDH-локус (MDH-1), като изчислява и алелните честоти на установените алелни варианти. Shepard and Berlocher (1984) потвърждават констатирания поли-

морфизъм по един MDH-локус, а Nunamaker et al. (1984) съобщават, че изоензимите на MDH при видовете *Apis florea*, *Apis dorsata* и *Apis cerana* не могат да се използват като биохимични маркери за видовото им разграничаване. Shao Wen Li et al. (1988) установяват, че друг MDH-локус, различен от по-рано проучвания, е полиморфен при *Apis mellifera* за разлика от *Apis cerana*. Page and Metcalf (1988) правят популационно-генетична оценка на MDH-1 локуса при *Apis mellifera*, разпространена в Калифорния, и не констатираат значителни отклонения от очакваното по закона на Харди – Вайнберг. Те установяват, че честотата на срещане на установените три алела на MDH-1 локуса са 0.77, 0.08 и 0.16, което значително се отличава от характерните честоти на тези алели за популациите африкански медоносни пчели в Бразилия. Shepard (1988) анализира малатдехидрогеназния полиморфизъм в популации медоносни пчели от Северна Америка и Европа и констатира различия както по отношение на броя на алелите, така и по отношение на тяхната честота. За полиморфизъм по MDH-1 локуса при медоносните пчели от различни райони на света съобщават също Biasiolo and Camparini (1989, 1991) и Del Lama et al. (1990). Ju-Ruai Li et al. (1992) описват различия в честотата на срещане на алелите на MDH-1 при три подвида на *Apis mellifera* – *A. m. ligustica*, *A. m. cerana*, *A. m. carpatica*. Те описват, че в електрофоретичния профил са проявени три основни зони на активност на този ензим, които се кодират от три алела – a, b и c. Авторите съобщават за наличието на шест генотипа: a/a; b/b; c/c; a/b; a/c; b/c. Ivanova et al. (1994) съобщават за наличие на полиморфизъм по два MDH локуса при ларвни форми на медоносни пчели, разпространени в България. По-късно чрез използване на електрофореза в ПААГ и СГ Иванова (1996) описва наличието на общо четири полиморфни малатдехидрогеназни локуса, действието на които може да се проследи в хода на онтогенезата при медоносните пчели. По-късно Ivanova (2004) описва и установена динамика в експресията на MDH-1 локуса в органи на мъжки имагинални форми *Apis mellifera* L.

Полиморфизъм по MDH-1 локуса при пчелни популации в Гърция е проучван от Badino et al. (1988) и от Bouga et al. (2005), а в България – от Иванова (1996), Ivanova et al. (1998, 2004, 2007) и Popov et al. (2000). За територията на Турция Kandemir и Kence (1995) и Kandemir et al. (2000, 2005) описват нови алелни варианти на този локус. Полиморфизмът по MDH-1 локуса, както и възможностите за използването му в сравнителни популационно-генетични анализи на популации медоносни пчели от Европа е обект на изследване и в последващи проучвания на Ivanova (2010, 2015), Ivanova et al. (2010a, b, 2011, 2012a, b), Peševa et al. (2015).

Проучванията върху малатензимите (МЕ) при медоносните пчели са насочени главно към изучаване на полиморфизма им в различни популации, както и на възможностите за използването му при между-видови и вътревидови сравнения. Първоначално малатензимният локус е смятан за мономорфен, но през 1984 г. Sheppard and Berlocher анализират изявен полиморфизъм по него. По-късно в свое проучване Shao Wen Li et al. (1988) отново съобщават, че локусът, контролиращ синтеза на малатензима, е мономорфен за проучваните от тях популации на видовете *Apis mellifera* и *Apis cerana*. Camparini and Biasiolo (1991), базирайки се на данни от проучвания на подвидовете *A. m. ligustica* и *A. m. carnica*, съобщават за наличието на полиморфизъм по малатензимния локус, с което потвърждават данните на Sheppard and Berlocher (1984). Ivanova (1998) разглежда изявата на малатензима в хода на онтогенезата на медоносните пчели, а Popov et al. (2000) коментират двуалелен полиморфизъм по този локус за изучаваните популации медоносни пчели в България. В поредица от свои изследвания върху изоензимния полиморфизъм в Турция Kandemir and Kence (1995), Kandemir et al. (2000), Kandemir et al. (2005) съобщават за липса на полиморфизъм по малатензимния локус и правят заключението, че това е инвариантна система за турските популации медоносни пчели. Сходни на тези резултати са и публикуваните от Dedej et al. (1996) данни относно МЕ локуса, както и направеното заключение, че този локус не е полиморфен в генофонда на изследваните балкански популации. В свои изследвания обаче Bouga et al. (2005b) анализират популации от медоносни пчели, обитаващи различни райони на Гърция, и установяват полиморфизъм по МЕ локуса с наличие на два алела – МЕ-100 и МЕ-79. В своите сравнителни изследвания Ivanova (2010, 2015), Ivanova et al. (2010a, b, 2011, 2012a, b) потвърждават наличието на полиморфизъм по МЕ локуса и коментират възможностите за използването му при сравнителни междупопулационни анализи.

Krieg and Marek (1983) изследват промени в естеразния спектър на хемолимфата при медоносните пчели и описват пет естеразни изоензима. Bitondi and Mestriner (1983) чрез електрофореза в скорбелен гел констатираат наличието на 6 естеразни изоензима и посочват, че EST-1, EST-2 и EST-4 не се изменят в хода на онтогенезата на *Apis mellifera* за разлика от EST-3, EST-5 и EST-6, а също и че някои от ензимите се контролират от гени с повече от едно алелно състояние. Чрез електрофоретично фокусиране в ПААГ Nunamaker et al. (1984) изучават изоензимите на неспецифичните естерази при видовете *Apis florea*, *Apis dorsata* и *Apis cerana* и отчитат, че естеразните изоензими

могат да се използват като биохимико-генетични маркери за разграничаване на трите вида пчели за разлика от други изоензимни системи. Seppard and Berlocher (1984) установяват полиморфизъм по един естеразен локус при пчели работнички от популации на *Apis mellifera ligustica* от Италия и отбелязват, че тази изменчивост не е била известна по-рано за местната италианска пчела. Del Lama et al. (1985) чрез електрофореза в агарозен гел констатира полиморфизъм по EST-5 локуса при изследваните популации на *Apis mellifera*. Авторите отбелязват съществуването на нов алел – EST 5N, чиято честота на срещане при африканските пчели в Бразилия е 0.035. Shao Wen Li et al. (1985) с помощта на изоелектрично фокусиране в ПААГ изследват естеразния комплекс при видовете *Apis mellifera* и *Apis cerana* и описват съществени различия в отделните стадии на развитие на *Apis mellifera*. В по-късни свои изследвания същите автори информират, че EST IV локусът е полиморфен в популациите на *Apis mellifera* за разлика от тези на *Apis cerana*, където подобна изменчивост не е констатирана (Shao Wen Li et al., 1988). Волкова и др. (1985) чрез електрофореза в тънък ПААГ описват полиморфизъм по естеразните изоензими на нервната тъкан при пчелите от средноруската порода и коментират перспективите за неговото използване в селекцията им, а по-късно (Волкова и др., 1987) констатира изява на една високо активна форма на карбоксилестераза. Те установяват също, че при избор на пчели от средноруската порода по плодовитост на майката и зимоустойчивост на дъщерните поколения се съхранява изходното ниво на холинестеразата и не се изменя естеразният спектър.

Shao Wen Li et al. (1988) информират за наличие на полиморфизъм по EST-4 локуса в изследваните от тях популации на *Apis mellifera*. Наличие на полиморфизъм по EST-3 и EST-6 локусите при *Apis mellifera* е описан по-късно от Biasiolo and Camparini (1989). Del Lama et al. (1990) изследват популации медоносни пчели от Бразилия, Централна Америка и Европа и констатира наличието на полиморфизъм по EST-1 и EST-3 локусите, като обръщат внимание на факта, че EST-1 не е полиморфен в генофонда на популации медоносни пчели от Италия и Германия. Camparini and Biasiolo (1991) обсъждат възможността за идентифициране на подвидовете *A. m. ligustica* и *A. m. carnica* на базата на анализ на изоензимната изменчивост, като съобщават за полиморфизъм по пет локуса, сред които са и естеразните локуси EST-3 и EST-6. Иванова (1996) прави електрофоретични изследвания на естеразите в популации медоносни пчели от България и анализира изявата на шест естеразни локуса в хода на онтогенезата.

Figueiredo et al. (1996) чрез хоризонтална електрофореза в 13.5% скорбелен гел изследват естеразни фенотипове при медоносни пчели от три африкански линии (потомци на междувидови кръстоски, произлизащи от Европа и Африка) и установяват различия в естеразния спектър в хода на онтогенезата от 6-часови ларви до 24-дневни имагинални форми, а Иванова (1996) съобщава за наличие на стадийна, органна и тъканна специфичност в изявата на естеразните изоензими в ларвен, предкакавиден и имагинален стадий от онтогенезата на медоносните пчели. Kandemir and Kence (1995) характеризират естеразния полиморфизъм в генофонда на популации медоносни пчели от Централна Анатолия и описват наличието на три алела по отношение на EST-3 локуса. Smith and Clenn (1995) анализират естеразния полиморфизъм при *Apis mellifera iberica* заедно с полиморфизма по още седем ензимни гена. По данни на Ivanova et al. от 2004 г. относно полиморфизма по EST-3 локуса EST-3¹⁰⁰ алелът е фиксиран в генофонда на изследваните популации от Родопите и честотата на срещането му в проучваните тракийски райони на България е също висока (0.96). Констатирани са различия в полиморфизма по този локус (EST-3) за тракийските райони на България и Турция (Ivanova et al., 2004). В по-късни проучвания на Ivanova et al. (2007, 2011, 2012a и b) е описан полиморфизъм по EST3-локуса с наличие на два до пет алелни варианта в генофонда на изследваните европейски популации.

Макар и по-слабо проучени при медоносните пчели, алкалните фосфатази са с потенциал за характеризиране на популационно-генетични особености. Анализът на литературните данни сочи, че полиморфизмът по ALP-локуса не е проучен достатъчно. По данни на Bouga et al. (2005b) ALP-локусът е полиморфен с двуалелна система на унаследяване. В проучването, включващо изследване на шест популации медоносни пчели от различни райони на Гърция, са описани два алела на този локус – ALP-100 и ALP-80. Само в една от тях локусът е бил мономорфен. В поредица от проучвания на популации медоносни пчели от България, Балканския полуостров и други райони на Европа Ivanova et al. (2007, 2011, 2012a и b) и Ivanova (2010, 2015) проучват и характеризират констатирания полиморфизъм по ALP-локуса. Те установяват наличието на три алела и обсъждат възможността особеностите на полиморфизма по ALP-локуса да се използват като маркери за характеризиране на генетичната изменчивост в проучваните пчелни популации.

Фосфоглюкомутазиите при *Apis mellifera* са проучвани с оглед на характеризиране на потенциала им за прилагане в популационно-генетични анализи. В своите изследвания върху тази ензимна система

Mestriner and Contel (1972), Brueckner (1974), Contel et al. (1977), Nunamaker and Wilson (1980), Badino et al. (1983) и Sheppard and Berlocher (1985) не констатираха наличие на полиморфизъм. За първи път Del Lama et al. (1985, 1990) чрез електрофореза в агарозен гел описват триалелна система за унаследяване по PGM-1 локуса при популации на африканизирани медоносни пчели и двуалелна система – за популации от подвида *A. m. carnica*. Тази изменчивост е потвърдена от Camparini and Biasiolo (1991) и по отношение на анализирани от тях популации медоносни пчели. Meixner et al. (1994) описват три алела на PGM локуса, обръщайки внимание на факта, че PGM¹²⁰ алелът е бил непознат до този момент. Данни за полиморфизъм по PGM локуса в популации медоносни пчели от Турция присъстват в работите на Kandemir et al. (2000) и Kandemir et al. (2005) и в популации от България, някои балкански и европейски страни – в работите на Ivanova et al. (2004, 2007, 2011, 2012a и b).

Хексокиназата е описана като инвариантна ензимна система за медоносните пчели в Норвегия (Sheppard and Berlocher, 1984), Италия (Sheppard and Berlocher, 1985), Чехословакия (Sheppard and McPheron, 1986), Гърция (Badino et al., 1988) и Германия (Del Lama et al., 1990). Del Lama et al. (1988) изследват експресията на хексокиназата при популации медоносни пчели с различен произход, отглеждани в Бразилия (*A. m. scutellata* с африкански произход, *A. m. carnica*, произхождаща от Германия, и *A. m. ligustica*, произхождаща от Италия, САЩ и Мексико), и коментират значението на хексокиназния locus като генетичен маркер за нуждите на селекционната дейност. Del Lama et al. (1990) описват за първи път полиморфизъм с двуалелна система на унаследяване по хексокиназния locus за популации на африканизирани медоносни пчели от Бразилия и Централна Америка. По-късни изследвания на Kandemir and Kence (1995) и Kandemir et al. (2000) доказват наличието и на трети НК алел за популациите медоносни пчели в Турция. За изследваните популации *Apis mellifera* в различни райони на България, Балканския полуостров и Европа полиморфизъм по този locus (с дву- или триалелна система на унаследяване) е описан и в работите на Ivanova et al. (2007, 2010, 2011, 2012).

Данните от проведения литературен анализ сочат наличие на изследвания и по отношение на други изоензимни системи при медоносните пчели.

Проучванията върху лактатдехидрогеназите (LDH) са насочени към изучаването на стадийната специфичност в изява и различията в спектъра на индивидите от двата пола. Молодюк и др. (1980) изучават изоензимните спектри на LDH при търтеи. Сравнителният анализ на

получените от тях денситограми показва, че в мукусните жлези, скелетните мускули и семенните мехурчета на търтеите се съдържат 5 LDH фракции. Ivanova and Popov (1996 – 1997) анализират изоензимната изява на LDH в хода на онтогенезата при *Apis mellifera* и констатираат различия в зависимост от стадия на развитие, пола и фертилността на индивидите.

Сравнителни изследвания върху алкохолдехидрогеназа при популации медоносни пчели от Австралия и Южна Африка са правени от Garstidae (1980), Meixner et al. (1994), Bouga et al. (2005b). Активността на β -галактозидазата и лактазата в средното черво на *Apis mellifera* е описана от Peng-Juy Shin (1980). Del Lama and Mestriner (1984) чрез електрофореза в скорбелен гел анализират 14 вида пчели по пептидази и аминопептидази и на базата на получените резултати изказват становище, че тези ензимни системи могат да се използват като биохимични маркери за идентификация на отделни видове. Shao Wen Li et al. (1988) представят данни за контрола на изоцитратдехидрогеназа при медоносни пчели. Takenaka et al. (1990) представят данни за глюкооксидазна активност в хипофаренгиалните жлези при представители на *Apis mellifera* и констатираат динамика на същата съобразно с продължителността на живот на пчелите работнички. Biasiolo and Comparini (1991) чрез електрофореза в скорбелен гел анализират изоензимната структура на алдехидоксидазата при *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* и *A. m. sicula*, приемайки, че алдехидоксидазният локус е добър генетичен маркер при сравняване на трите подвида. Според автора тази изоензимна система се явява важно допълнение в групата на полиморфните ензимни маркери. Иванова и др. (1996) характеризират изявения полиморфизъм по два супероксиддисмутазни локуса при популации на *Apis mellifera*, разпространени в България.

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 характеризане на пчелните популации, така и с информация за генетичната им хетерогенност и филогенетичните връзки между тях.

IV. Проучвания върху генетичната изменчивост на медоносните пчели чрез методите на молекулярно-генетичния анализ

Митохондриалните ДНК маркери са широко използвани при търсене на отговори относно популационни и еволюционни въпроси, свързани с медоносните пчели.

Тези възможности за ДНК анализ са резултат от комбинацията на хаплоидността на митохондриалния геном, от една страна, и високата степен на изменчивост на някои от районите му, от друга. Това е в основата на високата разделителна способност (степен на резолюция) на метода, правеща го предпочитан при провеждането на много и разнообразни изследвания. Тъй като по своята същност митохондриалният ДНК анализ е насочен към изучаване на цитоплазмената наследственост, той демонстрира унаследяването само по майчина линия при медоносните пчели (Meusel and Moritz, 1993), което означава, че всички работнички и търтеи в пчелното семейство притежават същата митохондриална ДНК, каквато е характерна и за тяхната царица (майка).

На практика видът *A. mellifera* е първият представител на *Hymenoptera*, за който са публикувани митохондриалните ДНК последователности (Crozier and Crozier, 1993). Митохондриалният геном е изключително подходящ за популационно-генетични изследвания на *A. mellifera*, както и за филогенетични проучвания на род *Apis* като цяло, тъй като съдържа изменчиви райони с еволюционна стойност (Martimianakis et al., 2011). Митохондриалните ДНК маркери в комплекс с микросателитните са важни за разкриване и характеризиране на филогенетичните зависимости сред популациите медоносни пчели в света и немалко проучвания са базирани на тях (Garnery et al., 1993; Franck et al., 2000a, b, 2001; Meixner et al., 2000; Whitfield et al., 2006; Canovas et al., 2007, 2008).

Оценката при прилагане на митохондриалния ДНК анализ се основава на молекулярен тест, базиран на изменчивостта на митохондриалните ДНК последователности (Garnery et al., 1993). Този тест е широко използван в проучвания, засягащи биогеографското разпространение и подвидовото разграничаване сред представителите на *A. mellifera* (Garnery et al., 1992, 1993, 1998a, b; Moritz et al., 1994; De la Rúa et al., 1998; Franck et al., 1998; Palmer et al., 2000), както и за таксономични изследвания на другите видове от род *Apis* (Smith and Hagen, 1997). Причина за това е фактът, че различните хаплотипове могат да бъдат ясно отдиференцирани и поставени в митохондриални родословни клъстери съобразно с таксономичното групиране, направено от Ruttner et al. (1978) на базата на класически морфометричен анализ и представеното от Smith (1991) и Garnery et al. (1992) геог-

рафско разпространение на подвидовете на *A. mellifera* по света (Smith, 1991; Garnery et al., 1992).

Предвид това е обяснимо, че митохондриалният ДНК анализ се прилага успешно при дискриминирането на отделните подвидове на *Apis mellifera* и е база за установяване на принадлежността им към някоя от трите еволюционни линии (А, М, С), описани от Ruttner през 1988 г. (Garnery et al., 1992, Arias and Sheppard, 1996), или към по-късно предложената от Frank et al. (2000a) четвърта еволюционна линия (О). Както ядреният, така и митохондриалният ДНК полиморфизъм в родословието на *A. mellifera* са проучвани от редица изследователи (Smith et al., 1989, 1991; Garnery et al., 1993, 1995; Franck et al., 1998; Franck et al., 2000b; Franck et al., 2001; Martimianakis et al., 2011). По данни на Bouga et al. (2005b) на базата на митохондриален ДНК анализ е възможно разграничаването и на подвида *A. m. macedonica* от другите подвидове на *A. mellifera*. Освен проучванията на Ivanova and Bouga (2009) и Ivanova et al. (2010), които характеризират някои особености от митохондриалния геном на българската медоносна пчела, по-късно в изследването на Martimianakis et al. (2011), базирано на ДНК анализ по два митохондриални района, е направено сравнение на ND5 и COI генните сегменти при популации медоносни пчели от Албания, България, Кипър, Гърция, Италия, Словения и Турция и са коментирани възможностите за използване на този анализ в популационно-генетичните проучвания на *A. mellifera*.

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.

Сред набора от молекулярно-огенетични подходи за изследвания при *A. mellifera* е и т. нар. RAPD ДНК анализ (RAPD DNA – Random Amplified Polymorphic DNA – случайно амплифициране на полиморфна ДНК). По същество това е една от PCR техниките, описана за първи път от Welsh and McClelland (1990) и Williams et al. (1990), при която ДНК фрагменти се амплифицират случайно чрез произволно избрани праймери с дължина 10 бази. RAPD не изисква предварително познание за ДНК последователностите на подбрани за изследване организъм, тъй като праймерите се свързват случайно в района на секвенцията. Много изследователи използват този метод при изучаване на различни популации насекоми. Приложението му е успешно

при определяне на нивото на генетична хетерогенност, при анализ и характеризиране на особеностите на популационната структура.

Различни представители на ципокрилите са изучавани чрез прилагане на метода. O'Donnell (1996) използва RAPD подход, за да изучи и характеризира генотипния ефект при кастовата диференциация на индивидите в колонията на социалните оси *Polybia aequatorialis*. Чрез същия подход Taraves et al. (2001) изучават нежилещите пчели *Mellipona quadrifasciata*. Този вид пчели е сред важните опрашители в Бразилия и има потенциал да се превърне в предпочитан генетичен модел заради липсата на жило и възможността да се кръстосва при контролируеми лабораторни условия. Използвайки потомство от възвратно кръстосване, авторите определят подходящи RAPD маркери, като използват 79 праймера с изявата на общо 527 фракции (средно по 6.67 фракции за праймер). В резултат на това изследване са характеризирани три типа полиморфизъм, базиран на присъствие или отсъствие на фракция, интензивност на фракцията и фрагментна дължина. RAPD маркери са използвани и за изучаване на генетичните различия между двата подвида нежилещи пчели *M. q. quadrifasciata* and *M. q. anthidioides* в Бразилия, при което е доказано, че по тези показатели те са ясно разграничими (Waldschmidt et al., 2002). Чрез прилагането на RAPD анализ са проучвани и други насекоми. Posso et al. (2003) и Paduan et al. (2006) изучават нивото на генетична хетерогенност и особеностите на популационно-генетичната структура при видовете насекоми *Anopheles nuneztovari* в Колумбия и *Aedes aegypti* в Бразилия съответно. В хода на тези проучвания те установяват корелация между генетичната изменчивост и географското разстояние. Mikhailovsky et al. (2007) сравняват установената чрез RAPD метода изменчивост в групата на *Drosophila virilis* с резултатите от морфологични, цитологични и хибридологични изследвания. Те установяват, че на базата на всички тези данни *D. virilis* е еднакво генетически отдалечена от видовете в тази група. Tunca et al. (2007) използват RAPD анализ, за да определят генетичната изменчивост сред шест породи на черничевата копринена пеперуда *Bombyx mori* с различен произход.

В генетиката на медоносните пчели RAPD анализът успешно се прилага за характеризиране на популационно-генетичната структура, за изясняване на въпроси, свързани с пчелната етология, за изследване на генетичния контрол на количествени признаци, за филогенетични анализи и при тестване за бащинство.

Hunt and Page (1992) използват RAPD маркери при изучаване на наследствеността на медоносните пчели и описват четири типа полиморфизъм, базиран на присъствие или отсъствие и контрастност на

изява на фракциите, фрагментната дължина и хетеродуплексните формации.

Fondrk et al. (1993) използват RAPD метода за анализ на бащинството в едно пчелно семейство и за клъстриране на членовете на субфамилни групи.

Hunt and Page (1994) анализират половата детерминация при медоносните пчели на базата на RAPD маркери, а Kraus and Hunt (1995), прилагайки RAPD метода, обсъждат модел за коеволюция на *A. mellifera* и нейния паразит *Varroa jacobsoni*. Авторите успяват да характеризират произхода на акарите чрез RAPD маркери.

За да определи особеностите на африканските и европейските популации медоносни пчели, Suazo et al. (1998) проучват 700 RAPD праймера. На базата на проведеното изследване те успяват надеждно да разграничат изследваните популации, клъстрирайки ги в четири групи: староевропейски; новоевропейски; южноафрикански и новоафрикански. Авторите посочват и алели, които се оказват специфични маркери за разграничаване на посочените групи.

Базирайки се на RAPD анализ, Hunt et al. (1998) описват гени, свързани с жилещото поведение и с някои количествени признаци, като размера на тялото и особеностите на крилата при медоносните пчели. Те установяват наличие на няколко QTL локуса (QTL – Quantitative Trait Loci – количествени следови локуси), които афектират интензивността на жилещия отговор и повлияват размера на тялото на работничките и търтеите. Чрез RAPD маркери Chandra et al. (2001) установяват наличието на количествен локус, свързан с поведението на заучаване при пчелите.

Kence et al. (2004) и Tunca et al. (2004) изучават чрез RAPD анализ генетичната изменчивост в популации медоносни пчели от Иран, а Özdil et al. (2006) проучват генетичната структура на 16 популации медоносни пчели в Турция чрез използването на 20 различни RAPD праймера.

Ivanova et al. (2004) използват RAPD анализ, за да характеризират генетичната изменчивост при популации медоносни пчели в два различни планински региона на България и тракийските райони на България и Турция.

Заради случайния характер на амплифициране чрез произволно избрани праймери RAPD техниката не дава широки възможности за сравнителен анализ, но въпреки това се прилага самостоятелно или в комплекс с други методи при изучаване на особености на генетичната изменчивост в популациите.

Понастоящем микросателитният ДНК анализ е сред най-предпочитените подходи за изучаване на генетичната изменчивост в рамките на популациите, както и за характеризиране на филогенетичните връзки между тях.

Късите повтарящи се нуклеотидни последователности на ДНК – обикновено ди- (AT), три- (CGG) или тетрануклеотидни единици (GAGA) – са известни като микросателити или прости тандемни повторения (simple tandem repeats – STRs). Заради „приплъзване“ на ДНК по време на синтеза броят им е вариабилен. Тъй като са значително равномерно разпределени в генома, те лесно се откриват чрез PCR и поради тази причина се използват като молекулни „баркодове“. Чрез тях успешно се характеризират специфични генетични особености в популацията и затова микросателитите се използват в сравнителни популационно-генетични анализи. Микросателитите се използват също като маркери за генетично картиране, както и за доказване на генетична принадлежност. Амплифицираните чрез PCR маркери се анализират с помощта на гелна или капилярна електрофореза и откриването на специфичните алели се осъществява чрез химично оцветяване, радиоактивни или флуоресцентни маркери.

Анализирайки базата данни от тандемни повторения в геномните последователности при еукариотните организми, Beckmann and Weber (1992) установяват, че CA/TG повторенията са най-често срещаните. Авторите обобщават, че тези повторения се срещат три пъти по-често от AG/TC и два пъти по-често от AT повторенията.

Изследванията сочат, че видът и броят на микросателитите варират и са различни за отделните видове. При растенията AT са най-често срещаният тип динуклеотиди (Lagercrantz et al., 1993), а при бозайниците и при *Drosophila* GT-повторенията са с по-голяма честота (Schlötterer, 2000). Данните от Mouse Genome consortium (2002) сочат, че геномът на мишката е два до три пъти по-богат на микросателитни повторения в сравнение с човешкия. По данни на Human genome consortium (2001) микросателитните повторения в човешкия геном са 3%, а броят на микросателитните локуси е повече от един милион, като сред динуклеотидните повтори най-често срещаните са (CA)_n, а (AT)_n, (GA)_n и (GC)_n са с по-малка честота на срещане (Human genome consortium 2001; Ellegren, 2004).

За микросателитите се говори като за неутрални маркери (Arias et al., 2006; Behura, 2006), но много проучвания показват, че те участват като регулаторни или кодиращи елементи в генома на различни видове. Изследвания върху функционалната роля на микросателитите при различни видове обвързват позицията им с т.нар. „upstream“

(насрещни) локации на последователности в определения ген. Braaten et al. (1988) установяват, че мишки, плъхове и човек имат поли- (TG) upstream локации за транскрипция на рРНК, а Cavener et al. (1998) доказват, че поли- (CTGA) последователностите на локусите Gld и Ted се срещат и в трите вида *Drosophila*. Установено е също, че микросателитите имат роля в експресията на микробните гени (Van Belkum, 1999; Oliveira et al., 2006).

Литературните данни сочат, че в генома на насекомите микросателитите варират по разположение и композиции. За да характеризират микросателитните композиции при насекомите, Archak et al. (2007) изучават пълните секвенции в геномите на *Drosophila*, *Anopheles*, *Bombyx*, *Tibolium* и *Apis*. Авторите установяват, че при *Drosophila* и *Anopheles* най-често срещаните повторения са ди- и тринуклеотидни, при *Bombyx* и *Tibolium* – три- и тетрануклеотидни, и правят заключението, че късите и непълни микросателитни повторения като цяло са с висока честота в генома на насекомите. Проучването им показва, че най-голям брой комбинации от две или повече различни повторения се наблюдава при представителите на род *Apis* (6.12%). Данните сочат, че в генома на *Apis* 60% от общите микросателити са в кодиращите участъци, в генома на *Bombyx* 10% от микросателитите са в екзонните и интронните региони. Повече от 70% от микросателитите, присъстващи в екзоните, са тринуклеотидни с изключение на изследваната група видове на род *Apis*, където за екзонните региони са характерни 50% три- и 25% динуклеотидни повтори.

Редица фактори, като например брой, последователност и дължина на повторенията, фрагментации в микросателитите, скорост на рекомбинация и степен на транскрипция, оказват влияние върху микросателитната еволюционна динамика (Schlötterer, 2000).

Могат да се разгледат два модела на мутационен механизъм за микросателитите. Единият се базира на осъществяването на неравен кросинговър между хомоложни хромозоми (Eisen, 1999), въпреки че по мнение на Ellegren (2004) доказателствата за това твърдение са недостатъчни. Доказано е, че разположението на микросателитите в генома е свързано с мястото на рекомбинация, но все още не е установено сигурно съответствие между тях и честотата на осъществилия се кросинговър (Ellegren, 2004).

Вторият модел се основава на възможността за грешка в хода на репликацията, която да доведе до несъответствие между матрицата и копието в резултат на осъществила се дупликация в дадения участък. Впоследствие мястото на несъответствието с повторения ДНК фрагмент е подложено на репарация. Ако променена молекула се използва

като матрица за нови ДНК вериги, броят на микросателитните повторения ще се промени (Ellegren, 2004; Fan and Chu, 2007). Описани са два основни начина за отстраняване на този тип грешки – екзонуклеотидно коригиране и пострепликационна репарация (Eisen, 1999).

В литературата се обсъждат следните микросателитни мутационни модели: безкраен алелен модел (infinite allele model – IAM); модел на поетапна мутация (stepwise mutation model – SMM); модел на двуфазна мутация (two phase mutation model – TPM), познат още като многостепенен мутационен модел (MMM), и „алелен модел К“ (‘K’ allele model – KAM). SMM се приема за най-честия алелен модел за микросателитна мутация. Безкрайният алелен модел (IAM) е предложен от Kimura and Crow през 1964 г. и се базира на предположението, че всяка нова мутация случайно произвежда нов алел и винаги води до алелни варианти, които до този момент не са срещани в популацията (Estoup et al., 1995; Estoup et al., 2002; Oliveira et al., 2006). Този модел е известен още като нехомоплазен модел (Cornuet et al., 1999; Estoup et al., 2002). Важно е да се акцентува върху факта, че статистическата обработка на данните за определяне на междупопулационна диференциация чрез изчисляване на F_{ST} коефициента по Wright (1951) е базирана именно на IAM модела. Fan and Chu (2007), базирайки се на детайлни изследвания по отношение на микросателитните мутации, отчитат, че този модел не е съвместим с реално осъществяващия се в популациите мутационен процес.

Моделът на поетапна мутация (SMM) е предложен от Ohta and Kimura през 1973 г. и описва микросателитната мутация като резултат от загуба или получаване на единичен повтарящ се тандем (Fan and Chu, 2007). Всеки от мутиралите алели може и да не е нов за популацията, както и сходни по дължина различни алелни варианти могат да произхождат от един изходен алел, мутирал по-рано в различни посоки (Ellegren, 2004). SMM съответства на т.нар. репликационен механизъм чрез приплъзване и понастоящем се приема като основен механизъм за мутация на микросателитите (Fan et al., 2007).

Предложеният от Di Rienzo et al. през 1994 г. двуфазен модел TPM е познат още като многостепенен мутационен модел (MMM). Този модел се разглежда като продължение на SMM, тъй като е налице корелация между няколко повторения на една мутация и многостепенната мутация. Моделът се основава на мнението, че мутацията е вмъкване или загуба на X на брой повторения (Estoup and Cornuet, 1999). Ако броят на повторенията се увеличава, то и честотата на многостепенните мутации се увеличава. При приматите е констатиран преимуществено моделът на двуфазната мутация TPM. Установе-

но е, че делът на МММ в човешкия геном, включващ повтарящи се динуклеотиди, е 62.9% (Huang et al., 2002).

К-алелният модел (КАМ) е предложен от Crow and Kimura през 1970 г. Той се основава на предположението, че ако има точно K на брой възможни алелни варианти по даден локус, то вероятността на даден алел да мутира в друг е равна на $\mu/K - 1$, където μ е скоростта на мутационния процес (Estoup et al., 2002; Oliveira et al., 2006).

Определянето на генетичната дистанция е важен елемент от провеждането на популационно-генетични и еволюционни анализи.

Концепция за определяне на генетичната диференциация в популациите е предложена от Czekanowski (1909) и Pearson (1926) и е доразвита по-късно от Fisher (1936) и Mahalanobis (1936). В основата на модела на Fisher (1936) е генетичното разстояние, определено на базата на установените генни честоти. Този модел кореспондира и с концепцията за фиксационния индекс на Wright (1951).

За първи път Sanghvi (1953) предлага обоснована концепция за използването на генетичното разстояние при провеждане на еволюционен анализ, а Cavalli-Sforza and Edwards (1964, 1967) успяват да конструират еволюционно дърво, базирайки се на изчислени алелни честоти. В поредица от изследвания Nei (1971, 1972, 1978) усъвършенства методите за анализ на генетичната дистанция на базата на алелните честоти в популациите. Takezaki and Nei (1996) изработват компютърна симулационна програма за различни условия и за различни мутационни модели с цел да постигнат най-точно топографиране на родословно дърво. Предвид това на базата на установените алелни честоти е възможно да се конструират два типа родословни схеми – Neighbour-Joining (*NJ*) и Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (*UPGMA*).

Редица изследователи използват успешно микросателитния ДНК анализ за популационно-генетични изследвания при *A. mellifera*.

Estoup et al. (1993, 1995), прилагайки микросателитен анализ, констатира високо ниво на генетична изменчивост при три африкански (*A. m. intermissa*, *A. m. scutellata* и *A. m. capensis*) и четири европейски (*A. m. mellifera*, *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* и *A. m. cecropia*) подвиди на *Apis mellifera*. В проучването са установени значително по-високи средни нива на хетерозиготност и среден брой алели по отношение на африканските в сравнение с европейските подвидове. Това изследване потвърждава установеното по-рано на базата на класическа морфометрия и митохондриален ДНК анализ твърдение, че

A. mellifera еволюира в три различни, ясно диференцирани клона (еволюционни линии) – А, С и М (Estoup et al., 1995).

Използвайки именно микросателитен и митохондриален ДНК анализ, Franck et al. (2000a) изучават популации медоносни пчели от Ливан и доказват наличието и на четвърта еволюционна линия – О, различна от по-рано описаните А, М и С.

De la Rúa et al. (2002a, b; 2005; 2009) установяват на базата на проведен детайлен микросателитен анализ, че профилите на западно-европейските подвидове медоносни пчели са по-хомогенни от тези на подвидовете, населяващи територията от Испания до Скандинавия. В проучването авторите акцентуват върху някои различия, констатирани по отношение на изследваните иберийски популации. Те съобщават, че пробите, събрани от Иберийския полуостров, се оказват генетично близки по определени показатели с *A. m. intermissa* и в същото време по някои алели и ниво на хетерозиготност показват генетична близост с *A. m. mellifera*.

С цел събиране на база данни за създаване на геномна библиотека Solignac et al. (2003) изолират и проучват 550 микросателитни локуса от индивиди, принадлежащи към вида *Apis mellifera*.

De la Rúa et al. (2003) използват микросателитен анализ, за да характеризират генетичната структура на популации медоносни пчели от Балеарските острови. Те проучват еволюционните връзки между иберийските и африканските пчелни популации и констатираат, че установеният брой алели и степента на хетерозиготност демонстрират ниско ниво на генетична изменчивост в островните популации.

В по-късни свои изследвания De la Rúa et al. (2006) описват разпределението на митохондриалните хаплотипи и характеризират популационната структура на островни популации медоносни пчели чрез микросателитен анализ. На базата на получените резултати и направените обсъждания те изказват становището, че промените в генетичната структура на изследваните местни популации медоносни пчели са резултат от селекционни практики.

Микросателитен анализ е използван от Kraus et al. (2005) при определяне на числеността на колонията чрез хаплоидните мъжки индивиди.

Jensen et al. (2005) използват митохондриален и микросателитен ДНК анализ по 11 локуса, за да характеризират интрогресията на *Apis mellifera ligustica* и особеностите на генофонда в защитен район за отглеждане на *Apis mellifera mellifera*.

Чрез прилагането на микросателитен анализ Bodur et al. (2007) изследват популации медоносни пчели от Турция и Кипър. Авторите

констатирано наличие на голям брой редки алели, които биха могли да се използват като диагностични маркери при характеризиране на ясно установените различия между изследваните популации.

Dall'Olio et al. (2007) чрез използване на същия метод провеждат сравнителен анализ с цел да характеризират генетичната изменчивост в популации медоносни пчели от подвида *Apis mellifera ligustica* с произход от Италия и Сардиния. Подвидовете *Apis mellifera mellifera* и *Apis mellifera carnica*, както и получената като резултат от целенасочена хибридизация линия Buckfast са използвани за сравнение с италианските пчели. В проучването е установен богат полиморфизъм с констатиран голям брой алели и високо ниво на хетерозиготност. В същото време са констатирани ниски стойности на F_{IS} и F_{ST} , което демонстрира и ниска степен на междупопулационна изменчивост.

Чрез използването на 21 микросателитни маркера Ting and Cohong (2011) изследват полиморфизма в 20 популации на вида *Apis cerana* от територията на Китай и установяват наличието на 507 алела (средно 24.14 за локус). Авторите използват данните за алелните честоти и генетичните дистанции и установяват, че пчелните популации от територията на Източен Китай са ясно отдиференцирани от останалите, включени в изследването.

За първи път местната за България медоносна пчела е характеризирана чрез прилагане на микросателитен анализ по 9 локуса от Nikolova (2011), а Nikolova and Ivanova (2012) чрез прилагането на изoenзимен и микросателитен анализ по 9 локуса изучават генетичната изменчивост в български пчелни популации, подложени на селекционен контрол.

Обзорният преглед на методите, използвани за дискриминация на популациите медоносни пчели в Европа (Bouga et al., 2011), показва, че макар и най-предпочитан, микросателитният ДНК анализ е прилаган фрагментарно в европейските страни (основно в Дания, Франция, Германия, Италия). Частично в сравнителни анализи са включвани и проби от Хърватия, Словения и др.

Нови данни, базирани на микросателитен ДНК анализ по 25 и 24 локуса, относно генетичната изменчивост в популации медоносни пчели от територията на Балканите и Европа, включително местната за България медоносна пчела, са представени в сравнителните изследвания на Uzunov et al. (2014a) и Francis et al. (2014a) съответно.

*Направеният литературен преглед показва, че микросателитният ДНК анализ се прилага все по-широко при изучаване на 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 на особеностите на генетичната изменчивост сред популациите медоносни пчели в България, за характеризиране на таксономичния им подвидов 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 подвидова 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 на особеностите на генетично детерминирания полиморфизъм в популации *Apis mellifera macedonica* от територията на България чрез изоензимен анализ и характеризиране на степента на вътрепопулационна и междупопулационна генетична изменчивост по шест алоензимни системи – малатдехидрогенази, малатензими, 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 характеризиране на степента на генетична диференциация по шестте подбрани локуса (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, характеризиране на степента на генетичната им изменчивост по три генни сегмента на митохондриалната ДНК – 16s rDNA, COI и ND5, и обсъждане на 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, Гърция и Република Македония и в 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 характеризиране на състава на генофонда и степента на генетична диференциация;

5. Анализирание 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 на възможностите за разграничаване на популациите *Apis mellifera macedonica* от България, Гърция и Република Македония, както на подвида *Apis mellifera macedonica* от другите включени 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

Проби, местонахождения и пробосъбиране

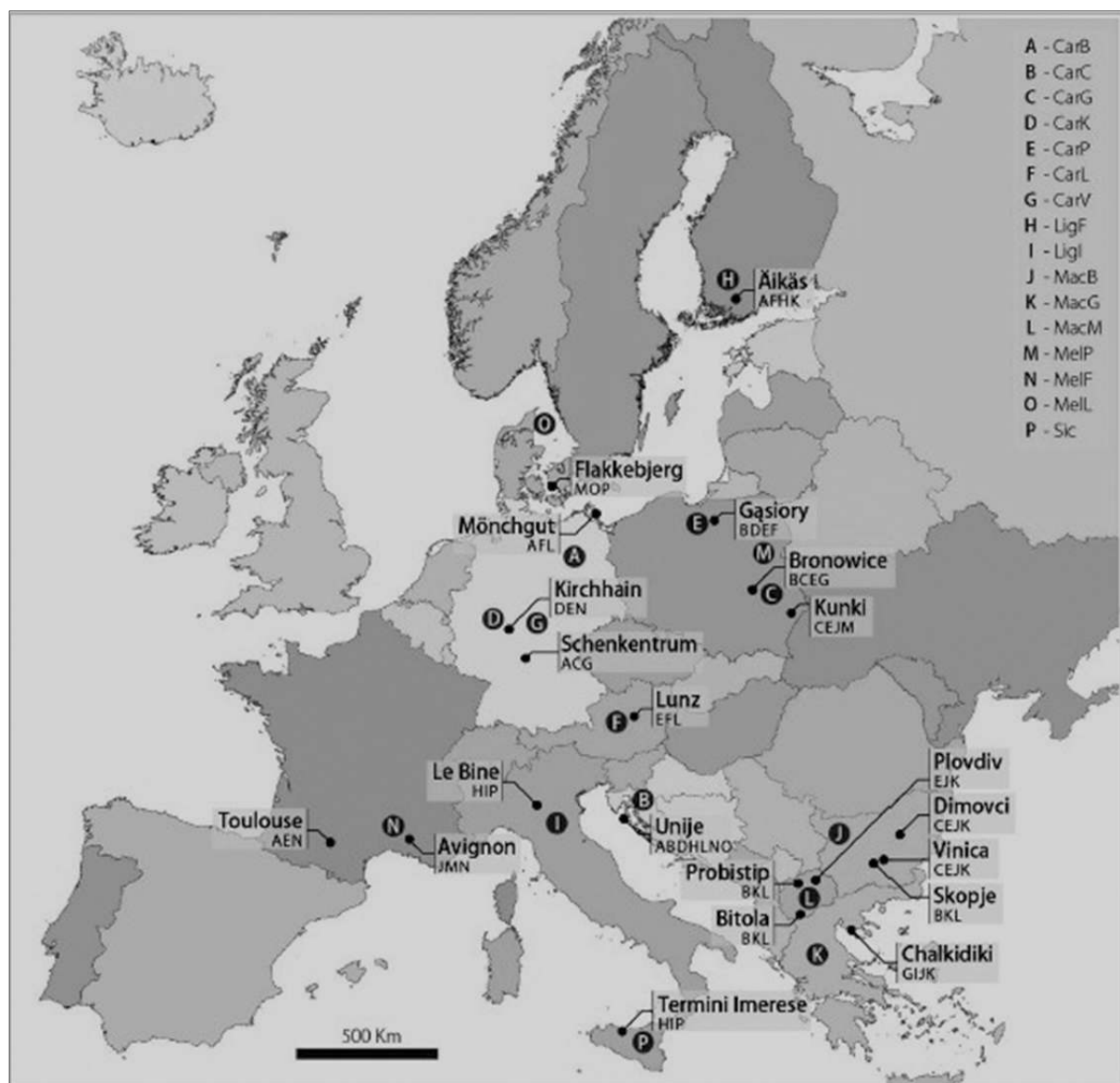
За нуждите на алоензимното изследване бяха използвани женски имагинални форми (пчели работнички) от 108 български популации медоносни пчели с местонахождения в 24 района на територията на цялата страна (Таблица 1), както и от популации, разпознати на базата на класически морфометричен анализ (Ruttner, 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) наименование). 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 научноизследователски центрове в България и Европа, както следва: *A. m. macedonica* с произход България – Научна база по пчеларство на Аграрния 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 Скопския университет; *A. m. carnica* – Пчеларски бази Врач и Вране на Белградския университет, Сърбия, пчеларски бази Бело поле и Сутоморе, Черна гора, Институт по пчеларство – Кирхайн и Вейтшоохам, Германия, Австрийска „*carnica*“ асоциация, Лунц, Австрия, Научни бази по пчеларство – Пулави и Олстин, Полша, и Пчеларска база „Уние“ при Аграрния факултет на Загребския университет, Хърватия; *A. m. ligustica* – Научна база по пчеларство – Болоня, Италия, и Изследователски институт МТТ – Агрифуд Йокиоинен, Финландия; *A. m. siciliana* – Научноизследователска 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 акция 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 – Вране; (10) Черна гора – Бело поле; (11) Черна гора – Сутоморе; (12) Република Македония – Скопие; (13) Румъния – Букурещ.

Източник: www.geographic.org, използвана с разрешение



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

На фигурата е отбелязано, че в експеримента са включени пчелни популации от общо 21 тестлокации от територията на 11 европейски държави. Имената на локациите са показани в светлото поле в горния десен ъгъл. С буквени символи са обозначени анализираните европейски подвидове и произходи медоносни пчели. Местоположението им е обозначено в картата с тъмни кръгове и съответни буквени инициали. В долната дясна част на картата са обозначени и тестлокациите в България – Пловдив, Димовци и Винаца (Francis et al., 2014a).

Таблица 1. Местоположения на изследваните български *A. m. macedonica* популации по области и райони с указана надморска височина и географски координати

Район	Област	Популация	Географски координати Север / изток	Надм. вис.
Североизточен	Варна	с. Близнаци	43.06094/ 27.86810	69
		гр. Бяла	42.87990/ 27.86810	99
		с. Генерал Киселово	43.46463/ 27.59947	201
	Добрич	с. Пчеларово	43.72643/ 27.91873	227
		с. Росица	43.94517/ 27.89573	200
		с. Раковски	43.48807/ 28.40750	99
	Шумен	с. Кочово	43.22001/ 26.80047	195
		с. Цани Гинчево	43.61106/ 27.28257	235
	Разград	с. Крояч	43.38608/ 26.66090	305
	Търговище	с. Еленово	43.41212/ 26.39945	492
		с. Тъпчилешово	43.12174/ 26.46252	199
		с. Ралица – акациите	43.30429/ 26.51674	199
		с. Ловец – гората	43.26168/ 26.69180	205
		м. Фисек	43.32071/ 26.73691	499
		м. Партизанска поляна	43.26667/ 26.7	199
		с. Мировец	43.3758/ 26.69283	316
		с. Билайн	43.24713/ 26.57282	180

Северен централен	Русе	с. Батин	43.65585/ 25.67955	99
		с. Копривец	43.40902/ 25.87967	199
		с. Бъзовец	43.63066/ 23.55552	199
		с. Писанец	43.67099/ 26.17357	135
	Велико Търново	с. Вардим	43.61429/ 25.45835	47
		с. Петко Каравелово	43.30118/ 25.64305	101
		гр. Дебелец	43.04364/ 25.62107	244
		с. Клъшка река	42.81223/ 25.61605	516
		с. Морава	43.45343/ 25.21535	99
	Плевен	гр. Белене – блатото	43.66666/ 25.16666	5
		с. Божурлук	43.53570/ 25.18242	99
		с. Кулина вода	43.59081/ 25.03588	107
		гр. Пордим	43.37798/ 24.84764	183
		с. Ралево	43.30057/ 24.60234	216
	Ловеч	с. Борима	42.97402/ 24.58223	491
		гр. Ловеч	43.13484/ 24.71726	
		гр. Ловеч – Печковец	43.12354/ 24.69383	200
		Липака – Ловеч	43.136950/ 24.714190	200
		с. Дъбен	43.13167/ 24.21541	266
		с. Катунец	43.20415/ 24.50361	299
Северозападен	Видин	гр. Димово	43.74151/ 22.72712	199
		с. Дреновец	43.69338/ 22.98176	194
	Монтана	с. Сливовик	43.59685/ 23.11686	199
		с. Черешовица	43.26046/ 23.03861	497

Югозападен	Благоевград	с. Тополница	41.40458/ 23.32318	99
		с. Гайтаниново	41.45146/ 23.71424	726
		с. Горна Брезница	41.74361/ 23.11616	477
		с. Ключ	41.36404/ 23.01717	466
		с. Раздол	41.61579/ 23.00877	1061
		с. Туховища	41.49852/ 24.04406	796
		с. Селище	41.99639/ 22.99883	502
		с. Жижево	41.55165/ 24.02883	813
		с. Бистрица	42.06954/ 23.14926	889
		с. Илинден	41.4644/ 23.7982	621
	Кюстендил	с. Гюешево	42.23877/ 22.47613	998
		с. Горно Уйно	42.45090/ 22.57404	746
		с. Илия	42.07305/ 22.81214	964
		с. Пиперево	42.28966/ 23.11601	601
		с. Сабляр	42.15139/ 22.79472	
		с. Еремия	42.20632/ 22.8407	
	Перник	с. Туроковци	42.82510/ 22.60207	807
		с. Горна Мелна	42.72409/ 22.51498	1098
		гр. Трън	42.83434/ 22.65038	800
	София	гр. Костинброд	42.81841/ 23.22497	600

Южен централен	Смолян	гр. Златоград	41.37984/ 25.09652	497
		с. Смилян	41.50558/ 24.73971	836
		с. Любча	41.62031/ 24.09738	1100
		с. Върбина	41.55939/ 24.97282	828
		гр. Смолян	41.57466/ 24.71078	1104
	Кърджали	гр. Крумовград	41.47129/ 25.65531	301
		с. Долни юруци	41.36033/ 25.92505	399
		Кърджали	41.64275/ 25.36872	289
		с. Тихомир	41.31162/ 25.49650	512
	Хасково	с. Железино	41.47804/ 25.95094	450
		с. Мандрица	41.39177/ 26.13309	100
		с. Дъбовец	41.66956/ 25.99241	199
		с. Славеево	41.53847/ 26.16504	99
		с. Мезек	41.73826/ 26.08812	202
		гр. Свиленград	41.76549/ 26.20194	82
		с. Варник	41.86722/ 26.51384	117
	Пазарджик	с. Поибрене	42.50221/ 23.99998	499
		гр. Панагюрище	42.50079/ 24.18596	600
		гр. Стрелча	42.50605/ 24.32099	500
		с. Мало Конаре	42.19728/ 24.43244	199
		гр. Септември	42.21661/ 24.12497	289
		с. Семчиново	42.17838/ 24.09638	
	Пловдив	с. Виница	42.13738/ 25.13463	181
		Гара Тракия	42.14384/ 24.74956	205
		гр. Пловдив	42.14384/ 24.74956	205

Югоизточен	Стара Загора	с. Димовци	42.85/ 25.63333	544
		гр. Чирпан	42.19956/ 25.32513	
	Бургас	с. Кости	42.05799/ 27.78004	99
		с. Велика	42.18340/ 27.78001	99
		с. Резово	41.98494/ 28.02986	4
		с. Равадиново	42.38371/ 27.66721	104
		м. Бостанлъка	42.549948, 27.505254	0
		с. Сливарово	41.96777/ 27.66445	137
		с. Граничар	42.13478/ 27.24320	303
		с. Бръшлян	42.04637/ 27.42810	394
		с. Венец	42.64006/ 26.80786	202
		гр. Бургас 1	42.50479/ 27.46264	11
		гр. Поморие	42.56805/ 27.61557	0
		гр. Китен	42.23445/ 27.77477	0
		гр. Каблешково	42.65959/ 27.56618	
		гр. Бургас 2	42.49768/ 27.47003	
	Ямбол	с. Вълча поляна	42.00936/ 26.67768	299
		с. Крайново	42.00490/ 26.86048	403
		с. Палаузово	42.53191/ 26.73965	181
		с. Странджа	42.06227/ 27.00266	438
	Сливен	гр. Сливен – НРАП	42.690590/ 26.305506	236
		гр. Сливен	42.68165/ 26.32287	234

Обработка на материала

Материалът бе доставян в Лабораторията по генетика на катедра „Биология на развитието“ и съхраняван при температура -20°C до екстрахирането му за началото на електрофоретичния експеримент. Изследвани бяха индивидуални екстракти от торакс на пчели работнички (за MDH, EST, PGM и HK ензимните системи) и индивидуални тотални екстракти (за ME и ALP ензимните системи).

В качеството на екстрахиращ разтвор бе използван трис-фосфатен буфер с рН 6.7, разреден с дестилирана вода в отношение 1:7. Центрофугирането бе проведено при режим 900 g за 20 минути.

Електрофореза в полиакриламиден гел

Електрофоретичното разделяне бе проведено по метода на Daevis (1964) и първа система на Маурер (1971) с някои модификации (Иванова, 1996) в 7.5% полиакриламиден гел. Полимеризацията протичаше в две буферни системи – трис-хлоридна с рН 8.9 и трис-фосфатна с рН 6.7. Електрофоретичното разделяне се осъществяваше в трис-глицинов буфер с рН 8.3 при температура 4°C за около 3 часа. До преминаването на фронта през концентриращия гел бе използвана сила на тока от 100 mA при напрежение 200 V, а след това – 150 mA при напрежение 300 V.

Алоензимни системи, субстрати и буфери за проявяването им

На електрофоретичен анализ бяха подложени 6 алоензимни системи: MDH, НАД-зависими малатдехидрогенази (malate dehydrogenase, EC 1.1.1.37); ME, малатензими, 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 (Phosphoglucosmutase, EC 5.4.2.2) и HK, хексокинази (Hexokinase, EC 2.7.1.1.), контролирани от 6 различни локуса (MDH-1, ME, EST-3, ALP, PGM и HK). За целите на алоензимното проучване бяха използвани стандартизирани методи (Meixner et al., 2013).

Представените по-долу фигури (3 – 16) показват използвания ключ за отчитане на установения полиморфизъм по локуси за изследваните популации.

Статистическа обработка

Алелните честоти, средният брой алели за локус, процентът на полиморфни локуси (критерий 0.95), експериментално получената (H_o) и теоретично очакваната (H_e) хетерозиготност, отклонението от генотипното равновесие по закона на Харди – Вайнберг, генетичната

дистанция по Nei (Nei, 1972) и индексът на фиксация F_{ST} (Wright, 1965) бяха изчислени 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 m (mtDNA)

Пчелните индивиди (пчели работнички) бяха събрани през лятото на 2007 г. от девет популации с местонахождения в пет района на страната, както следва: Северозападен (Сливовик и Дреновец); Северен централен (Ралево – Липака и Писанец); Югоизточен (Поморие и Китен); Южен централен (Пловдив и Поибрене) и Югозападен (Жижево) – Фигура 17.

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 с 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'-CAACATCGAGGTCGCAAACATC-3' и 3'-AGTTGGGACTATGTTTTCCATG-5' (Nielsen et al., 1994), за COI сегмента – 5'-GATTA CTTCCTCCCTCATTA-3' и 3'-AATAAGTCTGATAGGTCTAA-5' (Nielsen et al., 1995). Използваните праймери за ND5 сегмента 5'-TCGAAATGAATAGGATACAG-3' и 3'-TTAGGATTTGGTAGAGTTGG-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 MgCl₂ (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 $0.5 \times$ 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 17. Местонахождения на изследваните чрез mtDNA анализ популации *A. m. macedonica* на територията на България

III. Микросателитен ДНК анализ

Пробосъбиране и съхранение на материала

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 Скопския 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.

Българската популация на *A. m. macedonica* включваше индивиди от 32 локални популации на 18 области в страната, принадлежащи към 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°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.

Всяка проба, съдържаща изолирана торакална летателна мускулатура от по един индивид за семейство, бе поставена в епруветки тип DNeasy 96. ДНК бе екстрахирана чрез използване на DNeasyTM 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen) и съгласно посочените за прилагането му инструкции. Пробите с изолирана ДНК бяха преместени в 100 μl стерилна вода и съхранени при -20°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. Като размерен стандарт бе използван ROX500TM.

В настоящото изследване, за целите на микросателитния анализ, бяха включени 24 *A. mellifera* микросателитни локуса (Estoup et al., 1995; Solignac et al., 2003). Техните наименования и основните повтарящи се последователности са представени в Таблицы 2 и 3.

Таблица 2. Списък на анализирани 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

Генотипирането бе извършено върху 96-капилярен 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.

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

Таблица 3. Списък на микросателитните локуси и праймери. Всички стандартни праймери с изключение на локуса A014 са използвани, както е обозначено (по Estoup et al., 1995; Solignac et al., 2003). Всяка група показва праймерите, които са мултиплицирани заедно в единична реакция. Флуоресцентното багрило, с което е белязан всеки праймер, е обозначено като „Етикет“. С (*) са обозначени локусите, които са изключени от анализа. С (**) е обозначено използването на модифицирани праймери.

№	Локус	Етикет	Прав праймер (Forward) – маркиран	Обратен праймер (Reverse)
1	A008	NED	GAAGGTAAGGTAATGGAAC	TTGGCGGTAAAGTTCTGG
2	A079	FAM	GAAGGTTGCGGAGTCCTC	GTCGTCGGACCGATGCG
3	A088	VIC	CGAATTAACCGATTTGTCGTG	GATCGCAATTATTGAAGGAGTA
4	AC011	NED	TTACGCCAATCTCTCCACG	CGGTAAATTTTCGTTTCTCGC
5	AC088	VIC	CGAGGCAAGTGTTCTGCTG	ATCATCATTTCCCAAGGTGAC
6	AP224	FAM	AAGCGCACCGGAATGACG	TATGTTTCGGCCAGGCGGA
7	AP249	PET	TCGCGCGACGACGAAATG	TCCTTTGATTCGCGCTACC
8	AP274	PET	ATCCCGGTGGCCACGTC	GTCGCCACGCATAACTCG
9	A113	PET	CTCGAATCGTGGCGTCC	CTGTATTTTGCAACCTCGC
10	AC306*	FAM	GAATATGCCGCTGCCACC	TTTTCGTTGCATCCGAGCG
11	AP090	PET	GCGAAAATTGCCGGGTTATA	GCAACTTTATCGTTTCGACGT
12	AP223	PET	AATCGTACAACGTCGCGC	CCGCTCGCCTGTATCTG
13	AP226	NED	TAACGGTGTTCGCGAAACG	AGCCAACTCGTGCGGTCA
14	Ap288	FAM	GTTAGTTCGTCGTCGACCG	TCTTAGCTTTATAACGAGCACG
15	A014**	PET	ACGCGGCGATCGTAAAA	CCACCGTGCGATGACG
16	A029	NED	AAAACAGTACATTTGTGACCC	ATCAACTTCAACTGAAATCCG

17	AC087*	FAM	TCGAGGCTCGAGGCAAG	ACATTGGCCAAGCGAACG
18	AP085	PET	ATCAAACACACAAACGAAAGC	ACCGGAAGCCTAATCAAGG
19	AP273	VIC	GATCTTGTGTAAACAGCCG	ATCTCTGGCAGACGAAGAG
20	AT005*	NED	ATCCACCGGTATCCACCG	TAATCGGTTTCCACTGGCC
21	AT163	FAM	GCATTAGCATATACACGAGG	TCGGGTCTCGCAGTAACG
22	AT188	VIC	CGCATTTAGCCAACGATTAC	GAACTTTACCTCACGAACACGA
23	A024	VIC	TACACAAGTTCCAACAATGC	GCACATTGAGGATGAGCG
24	A043	FAM	CACCGAAACAAGATGCAAG	CCGCTCATTAAGATATCCG
25	AC139	NED	CCAGTGTTCACGGTAAACG	ATCATAGAGTACGCGCAAAG
26	AP015	VIC	GGGGGTAACGGAGAGAGG	TGTACGAGGCACGCAATC
27	AP068	PET	GTCTGCCCTCCTCTCTGTT	ACACATCGAGCGAGAAGGC
28	AP238*	NED	GTCTCGTGCGTGCGAATG	CATCATGTTCTCAAATTTCTTG

Статистическият анализ на получените от микросателитните тестове резултати дава възможност за характеризиране на генетичното разнообразие в изследваните популации. При реализирането му бе определен размерът на алелите и бяха изчислени алелните честоти, нивата на хетерозиготност, фиксационният индекс F_{ST} (даващ информация за степента на вътрепопулационна и междупопулационна изменчивост), отклоненията от равновесието по закона на Харди – Вайнберг, генетичната дистанция и генетичната близост по Nei (1972). За да се характеризират по-детайлно особености от генотипната структура на изучаваните популации медоносни пчели, бе използван Assignment тестът. GenAlEx v.6.42 (Peakall and Smouse, 2006), Genepop v.4.0 (Raymond and Rousset, 1995) и Arlequin v.3.11 (Excoffier et al., 2006) са най-предпочитаните софтуерни пакети за изчисления, характеризиращи популациите чрез използване на микросателити, съгласно Закона на Харди – Вайнберг. Посочените софтуери изчисляват P-стойности. В случаите, при които е възможно, се прилага и Linkage Disequilibrium Test (Lewontin and Kojima, 1960; Crow and Kimura, 1970), който улеснява някои от изчисленията по отношение на алели на два или повече локуса, които в комбинация се появяват по-често, отколкото се очаква на базата на тяхната честота в популацията (Raymond and Rousset, 1995; Freeland, 2005). Тестът за вероятност на Fisher се прилага след изготвянето на таблици за всички двойки от проучваните локуси.

В настоящото изследване статистическата обработка се извърши с помощта на софтуерния продукт GenAlEx v.6.42 (Peakall and Smouse, 2006).

Според Lewontin and Kojima (1960) и Crow and Kimura (1970) нарушаване на равновесието в популациите (Linkage Disequilibrium) може да възникне, когато алели на два или повече локуси в комбинация се появяват по-често, отколкото се очаква на базата на тяхната установена

честота. При този тест обикновено се включват два локуса, разположени близо един до друг в дадена хромозома (Freeland, 2005), а при прилагане на нулевата хипотеза, генотипове на един локус са независими от генотипове на другия локус. В настоящото проучване, съпоставянето на нарушеното равновесие между двойки алели бе изпълнено с GenAlEx v.6.42 софтуерна програма за всичките анализирани микросателитни локуси. 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.

Разработеният от Wright (1951) фиксационен индекс (F_{ST}) се използва за определяне на генетичната диференциация на популациите (субпопулациите) на базата на алелните честоти (Wright, 1951). Той варира в границата от 0 до 1. Ако две или повече популации имат еднакви алелни честоти, те няма да се различават една от друга генетично и техният F_{ST} ще е равен на 0 (без различия). Ако стойността на F_{ST} е 1, то в различните популации са фиксирани различни алели (Wright, 1951). Когато F_{ST} варира между 0 и 0.05 е налице ниско ниво на генетична диференциация, при стойности на F_{ST} между 0.05 и 0.15 генетичната диференциация се приема за умерена, а при стойности от порядъка на 0.15 – 0.25 е налице високо ниво на генетична диференциация. Нива на F_{ST} , по-високи от 0.25 ($F_{ST} > 0.25$), показват наличие на значителна генетична диференциация (Wright, 1951; Hartl and Clark, 2007).

F_{IS} и F_{IT} са инбридинг-коэффициенти и се използват за определяне на генетичната изменчивост в субпопулациите и в общата (тотална) популация (всички изследвани популации като цяло), както и за определяне на отклонението от равновесието по закона на Харди – Вайнберг. F_{IS} е показател за степента на близкородствено кръстосване. Стойностите на F_{IS} отразяват отклонението от нивото на хетерозиготност в рамките на субпопулациите и се изчисляват по Wright (1978) и Weir and Cockerham (1984), докато F_{IT} стойностите показват нивото на хетерозиготност в общата популация (сред изследваните популации като цяло) (Freeman, 2005; Nei, 1987). F_{IS} може да бъде с положителна и отрицателна стойност и варира в диапазона от -1 до $+1$. Също така, F_{IT} може да варира от -1 до $+1$ в зависимост от F_{ST} стойностите. Отрицателните стойности демонстрират излишък от хетерозиготи, а положителните стойности показват липса на такива. F_{ST} може да се изчисли самостоятелно на базата на установените алелни честоти, а F_{IS} и F_{IT} се определят на базата на изчислените генотипни честоти. В настоящото проучване F_{IS} и F_{IT} бяха изчислени с GenAlEx v.6.42 (Peakall and Smouse, 2006).

Поток на гени

За целите на планирания анализ, потокът на гени (Nm) бе изчислен с помощта на GenAlEx v.6.42 (Peakall and Smouse, 2006). Стойностите на Nm дават информация за генетичната дивергенция между популациите. Ако стойността на Nm е по-малка от 2, това означава, че е налице значителна генетична диференциация между субпопулациите (Hartl and Clarck, 2007).

Генетична дистанция

Определянето на генетичната дистанция по Nei (1972) заедно с изчислените алелни честоти бе в основата на приложени асигнационен тест.

Асигнационен тест

Асигнационният тест се прилага за изчисляване на логаритмичната вероятност за принадлежност на генотипа на всеки индивид към популацията. Тестът се базира на изчислените алелни честоти в конкретната популация и характеризира нивото на принадлежност на индивидите към съответната популация. В настоящото проучване асигнационният тестът бе направен чрез GenAlEx v.6.42 (Peakall and Smouse, 2006).

Непространствен и пространствен анализ

С цел характеризиране на формираните клъстери и подклъстери на следващ етап получените данни бяха анализирани чрез програмата STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al., 2000), основана на MCMC (Monte Carlo Markov Chain) метода за клъстриране на индивидите. На базата на определения брой клъстери STRUCTURE разпределя индивидите на случаен принцип към тях, за да намали липсата на равновесие по отношение на изследваните локуси, съгласно със закона на Харди – Вайнберг. MCMC бе проведена за 1 000 000 повторения (100 000 за период) с вариращ брой клъстери (K). При това поне 2 повторения бяха извършени, за да се провери конвергенцията (приближаването) на вероятни стойности за всяко K . Шест повторения бяха проведени за всяка стойност на K от 2 до 4. Резултатите от няколко курса за дадено K бяха използвани за линейно представяне чрез програмата CLUMPP (Jakobsson et al., 2007). Клъстрирането бе извършено на базата на 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 с 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 на 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, фертилността на част от индивидите му и дейностите, които те извършват, се характеризират с някои особености, сред които от голямо 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 сборища, където се извършва оплождането на пчелната майка (от 15 до 35 м височина), търтеите прелитат разстояния 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, чийто генофонд 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 с 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, тя е обект на изследване освен на генетиката като фундаментална наука, но и на селекцията като приложна такава. В този 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 на резултатите на други автори, макар и рядко, е употребяван и 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. неподложени 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 термина „популация X“ е използвано и наименова-

нието на конкретното местонахождение X или това на „тестлокацията X“ като равнопоставено с дадената популация.

Популациите на българската медоносна пчела *Apis mellifera macedonica*, които са под строг селекционен контрол и са 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, чийто 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 Rúa 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 гелелектрофореза резултати за алелните варианти на съответните ензимни локуси. Това е и първият метод за прилагане на ядрени молекулни маркери с цел проучвания в сферата на популационната генетика на медоносните пчели (Mestriner, 1969, Mestriner and Contel, 1972). Большинството 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 на ефекта на родоначалника (Cornuet and Fresnaye, 1979; Sheppard, 1988).

Сравнителният алоензимен анализ показва, че неголям брой локуси се характеризира 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 характеризиране, 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 за 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).

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 заключения трябва да се подхожда внимателно предвид становището, че MDH-1 locusът 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 4.

В хода на настоящото проучване на базата на електрофореза в ПААГ бе изследван полиморфизмът по всичките горепосочени 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 анализ на изявения алоензимен полиморфизъм в популации на местната медоносна пчела *Apis mellifera macedonica* по местонахождения, области и райони в България

Североизточна България

По данни на Агростатистика към МЗХ (2016) 22.4% от пчелните семейства са с местообитания на територията на Североизточна България. От този район в изследването са включени общо 15 популации от административните области Добрич, Варна, Шумен, Търговище и Разград. Биогеографски (Груев, 1988) това са популации с местообитания в Севернобългарския район – Лудогорския (области Шумен, Търговище и Разград) и Добруджанския подрайон (област Добрич), както и част от Черноморския район (област Варна).

Включените в изследването популации от територията на областите Добрич и Варна са с местообитания с надморска височина в диапазона 70 – 220 м, а от територията на областите Шумен, Търговище и Разград – с надморска височина в диапазона 200 – 500 м.

При анализа на данните от изоензимното проучване се оказва, че всички обследвани локуси са полиморфни в по-голямата част от популациите. Констатиран бе основно двуалелен и триалелен полимор-

физъм, както и фиксиране на някои от алелните варианти в част от изследваните популации – Таблицы 5 и 6.

Таблица 4. 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 с Meixner et al., 2013).

Полиморфен локус	Известни алели	Литературни източници
MDH-1 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
ME 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
EST 3 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
ALP EC 3.1.3.1	ALP80 ALP90 ALP100	Bouga et al., 2005; Ivanova, 2010; Ivanova et al., 2010a, b, c; Ivanova et al., 2011
PGM 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
HK 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

В генофонда на популациите от този район MDH-1 locusът се оказва представен от два алела – MDH-1¹⁰⁰ и MDH-1⁶⁵. Най-ниска честота на срещане на MDH-1¹⁰⁰ бе констатирана в Бяла (0.25), а най-висока – в Раковски (Добричко) – 0.818 (Таблица 5). Прави впечатление фактът, че в популациите от Североизточния район на България, разположени към вътрешността на страната (области Шумен, Търговище и Разград) – Таблица 6 – алелът MDH-1⁶⁵ бе с по-близки стойности на честотата си (0.342 – 0.636) с характерните за MDH-1¹⁰⁰ (0.364 – 0.658), докато за популациите от Добричко и Варненско разликата в честотите на срещане на двата алела варираше в значително по-широки граници – за MDH-1¹⁰⁰ – от 0.25 до 0.818, и за MDH-1⁶⁵ – от 0.182 до 0.75. В три от изследваните популации на Североизточния район – Близнаци, Ралица и Фисек, двата алела на MDH-1 locusа се срещаха с еднакви честоти (0.5).

По отношение на ME locusа бе констатиран полиморфизъм с наличие на три алела – ME⁹⁰, ME¹⁰⁰ и ME¹⁰⁶. Алелът ME⁹⁰ бе открит в генофонда само на две от изследваните популации в този район – Еленово и Ралица, с честота на срещане 0.158 и 0.1 съответно. Във всички останали популации по-често срещаният алел беше ME¹⁰⁰. Неговата честота варираше от 0.737 (в Еленово) до 1.0. Алелът се оказва фиксиран в Кочово, Тъпчилещово, Пчеларово и Близнаци. Алелът ME¹⁰⁶ бе с най-висока честота на срещане в популацията на Крояч – 0.2 (Таблицы 5 и 6).

Важно е да се отбележи преимущественото присъствие на по-редките алели EST-3⁸⁰ и EST-3⁸⁸ в генофонда на популациите от Добричко и Варненско и на по-редките алели EST-3⁹⁴ и EST-3¹¹⁸ в генофонда на популациите от Шуменско, Търговищко и Разградско.

Locusът ALP бе представен в генофонда на изследваните североизточни популации в три алелни варианта – ALP⁸⁰, ALP⁹⁰ и ALP¹⁰⁰. Алелът ALP⁸⁰ се оказва с по-висока (или най-висока) честота на срещане във всички изследвани популации на Шуменско, Търговищко и Разградско – от 0.5 (Партизанска поляна) до 0.625 (Крояч). В генофонда на Пчеларово (Добричко) и Генерал Киселово (Варненско) този алел също бе с най-висока честота на срещане (0.636 и 0.545 съответно). В популациите на Близнаци и Бяла (Варненско) двата алела ALP⁸⁰ и ALP¹⁰⁰ бяха с еднакви честоти (0.5), а в Росица и Раковски (Добричко) ALP¹⁰⁰ се оказва по-често срещаният алел (0.55 и 0.583 съответно). Алелът ALP⁹⁰ бе открит в генофонда на общо 5 от изследваните североизточни популации. Неговата честота на срещане бе от 0.045 (Партизанска поляна) до 0.222 (Фисек).

В изследваните популации от Североизточния район на България PGM локусът бе представен от два алела – PGM¹⁰⁰ и PGM¹¹⁴. Във всички популации по-често срещаният или фиксиран алел беше PGM¹⁰⁰ (0.857 – 1.0). Алелът бе фиксиран в генофонда на популациите Пчеларово, Цани Гинчево, Тъпчилещово, Фисек и Партизанска поляна. Честотата на PGM¹¹⁴ варираше от 0.042 до 0.143, като високите ѝ стойности (0.109 – 0.143) бяха характерни за всичките изследвани варненски популации (Генерал Киселово, Близнаци и Бяла), както и за популация Раковски (Добричко).

Таблица 5. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от областите Добрич и Варна

Локуси/ алели	Област Добрич			Област Варна		
	Росица	Пчеларово	Раковски	Генерал Киселово	Близнаци	Бяла
MDH-1						
65	0.409	0.458	0.182	0.304	0.5	0.75
100	0.591	0.542	0.818	0.696	0.5	0.25
ME						
100	0.88	1	0.944	0.913	1	0.962
106	0.12	0	0.056	0.087	0	0.038
EST-3						
80	0	0.109	0.048	0.045	0	0
100	1	0.891	0.929	0.932	1	0.955
88	0	0	0.024	0.023	0	0.045
ALP						
80	0.35	0.636	0.333	0.545	0.5	0.5
100	0.55	0.364	0.583	0.455	0.5	0.5
90	0.1	0	0.083	0	0	0
PGM						
100	0.957	1	0.891	0.857	0.881	0.891
114	0.043	0	0.109	0.143	0.119	0.109
HK						
87	0.063	0.036	0	0.022	0.032	0
100	0.938	0.964	0.952	0.922	0.935	1
110	0	0	0.048	0.056	0.032	0

В изследваните пчелни популации от Североизточна България бе констатиран полиморфизъм и по HK локус. Установена бе триалелна система на унаследяване с присъствие на алелите HK⁸⁷ (0.017 – 0.063), HK¹⁰⁰ и HK¹¹⁰ (0.032 – 0.056). Най-често срещаният алел бе HK¹⁰⁰ (0.922 – 1.0). В генофонда на повечето от проучваните популации присъстваха по два от констатираните алели – или HK¹⁰⁰ и HK⁸⁷

(Росица, Пчеларово, Кочово, Крояч, Еленово, Ралица, Ловец, Фисек и Партизанска поляна), или НК¹⁰⁰ и НК¹¹⁰ (Раковски, Цани Гинчево и Тъпчилещово). В генофонда на варненските популации Генерал Киселово и Близнаци бяха открити и трите алела, а в генофонда на популацията от Бяла НК¹⁰⁰ алелът се оказва фиксиран.

Таблица 6. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от областите Шумен, Разград и Търговище

Локус/ алели	Област Шумен		Област Разград	Област Търговище					
	Кочо- во	Цани Гинчево	Крояч	Еленово	Тъпчи- лещово	Ралица	Ловец	Фисек	Партизан- ска поляна
MDH-1									
65	0.583	0.342	0.455	0.462	0.636	0.5	0.455	0.5	0.545
100	0.41	0.658	0.545	0.538	0.364	0.5	0.545	0.5	0.455
ME									
100	1	0.958	0.8	0.737	1	0.9	0.826	0.87	0.909
106	0	0.042	0.2	0.105	0	0	0.174	0.13	0.091
90	0	0	0	0.158	0	0.1	0	0	0
EST-3									
80	0	0.063	0	0	0	0	0	0	0
100	0.833	0.938	1	1	1	0.955	1	0.917	0.955
118	0.167	0	0	0	0	0.045	0	0	0
94	0	0	0	0	0	0	0	0.083	0.045
ALP									
80	0.6	0.542	0.625	0.6	0.55	0.542	0.7	0.556	0.5
100	0.2	0.458	0.375	0.3	0.45	0.292	0.3	0.222	0.455
90	0.2	0	0	0.1	0	0.167	0	0.222	0.045
PGM									
100	0.958	1	0.955	0.957	1	0.957	0.958	1	1
114	0.042	0	0.045	0.043	0	0.043	0.042	0	0
НК									
87	0.047	0	0.034	0.021	0	0.021	0.034	0.017	0.017
100	0.953	0.964	0.966	0.979	0.967	0.979	0.966	0.983	0.983
110	0	0.036	0	0	0.033	0	0	0	0

Установен бе среден брой алели за локус от 1.5 (± 0.2) до 2.3 (± 0.2) и ниво на полиморфизъм от 33.3% (Тъпчилещово) до 100% (Генерал Киселово) – Таблицы 7 и 8. В болшинството популации от Търговищко (с изключение на Тъпчилещово и Фисек), в Разградско и Шуменско, както и в популациите от Пчеларово и Бяла констатира-

ното ниво на полиморфизъм бе 50%, във Фисек, Росица и Близнаци – 66.7% и в Раковски – 83.3%.

Таблица 7. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – области Варна и Добрич

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Росица	2 ± 0.3	66.7	0.291 ± 0.149	0.249 ± 0.096
Пчеларово	1.7 ± 0.2	50	0.178 ± 0.075	0.208 ± 0.094
Раковски	2.3 ± 0.2	83.3	0.239 ± 0.066	0.233 ± 0.071
Генерал Киселово	2.3 ± 0.2	100	0.266 ± 0.079	0.271 ± 0.065
Близнаци	1.8 ± 0.3	66.7	0.243 ± 0.112	0.228 ± 0.096
Бяла	1.8 ± 0.2	50	0.22 ± -0.09	0.21 ± 0.082

Таблица 8. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – области Шумен, Разград и Търговище

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Кочово	2 ± 0.3	50	0.207 ± 0.068	0.254 ± 0.097
Цани Гинчево	1.8 ± 0.2	50	0.174 ± 0.087	0.206 ± 0.089
Крояч	1.8 ± 0.2	50	0.189 ± 0.107	0.245 ± 0.09
Еленово	2.2 ± 0.3	50	0.224 ± 0.122	0.27 ± 0.104
Тъпчилещово	1.5 ± 0.2	33.3	0.216 ± 0.13	0.174 ± 0.101
Ралица	2.2 ± 0.2	50	0.198 ± 0.095	0.253 ± 0.099
Ловец	1.8 ± 0.2	50	0.189 ± 0.099	0.23 ± 0.086
Фисек	2 ± 0.3	66.7	0.271 ± 0.131	0.257 ± 0.102
Партизанска поляна	2 ± 0.3	50	0.172 ± 0.093	0.225 ± 0.099

Установените стойности на експериментално получената и очаквана хетерозиготност варираха в границите от 0.172 ± 0.093 (Партизанска поляна) до 0.291 ± 0.149 (Росица) и от 0.174 ± 0.101 (Тъпчилещово) до 0.271 ± 0.065 (Генерал Киселово) съответно.

Изчислената генетична дистанция по Nei (1972) за пчелните популации от отделните проучвани области на Североизточна България бе в границата 0.001 – 0.077 – Таблицы 9 и 10.

Таблица 9. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите пчелни популации от областите Варна и Добрич

Популация	Росица	Пчеларово	Раковски	Генерал Киселово	Близнаци	Бяла
Росица	***	0.02	0.015	0.013	0.01	0.033
Пчеларово		***	0.037	0.014	0.01	0.027
Раковски			***	0.011	0.028	0.077
Генерал Киселово				***	0.011	0.046
Близнаци					***	0.015
Бяла						***

Таблица 10. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите пчелни популации от областите Шумен, Разград и Търговище

Популация	Кочово	Цани Гинчево	Крояч	Еленово	Тъпчилещово	Ралица	Ловец	Фисек	Партизанска поляна
Кочово	***	0.03	0.027	0.024	0.017	0.009	0.023	0.011	0.018
Цани Гинчево		***	0.011	0.017	0.019	0.014	0.013	0.02	0.011
Крояч			***	0.006	0.016	0.012	0.001	0.012	0.008
Еленово				***	0.02	0.006	0.006	0.01	0.012
Тъпчилещово					***	0.012	0.018	0.019	0.004
Ралица						***	0.012	0.006	0.008
Ловец							***	0.011	0.011
Фисек								***	0.011
Партизанска поляна									***

Северна Централна България

Около 22.2% от пчелните семейства в страната са на територията на Северния централен район (МЗХ, 2016). По биогеографско райониране те обитават територии на Дунавския и Предбалканския подрайон. В настоящото изследване са включени общо 19 популации от областите Русе, Велико Търново, Плевен и Ловеч. Местообитанията на изследваните популации са в зони с надморска височина от 5 м (Белене – блатото) до 516 м (Клъшка река).

Анализът на изследваните алоензимни системи сочи, че в большинството популации е налице полиморфизъм основно с дву- или триалелна система на унаследяване. По-голям брой алели (4) бе констатиран по отношение на естеразната алоензимна система, а фиксиране на алели – в отделни популации по отношение на локусите ME (ME¹⁰⁰), EST-3 (EST-3¹⁰⁰) и PGM (PGM¹⁰⁰) – Таблицы 11 – 14.

Таблица 11. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Русе

Локус/ алели	Област Русе			
	Батин	Копривец	Бъзовец	Писанец
MDH-1				
65	0.458	0.429	0.543	0.402
100	0.542	0.571	0.45	0.598
ME				
100	0.9	1	0.971	0.923
106	0.1	0	0.029	0.077
EST-3				
100	0.958	0.977	0.978	1
118	0.042	0.023	0.022	0
ALP				
80	0.5	0.667	0.63	0.632
100	0.5	0.333	0.37	0.368
PGM				
100	0.923	0.864	0.804	0.94
114	0.077	0	0.196	0.06
125	0	0.136	0	0
HK				
87	0.036	0	0	0.023
100	0.964	0.973	0.929	0.977
110	0	0.027	0.071	0

В генофонда на изследваните популации медоносни пчели от Северна Централна България MDH-1 локусът бе представен основно от алелите MDH-1¹⁰⁰ и MDH-1⁶⁵. В ловешката популация Катунец (Таблица 14) присъстваше и трети алел – MDH-1⁸⁰, с ниска честота на срещане – 0.023. Алелите MDH-1¹⁰⁰ и MDH-1⁶⁵ бяха със сравнително сходни честоти в изследваните популации, като същите варираха от 0.273 до 0.667 – за MDH-1¹⁰⁰ алела и от 0.333 до 0.727 (Клъшка река) за MDH-1⁶⁵. Алелът MDH-1¹⁰⁰ бе с по-висока честота на срещане в общо 11 популации, представени по области, както следва: Батин, Копривец, Писанец (Русенско); Ралево (Плевенско); Дебелец, Петко Каравелово, Вардим и Морава (Великотърновско); Липака, Дъбен и Борима (Ловешко). В 8 от изследваните популации – Бъзовец (Русенско), Пордим, Кулина вода, Божурлук (Плевенско), Клъшка река (Великотърновско), Печковец и Катунец (Ловешко) MDH-1⁶⁵ бе по-често срещан се, а в популацията от Белене (Плевенско) двата алела бяха с еднаква честота (0.5).

По отношение на ME локуса в генофонда на изследваните популации бе констатирано наличието на общо 3 алела – ME⁹⁰, ME¹⁰⁰ и ME¹⁰⁶. Алелът ME¹⁰⁰ бе най-често срещан се, с честота, варираща в границата от 0.818 до 1.0. Този алел бе фиксиран в Копривец (Русенско), Кулина вода (Плевенско) и Печковец (Ловешко) и с най-ниска сравнителна честота в изследваните популации от област Велико Търново (0.818 – 0.9). Алелът ME¹⁰⁶ присъстваше в генофонда на популациите от област Русе (с изключение на Копривец), Ралево и Пордим (Плевенско), област Велико Търново (с изключение на Вардим), Катунец и Борима (Ловешко). Честотата на срещането му бе значително по-висока във великотърновските популации – от 0.1 до 0.182, за разлика от всички останали, в които варираше от 0.022 до 0.1. Алелът ME⁹⁰ бе констатиран като наличен в генофонда на плевенските популации Белене и Божурлук (0.056), великотърновската Вардим (0.15), ловешките Липака и Дъбен (0.045 и 0.1 съответно).

В генофонда на изследваните популации от Северна Централна България EST-3 locus присъстваше с общо 4 алела – EST-3¹¹⁸, EST-3¹⁰⁵, EST-3¹⁰⁰ и EST-3⁸⁰. Най-често срещаният алел във всички популации бе EST-3¹⁰⁰. Същият бе с честота от 0.727 (Клъшка река) до 1.0 и бе открит като фиксиран в популациите Писанец (Русенско), Белене, Кулина вода, Божурлук (Плевенско), Дебелец, Вардим и Морава (Великотърновско). Алелът EST-3¹¹⁸ присъстваше с честота от 0.022 до 0.5 (само в Петко Каравелово) в изследваните популации от Русенска област (с изключение на Писанец), Пордим (Плевенско), Петко Каравелово (Великотърновско) и Катунец (Ловешко).

Алелът EST-3¹⁰⁵ присъстваше в генофонда на популациите Клъшка река (Великотърновско), Дъбен и Борима (Ловешко) със значително по-висока честота – 0.273, 0.125, 0.083 съответно. Алелът EST-3⁸⁰ бе констатиран в генофонда на Ралево (Плевенско) с честота 0.082, Липака и Печковец (Ловешко) – с честота 0.083 и 0.022 съответно. В никоя от изследваните популации поотделно не бе констатирано присъствие на повече от два естерасни алела.

Таблица 12. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Велико Търново

Локус/ алели	Област Велико Търново				
	Дебелец	Петко Каравелово	Вардим	Клъшка река	Морава
MDH-1					
65	0.455	0.333	0.333	0.727	0.417
100	0.545	0.667	0.667	0.273	0.583
ME					
100	0.85	0.818	0.85	0.85	0.9
106	0.15	0.182	0	0.15	0.1
90	0	0	0.15	0	0
EST-3					
100	1	0.95	1	0.727	1
118	0	0.05	0	0	0
105	0	0	0	0.273	0
ALP					
80	0.458	0.55	0.55	0.6	0.542
100	0.417	0.45	0.45	0.4	0.458
90	0.125	0	0	0	0
PGM					
100	0.917	0.867	0.958	0.875	0.909
114	0.083	0.133	0.042	0.125	0.091
HK					
87	0.073	0.038	0.032	0.03	0
100	0.927	0.962	0.968	0.97	0.933
110	0	0	0	0	0.067

По отношение на ALP локуса в изследваните популации медоносни пчели от Северния централен район бе констатиран полиморфизъм с триалелна система на унаследяване и присъствие в генофонда на алелите ALP^{100} , ALP^{90} и ALP^{80} . В популациите Батин (Русенско) и Дъбен (Ловешко) алелите ALP^{100} и ALP^{80} присъстваха с еднаква честота (0.5). Алелът ALP^{100} се срещаше по-често единствено в генофонда на Кулина вода (Плевенско) – 0.55. Във всички останали популации по-често срещан бе алелът ALP^{80} , чиято честота варираше от 0.458 в Дебелец (Великотърновско) до 0.702 в Липака (Ловешко). Третият алел ALP^{90} бе констатиран като наличен само в генофонда на две популации – Дебелец (Великотърновско), с честота 0.125, и Борима (Ловешко), с честота 0.026.

Локусът PGM бе представен в генофонда на изследваните северни централни популации основно в две алелни състояния – PGM^{100} и PGM^{114} . По-често срещаният алел бе PGM^{100} . Неговата честота варираше в границите от 0.804 (Бъзовец, Русенско) до 1.0, като същият бе

фиксиран в Ралево (Плевенско). Алелът PGM¹¹⁴ бе с най-ниска честота – 0.038 в Кулина вода (Плевенско) и с най-висока – в Бъзовец (Русенско) – 0.196. Единствено в генофонда на русенската популация Копривец бе констатирано присъствието на различен алел – PGM¹²⁵. Неговата честота на срещане беше 0.136.

Таблица 13. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Плевен

Локус/ алели	Област Плевен				
	Белене	Ралево	Пордим	Кулина вода	Божурлук
MDH-1					
65	0.5	0.41	0.674	0.667	0.636
100	0.5	0.59	0.326	0.333	0.364
ME					
100	0.944	0.909	0.978	1	0.944
106	0	0.091	0.022	0	0
90	0.056	0	0	0	0.056
EST-3					
80	0	0.082	0	0	0
100	1	0.918	0.978	1	1
118	0	0	0.022	0	0
ALP					
80	0.65	0.7	0.511	0.45	0.563
100	0.35	0.3	0.489	0.55	0.438
PGM					
100	0.958	1	0.891	0.962	0.875
114	0.042	0	0.109	0.038	0.125
HK					
87	0.016	0.033	0	0.031	0
100	0.984	0.967	0.895	0.969	0.95
110	0	0	0.105	0	0.05

В изследваните популации от Северния централен район на България бе установен полиморфизъм и по отношение на HK locus с присъствие на три алела – HK¹¹⁰, HK¹⁰⁰ и HK⁸⁷. Във всички проучвани популации алелът HK¹⁰⁰ бе с най-висока честота на срещане, която варираше в границата от 0.895 (Пордим, Плевенско) до 0.984 (Белене, Плевенско). Алелът HK¹¹⁰ бе констатиран в генофонда на русенските популации Копривец и Бъзовец, Пордим и Божурлук (Плевенско), Морава (Великотърновско), Печковец и Катунец (Ловешко), с честота на срещане от 0.012 (Катунец) до 0.105 (Пордим). Алелът HK⁸⁷ присъстваше със сравнително ниска честота от 0.016 (Белене) до 0.073 (Дебелец) в генофонда на популациите Батин и Писанец (Русенско),

Белене, Ралево и Кулина вода (Плевенско), великотърновските популации (с изключение на Морава) и ловешките популации (с изключение на Печковец). В ловешката популация Катунец НК локусът бе представен и с трите описани алела.

Данните относно установения среден брой алели за локус и нивата на полиморфизъм и хетерозиготност са представени в Таблицы 15 – 18.

Таблица 14. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Ловеч

Локус/алели	Област Ловеч				
	Липака	Печковец	Дъбен	Катунец	Борима
MDH-1					
65	0.41	0.696	0.333	0.568	0.333
100	0.59	0.304	0.667	0.409	0.667
80	0	0	0	0.023	0
ME					
100	0.955	1	0.9	0.962	0.9
106	0	0	0	0.038	0.1
90	0.045	0	0.1	0	0
EST-3					
80	0.083	0.022	0	0	0
100	0.917	0.978	0.875	0.955	0.917
118	0	0	0	0.045	0
105	0	0	0.125	0	0.083
ALP					
80	0.702	0.511	0.5	0.583	0.579
100	0.298	0.489	0.5	0.417	0.395
90	0	0	0	0	0.026
PGM					
100	0.929	0.883	0.917	0.955	0.917
114	0.071	0.117	0.083	0.045	0.083
НК					
87	0.022	0	0.043	0.024	0.032
100	0.978	0.953	0.957	0.963	0.968
110	0	0.047	0	0.012	0

Установеният среден брой алели за локус варираше от 1.7 ± 0.2 (Кулина вода, Плевенско) до 2.3 ± 0.2 (Катунец, Ловешко). Нивото на полиморфизъм ($P = 0.95$) бе, както следва: 33% – в популациите Кулина вода (Плевенско) и Катунец (Ловешко); 50% – в Копривец (Русенско), Белене (Плевенско), Вардим (Великотърновско) и Печковец (Ловешко); 66.7% – в пчелните популации от Русенска област (с изключение

на Копривец), в Ралево и Пордим (Плевенско) и в Липака (Ловешко); 83.3% – в Божурлук (Плевенско), във великотърновските популации (с изключение на Вардим), в Дъбен и Борима (Ловешко).

Таблица 15. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Русе

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Батин	2 ± 0	66.7	0.221 ± 0.062	0.25 ± 0.084
Копривец	1.8 ± 0.2	50	0.131 ± 0.064	0.216 ± 0.089
Бъзовец	2 ± 0	66.7	0.225 ± 0.094	0.255 ± 0.084
Писанец	1.8 ± 0.2	66.7	0.123 ± 0.074	0.21 ± 0.088

Установеното ниво на хетерозиготност варираше, както следва: за експериментално получената (H_o) – от 0.097 ± 0.065 (Ралево, Плевенско) до 0.291 ± 0.126 (Дъбен, Ловешко) и за теоретично очакваната (H_e) – от 0.183 ± 0.095 (Кулина вода, Плевенско) до 0.31 ± 0.064 (Клъшка река, Великотърновско).

Таблица 16. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Велико Търново

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Дебелец	2 ± 0.3	83.3	0.219 ± 0.1	0.28 ± 0.096
Петко Каравелово	2 ± 0	83.3	0.236 ± 0.087	0.28 ± 0.073
Вардим	1.8 ± 0.2	50	0.169 ± 0.083	0.229 ± 0.088
Клъшка река	2 ± 0	83.3	0.287 ± 0.076	0.31 ± 0.064
Морава	1.8 ± 0.2	83.3	0.211 ± 0.109	0.249 ± 0.084

За пчелните популации от анализирани области на Северния централен район генетичната дистанция по Nei (1972) бе в диапазона 0.002 – 0.059. В Таблицы 19 – 22 са представени данни за генетичната дистанция между анализирани пчелни популации по области.

Таблица 17. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Плевен

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Белене	1.8 ± 0.2	50	0.177 ± 0.081	0.2 ± 0.093
Ралево	1.8 ± 0.2	66.7	0.097 ± 0.065	0.216 ± 0.08
Пордим	2	66.7	0.182 ± 0.069	0.237 ± 0.08
Кулина вода	1.7 ± 0.2	33.3	0.162 ± 0.084	0.183 ± 0.095
Божурлук	1.8 ± 0.2	83.3	0.255 ± 0.111	0.236 ± 0.086

Таблица 18. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Ловеч

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Липака	2	66.7	0.141 ± 0.057	0.222 ± 0.076
Печковец	1.8 ± 0.2	50	0.137 ± 0.055	0.213 ± 0.086
Дъбен	2	83.3	0.291 ± 0.126	0.27 ± 0.07
Катунец	2.3 ± 0.2	33.3	0.214 ± 0.083	0.224 ± 0.09
Борима	2.2 ± 0.2	83.3	0.2 ± 0.082	0.258 ± 0.075

Таблица 19. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализирани пчелни популации от област Русе

Популация	Батин	Копривец	Бъзовец	Писанец
Батин	***	0.012	0.011	0.005
Копривец		***	0.01	0.005
Бъзовец			***	0.009
Писанец				***

Таблица 20. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализирани пчелни популации от област Велико Търново

Популация	Дебелец	Петко Каравелово	Вардим	Клъшка река	Морава
Дебелец	***	0.008	0.011	0.04	0.005
Петко Каравелово		***	0.008	0.053	0.005
Вардим			***	0.059	0.007
Клъшка река				***	0.042
Морава					***

Таблица 21. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите пчелни популации от област Плевен

Популация	Белене	Ралево	Пордим	Кулина вода	Божурлук
Белене	***	0.005	0.014	0.015	0.007
Ралево		***	0.03	0.03	0.022
Пордим			***	0.003	0.002
Кулина вода				***	0.005
Божурлук					***

Таблица 22. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите пчелни популации от област Ловеч

Популация	Липака	Печковец	Дъбен	Катунец	Борима
Липака	***	0.027	0.013	0.011	0.007
Печковец		***	0.03	0.006	0.034
Дъбен			***	0.019	0.005
Катунец				***	0.016
Борима					***

Северозападна България

В Северозападния административен район на страната по данни на Агростатистика (МЗХ, 2016) се намират 19.6% от пчелните семейства. Те се отглеждат в западните части на Дунавския и Предбалканския подрайон от биогеографската територия на Севернобългарския район.

Включените в това изследване популации са от областите на Видин и Монтана и местообитанията им са с надморска височина от 194 до 497 м.

Получените резултати от проведеното проучване демонстрират наличие на полиморфизъм в изследваните популации по отношение на почти всички алоензимни системи (с изключение на естеразните във видинските популации) с дву- и триалелна система на унаследяване – Таблица 23.

Локусът MDH-1 бе представен с два алела в генофонда на популациите от Видинско (MDH-1¹⁰⁰ и MDH-1⁶⁵) и с три алела – в генофонда на популациите от област Монтана (MDH-1¹⁰⁰, MDH-1⁸⁰ и MDH-1⁶⁵). Във всички изследвани популации (общо четири, по две за областите Видин и Монтана) най-често срещаният алел бе MDH-1¹⁰⁰. Неговата честота варираше в границата от 0.464 (Сливовик, Монтанско) до 0.696 (Дреновец, Видинско). Алелът MDH-1⁶⁵ присъстваше със сходна честота в генофонда на изследваните популации (0.304 – 0.378), а MDH-1⁸⁰ бе с честота 0.214 в Черешовица и 0.202 – в Сливовик.

Таблица 23. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от областите Видин и Монтана

Локус/ алели	Област Видин		Област Монтана	
	Димово	Дреновец	Черешовица	Сливовик
MDH-1				
65	0.378	0.304	0.304	0.333
100	0.622	0.696	0.482	0.464
80	0	0	0.214	0.202
ME				
100	0.864	0.864	0.773	0.884
106	0.136	0.136	0.227	0.116
EST-3				
100	1	1	0.9	0.924
88	0	0	0.06	0.043
118	0	0	0.04	0.033
ALP				
80	0.545	0.526	0.552	0.528
100	0.455	0.474	0.448	0.472
PGM				
100	0.942	0.935	0.926	0.913
114	0.058	0.065	0.074	0.087
HK				
87	0.013	0.013	0.015	0.022
100	0.961	0.975	0.971	0.957
110	0.026	0.013	0.01	0.022

По отношение на ME локус бе констатиран полиморфизъм с двуалелна система на унаследяване (ME^{100} и ME^{106}). По-често срещаният алел ME^{100} бе с еднаква честота във видинските популации (0.864). В генофонда на популациите от Монтанско честотата му бе 0.773 в Черешовица и 0.884 в Сливовик. Честотата на ME^{106} варираше от 0.116 до 0.227.

Получените в изследването резултати относно EST-3 локуса демонстрираха липса на полиморфизъм с фиксиран $EST-3^{100}$ алел в двете популации от Видинско и присъствие в генофонда на популациите от Монтанско на три естеразни алела – $EST-3^{118}$, $EST-3^{100}$ и $EST-3^{88}$, с честоти съответно 0.04 и 0.033; 0.9 и 0.924; 0.06 и 0.043 за популациите Черешовица и Сливовик.

В генофонда на всичките изследвани популации от Северозападна България ALP локусът бе представен от два алела – ALP^{100} и ALP^{80} . Алелът ALP^{80} бе с по-висока честота на срещане (0.526 – 0.552).

Констатираният полиморфизъм по PGM локуса се характеризираше с присъствието на два алела в генофонда на изследваните пчел-

ни популации – PGM¹¹⁴ и PGM¹⁰⁰. Алелът PGM¹⁰⁰ бе с честота от 0.913 (Сливовик, Монтанско) до 0.942 (Димово, Видинско).

И в четирите изследвани популации от Видинска и Монтанска област бе констатиран триалелен полиморфизъм по отношение на НК локуса – НК¹¹⁰, НК¹⁰⁰ и НК⁸⁷, с най-висока честота на срещане на НК¹⁰⁰ алела (0.957 – 0.975). Честотата на НК¹¹⁰ варираше в границите от 0.01 (Черешовица, Монтанско) до 0.26 (Димово, Видинско), а на НК⁸⁷ – в границите от 0.013 (Видинско) до 0.22 (Сливовик, Монтанско).

В Таблица 24 са представени данните относно средния брой алели за локус, нивата на полиморфизъм и хетерозиготност.

Таблица 24. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – области Видин и Монтана

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Димово	2 ± 0.3	66.7	0.158 ± 0.059	0.235 ± 0.087
Дреновец	2 ± 0.3	66.7	0.142 ± 0.052	0.224 ± 0.084
Черешовица	2.5 ± 0.2	83.3	0.17 ± 0.049	0.315 ± 0.092
Сливовик	2.5 ± 0.2	83.3	0.177 ± 0.058	0.291 ± 0.092

Изчислената генетична дистанция между изследваните популации бе в границата от 0.001 до 0.012 – Таблица 25.

Таблица 25. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализирани пчелни популации от областите Видин и Монтана

Популация	Димово	Дреновец	Черешовица	Сливовик
Димово	***	0.001	0.01	0.008
Дреновец		***	0.012	0.011
Черешовица			***	0.003
Сливовик				***

По отношение на изследваните пчелни популации от Северозападна България бе изчислен среден брой алели за локус от порядъка на 2 (Димово и Дреновец, Видинско) и 2.5 (Черешовица и Сливовик, Монтанско).

Нивото на полиморфизъм (P = 0.95) бе 66.7% за видинските популации и 83.3% за монтанските популации.

Нивата на експериментално получената и теоретично очакваната хетерозиготност варираха от 0.142 ± 0.052 до 0.177 ± 0.058 (за H_o) и от 0.224 ± 0.084 до 0.315 ± 0.092 (за H_e).

Югозападна България

Статистическите данни на МЗХ (2016) сочат, че 6.3% от пчелните семейства са локализирани в Югозападния район на България, на територията на който са включени Благоевградската, Кюстендилската, Пернишката и Софийската административна област. Съгласно с биогеографското райониране (Груев, 1988) това са зони от Струмско-Местенския подрайон на Южнобългарския район и Западнобългарския граничен планински подрайон, Горнострумският подрайон на Среднобългарския район и Софийско-Радомирският подрайон на Севернобългарския район.

Таблица 26. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Благоевград

Локус/ алели	Област Благоевград									
	Топол- ница	Гайта- ниново	Горна Брезница	Ключ	Раз- дол	Тухо- вища	Сели- ще	Бистри- ца	Жиже- во	Илин- ден
MDH-1										
65	0.5	0.455	0.4	0.389	0.4	0.389	0.375	0.565	0.5	0.2
100	0.5	0.545	0.6	0.611	0.6	0.611	0.625	0.435	0.5	0.7
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.1
ME										
100	1	0.913	0.955	0.944	0.9	0.85	0.913	0.891	0.87	0.87
106	0	0.087	0.045	0	0.1	0.15	0.087	0.109	0.13	0
90	0	0	0	0.056	0	0	0	0	0	0
115	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13
EST-3										
80	0	0.091	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0.929	0.909	1	0.935	1	1	0.92	0.913	1	1
118	0.071	0	0	0.065	0	0	0.08	0.087	0	0
ALP										
80	0.375	0.444	0.429	0.528	0.5	0.611	0.545	0.522	0.532	0.542
100	0.313	0.556	0.571	0.472	0.5	0.389	0.455	0.478	0.468	0.458
90	0.313	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PGM										
100	0.909	0.778	1	1	1	1	0.955	1	0.974	0.962
114	0.091	0.167	0	0	0	0	0.045	0	0.026	0.038
125	0	0.056	0	0	0	0	0	0	0	0
HK										
87	0	0	0	0	0	0	0.029	0.024	0	0
100	1	1	0.969	0.967	1	0.95	0.971	0.976	1	0.97
110	0	0	0.031	0.033	0	0.05	0	0	0	0.03

От така описаната територия в настоящото изследване са включени общо 18 пчелни популации – 10 от Благоевградско, 4 от Кюс-

тендилско, 3 от Пернишко и 1 от Софийско, с местообитания, чиято надморска височина е от 99 до 1098 м.

Данните относно алелните честоти по изследваните алоензимни локуси са представени в Таблици 26 – 28.

Анализът на данните относно малатдехидрогеназната алоензимна група (MDH-1 локуса) сочи наличие на полиморфизъм основно с двуалелна система на унаследяване в изследваните популации от този район (MDH-1¹⁰⁰ и MDH-1⁶⁵). Само в генофонда на една от пчелните популации (Илинден) бе констатирано присъствие и на трети алел – MDH-1⁸⁰, с честота на срещане 0.1 (Таблица 26).

Таблица 27. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Кюстендил

Локус/ алели	Област Кюстендил			
	Горно Уйно	Гюешево	Пиперово	Илия
MDH-1				
65	0.552	0.519	0.364	0.594
100	0.448	0.481	0.636	0.406
ME				
100	0.833	0.905	0.85	0.886
106	0	0.095	0	0.023
90	0.167	0	0.15	0.091
EST-3				
100	1	1	0.958	1
94	0	0	0.042	0
ALP				
80	0.5	0.55	0.55	0.55
100	0.5	0.45	0.45	0.45
PGM				
100	1	0.957	0.9	0.978
114	0	0	0.1	0.022
125	0	0.043	0	0
HK				
87	0	0	0.043	0
100	0.967	1	0.957	0.967
110	0.033	0	0	0.033

В болшинството изследвани популации MDH-1¹⁰⁰ алелът бе често срещаш се. Вторият алел – MDH-1⁶⁵, се оказа с по-висока честота (0.519 – 0.594) в генофонда на кюстендилските популации (с изключение на Пиперево) и в Бистрица (Благоевградско). В благоевг-

радските популации Тополница и Жижево алелите MDH-1¹⁰⁰ и MDH-1⁶⁵ се срещаха с еднаква честота (0.5).

Локусът ME бе представен в генофонда на изследваните популации с общо четири алела – ME¹¹⁵, ME¹⁰⁶, ME¹⁰⁰ и ME⁹⁰. Честотата на ME¹⁰⁰ алела варираше от 0.833 (Костинброд, Софийско и Горно Уйно, Кюстендилско) до 0.955 (Горна Брезница, Благоевградско). Този алел бе фиксиран в генофонда на популацията от Трън (Таблица 28). Единствено в генофонда на благоевградската популация Илинден бе констатирано присъствието на алела ME¹¹⁵ с честота 0.13. Алелът ME¹⁰⁶ бе открит в генофонда на пернишките популации (с изключение на Трън), в кюстендилските популации Гюешево и Илия и в повечето благоевградски популации (с изключение на Тополница, Ключ и Илинден), където честотата му варираше от 0.023 (Илия) до 0.15 (Туховища).

Таблица 28. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от областите София и Перник

Локус/ алели	Област София	Област Перник		
	Костинброд	Трън	Туроковци	Горна Мелна
MDH-1				
65	0.487	0.471	0.357	0.313
100	0.513	0.529	0.643	0.688
ME				
100	0.833	1	0.944	0.9
106	0	0	0.056	0.05
90	0.167	0	0	0.05
EST-3				
80	0	0	0.06	0
100	0.975	1	0.94	1
118	0.025	0	0	0
ALP				
80	0.523	0.45	0.519	0.556
100	0.477	0.55	0.481	0.444
PGM				
100	0.942	0.867	1	0.913
114	0.058	0.133	0	0
125	0	0	0	0.087
HK				
100	0.967	0.938	0.957	1
110	0.033	0.063	0.04	0

ME⁹⁰ алелът присъстваше в генофонда на популациите Костинброд (Софийско), Горна Мелна (Пернишко), в кюстендилските популации (с изключение на Гюешево) и в Ключ (Благоевградско), с честота в границата от 0.05 до 0.167. В генофонда на две от изследваните попула-

ции – Горна Мелна (Пернишко) и Илия (Кюстендилско) – бе констатирано наличието и на трите алела на ME локуса (ME^{106} , ME^{100} и ME^{90}).

Общо четири алела на EST-3 локуса ($EST-3^{118}$, $EST-3^{100}$, $EST-3^{94}$ и $EST-3^{80}$) бяха констатирани като налични в генофонда на изследваните пчелни популации от Югозападна България. Най-често срещаният се алел във всички популации бе $EST-3^{100}$. Честотата му бе в диапазона от 0.909 (Гайтаниново, Благоевградско) до 1.0. Този алел се оказва фиксиран в генофонда на 10 от проучваните популации в този район: Трън и Горна Мелна (Пернишко); Кюстендилско (с изключение на Пиперево); Горна Брезница, Раздол, Туховища, Жижево и Илинден (Благоевградско). Алелът $EST-3^{118}$ присъстваше в генофонда на популациите Костинброд (Софийско), Тополница, Ключ, Селище и Бистрица (Благоевградско), с честота, варираща от 0.025 (Костинброд) до 0.087 в Бистрица. Алелът $EST-3^{94}$ бе открит само в кюстендилската популация Пиперево с честота 0.042, а алелът $EST-3^{80}$ присъстваше само в генофонда на Туроковци (Пернишко) и на Гайтаниново (Благоевградско) с честота 0.06 и 0.091 съответно.

Установен бе полиморфизъм и по отношение на ALP локуса. В генофонда на изследваните популации от Югозападния район на страната бяха открити основно два алела – ALP^{100} и ALP^{80} . Само в благоевградската популация Тополница бе констатиран триалелен полиморфизъм с присъствие и на трети алел – ALP^{90} , чиято честота на срещане бе 0.313 – еднаква с честотата на алела ALP^{100} . В генофонда на по-голямата част от изследваните популации (13 от 18) ALP^{80} алелът се срещаше с по-висока честота (0.375 при триалелен полиморфизъм – 0.611) от тази на ALP^{100} . В популациите Горно Уйно (Кюстендилско) и в Раздол (Благоевградско) честотата на двата алела беше еднаква. Алелът ALP^{100} преобладаваше като честота на срещане (0.55 – 0.571) в генофонда на Трън (Пернишко), Гайтаниново и Горна Брезница (Благоевградско).

В генофонда на пчелните популации от изследвания район се оказва, че PGM локусът е полиморфен и представен в три алелни варианта – PGM^{125} , PGM^{114} и PGM^{100} . Алелът PGM^{125} бе наличен само в 3 от изследваните популации – Горна Мелна (Пернишко), Гюешево (Кюстендилско) и Гайтаниново (Благоевградско), с честота 0.087, 0.043 и 0.056 съответно. Във всички популации PGM^{100} алелът се срещаше с най-висока честота, варираща от 0.778 (Гайтаниново) до 1.0. Този алел се оказва фиксиран в генофонда на популациите Туроковци (Пернишко), Горно Уйно (Кюстендилско), Горна Брезница, Ключ, Раздол, Туховища и Бистрица (Благоевградско). Алелът PGM^{114} бе с честота в диапазон от 0.022 (Илия, Кюстендилско) до 0.167 (Гайтаниново,

Благоевградско) и бе открит в генофонда на 9 от изследваните пчелни популации. Фосфоглюкомутазният локус PGM бе представен и с трите си алела в благоевградската популация Гайтаниново, където и двата по-редки алела (PGM¹²⁵, PGM¹¹⁴) бяха с честота > 0.5.

В по-голямата част от изследваните популации на територията на Югозападна България НК локус бе полиморфен с наличие общо на три алелни варианта (НК¹¹⁰, НК¹⁰⁰ и НК⁸⁷) и фиксиран с алела си НК¹⁰⁰ в генофонда на Горна Мелна (Пернишко), Гюешево (Кюстендилско), Тополница, Гайтаниново, Раздол и Жижево (Благоевградско). Алелът НК¹⁰⁰, бе по-често срещаният се алел и във всички останали популации, с честота от 0.938 (Трън, Пернишко) до 0.976 (Бистрица, Благоевградско). Алелът НК⁸⁷ бе наличен в генофонда само на три от изследваните популации – Пиперево (Кюстендилско), Селище и Бистрица (Благоевградско), с честота < 0.05 – 0.043, 0.029 и 0.024 съответно.

Получените данни относно средния брой алели за локус, нивата на полиморфизъм и хетерозиготност за пчелните популации от територията на Югозападна България са представени в Таблицы 29 – 31.

Таблица 29. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Благоевград

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Тополница	1.8 ± 0.3	66.7	0.248 ± 0.11	0.25 ± 0.116
Гайтаниново	2 ± 0.3	83.3	0.314 ± 0.111	0.287 ± 0.085
Горна Брезница	1.7 ± 0.2	33.3	0.234 ± 0.135	0.192 ± 0.099
Ключ	1.8 ± 0.2	66.7	0.272 ± 0.14	0.216 ± 0.091
Раздол	1.5 ± 0.2	50	0.183 ± 0.091	0.198 ± 0.1
Туховища	1.7 ± 0.2	66.7	0.17 ± 0.093	0.223 ± 0.093
Селище	2 ± 0	66.7	0.212 ± 0.089	0.241 ± 0.081
Бистрица	1.8 ± 0.2	66.7	0.291 ± 0.119	0.237 ± 0.09
Жижево	1.7 ± 0.2	50	0.106 ± 0.08	0.215 ± 0.098
Илинден	2 ± 0.3	50	0.215 ± 0.123	0.225 ± 0.09

По отношение на изследваните популации бе констатирано, че средният брой алели за локус варира от 1.5 (Раздол, Благоевградско) до 2 (Костинброд, Пиперево, Илия, Гайтаниново, Селища и Илинден).

Таблица 30. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Кюстендил

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси ($P = 0.95$)	H_o Получена хетерозиготност	H_e Очаквана хетерозиготност
Горно Уйно	1.7 ± 0.2	50	0.211 ± 0.114	0.228 ± 0.099
Гюешево	1.7 ± 0.2	50	0.161 ± 0.09	0.213 ± 0.097
Пиперево	2 ± 0	66.7	0.252 ± 0.087	0.265 ± 0.077
Илия	2 ± 0.3	50	0.22 ± 0.117	0.221 ± 0.094

Таблица 31. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – области Перник и София

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси ($P = 0.95$)	H_o Получена хетерозиготност	H_e Очаквана хетерозиготност
Костинброд	2 ± 0	66.7	0.218 ± 0.091	0.255 ± 0.087
Трън	1.7 ± 0.2	66.7	0.23 ± 0.092	0.228 ± 0.095
Туроковци	1.8 ± 0.2	66.7	0.22 ± 0.093	$0.214 \pm$
Горна Мелна	1.8 ± 0.3	66.7	0.17 ± 0.083	0.216 ± 0.088

Изчисленият процент на полиморфни локуси ($P = 0.95$) за отделните популации бе, както следва: 33.3% в Горна Брезница (Благоевградско); 50% – в кюстендилските популации (с изключение на Пиперево) и в благоевградските популации Раздол, Жижево и Илинден; 66.7% – в Софийско и Пернишко, в Пиперево (Кюстендилско) и в Тополница, Ключ, Туховища, Селище и Бистрица (Благоевградско); 83.3% – Гайтаниново (Благоевградско).

За проучваните популации от Югозападна България средната експериментално получена (H_o) и теоретично очаквана хетерозиготност (H_e) варираше, както следва: H_o – от 0.106 ± 0.08 до 0.314 ± 0.111 (в благоевградските популации Жижево и Гайтаниново съответно); H_e – от 0.192 ± 0.099 до 0.287 ± 0.085 (в благоевградските популации Горна Брезница и Гайтаниново съответно).

Изчислената генетична дистанция по Nei (1972) за проучваните области от Югозападния район на България варираше от 0.002 до 0.037 (Таблицы 32 – 34).

Таблица 32. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите пчелни популации от област Благоевград

Популация	Тополница	Гайтаниново	Горна Брезница	Ключ	Раздол	Туховища	Селище	Бистрица	Жижево	Илинден
Тополница	***	0.025	0.023	0.021	0.023	0.028	0.022	0.022	0.022	0.037
Гайтаниново		***	0.01	0.013	0.01	0.019	0.011	0.015	0.01	0.023
Горна Брезница			***	0.003	0.002	0.009	0.005	0.01	0.006	0.012
Ключ				***	0.003	0.006	0.002	0.009	0.007	0.01
Раздол					***	0.004	0.002	0.007	0.003	0.01
Туховища						***	0.004	0.011	0.005	0.011
Селище							***	0.009	0.005	0.009
Бистрица								***	0.003	0.029
Жижево									***	0.019
Илинден										***

Таблица 33. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите пчелни популации от област Кюстендил

Популация	Горно Уйно	Гюешево	Пиперево	Илия
Горно Уйно	***	0.006	0.011	0.002
Гюешево		***	0.011	0.003
Пиперево			***	0.014
Илия				***

Таблица 34. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите пчелни популации от областите Перник и София

Популации	Костинброд	Трън	Туроковци	Горна Мелна
Костинброд	***	0.009	0.009	0.01
Трън		***	0.009	0.013
Туроковци			***	0.004
Горна Мелна				***

Южна Централна България

Данните от агростатистическото проучване на МЗХ за 2016 г. сочат, че 11.8% от пчелните семейства в страната са в Южния централен район. От този район в проучването са включени 25 пчелни популации от административните области Смолян, Кърджали, Хасково, Пловдив, Пазарджик и Стара Загора. Съгласно с биогеографското райониране (Груев, 1988) местообитанията на тези популации са на територията на Рило-Родопския планински подрайон (Планинския район), Източнородопския подрайон (Южнобългарския район) и подра-

йона на Горнотракийската низина (Среднобългарския район). Местоположенията на проучваните популации са с надморска височина от 82 до 1104 м.

Проведеният изоензимен анализ сочи, че е налице полиморфизъм по почти всички изследвани локуси в почти всички от включените в проучването пчелни популации от Южния централен район. Като изключение определени локуси се оказват фиксирани с даден свой алел в генофонда на някои популации – Таблици 35 – 39.

При направеното проучване малатдехидрогеназният локус MDH-1 се оказва полиморфен с триалелна система на унаследяване. В генофонда на по-голямата част от популациите присъстваха алелите MDH-1¹⁰⁰ и MDH-1⁶⁵ със значително висока честота на срещане. Алелът MDH-1¹⁰⁰ бе по-често срещан се в генофонда на смолянските популации (с изключение на Любча, където честотата му бе еднаква с тази на MDH-1⁶⁵ – 0.5), в Долни Юруци и Тихомир (Кърджалийско), в Славеево, Железино, Мандрица и Мезек (Хасковско), в пловдивските популации (с изключение на Винаца), в Стрелча и Септември (Пазарджишко). Това са 60% от изследваните популации в този район. В генофонда на популациите Любча (Смолянско) и Варник (Хасковско) алелите MDH-1¹⁰⁰ и MDH-1⁶⁵ присъстваха с еднаква честота – 0.5 и 0.417 съответно. Алелът MDH-1¹⁰⁰ бе с най-висока честота на срещане в Тихомир (Кърджалийско) – 0.864, а алелът MDH-1⁶⁵ – в Димовци (Старозагорско) – 0.641. В генофонда на три от изследваните пчелни популации – Златоград (Смолянско), Крумовград (Кърджалийско) и Варник (Хасковско) бе установено присъствието и на алела MDH-1⁸⁰. Този алел бе с честота 0.042, 0.214 и 0.167 за трите популации съответно.

Малатензимният локус ME бе представен в генофонда на изследваните популации от Южния централен район общо в три алелни варианта – ME¹⁰⁶, ME¹⁰⁰ и ME⁹⁰, като с най-голяма честота във всички популации присъстваше ME¹⁰⁰ алелът. Същият бе фиксиран в популациите Кърджали, Винаца (Пловдивско), Септември и Мало Конаре (Пазарджишко). В останалите популации честотата му варираше от 0.833 (Любча, Смолянско) до 0.97 (Панагюрище). Алелът ME¹⁰⁶ бе с честота от 0.03 до 0.167. В генофонда на смолянските популации Златоград и Смилян, в Долни Юруци (Кърджалийско), в Тракия (Пловдив) и Димовци (Старозагорско) се установи присъствие и на алела ME⁹⁰, чиято честота варираше от 0.022 до 0.1. В генофонда на три от изследваните популации – Златоград, Тракия и Димовци, бяха налични и трите описани ME алела.

Таблица 35. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Смолян

Локус/ алели	Област Смолян				
	Смолян	Златоград	Смилян	Любча	Върбина
MDH-1					
65	0.405	0.25	0.417	0.5	0.467
100	0.595	0.708	0.583	0.5	0.533
80	0	0.042	0	0	0
ME					
100	0.935	0.9	0.9	0.833	0.909
106	0.065	0.033	0	0.167	0.091
90	0	0.067	0.1	0	0
EST-3					
100	0.946	0.792	1	1	0.933
118	0.054	0.208	0	0	0
105	0	0	0	0	0.067
ALP					
80	0.575	0.5	0.611	0.45	0.65
100	0.425	0.5	0.389	0.55	0.35
PGM					
100	0.957	0.923	1	0.964	0.85
114	0.043	0.077	0	0.036	0.15
HK					
87	0	0.016	0.033	0.017	0
100	0.978	0.984	0.967	0.983	0.933
110	0.022	0	0	0	0.067

В проучваните популации естеразният локус EST-3 се оказва полиморфен с налични общо 5 алела – EST-3¹¹⁸, EST-3¹⁰⁵, EST-3¹⁰⁰, EST-3⁹⁴ и EST-3⁸⁰. Най-често срещаният се алел във всички изследвани популации бе EST-3¹⁰⁰ (0.742 – 1.0). Същият бе фиксиран в смолянските популации Смилян и Любча и в пазарджишките популации Стрелча и Септември.

Алелът EST-3¹¹⁸ бе открит с честота от 0.008 до 0.208 в генофонда на 10 от изследваните популации (Смолян, Златоград, Крумовград, Тихомир, Свиленград, Варник, Мандрица, Пловдив, Тракия и Димовци), EST-3¹⁰⁵ алелът присъстваше в генофонда на 2 популации – Върбина (Смолянско) и Овощарски институт (Пловдив), с честота 0.067 и 0.06 съответно. Алелът EST-3⁹⁴ бе установен в генофонда на 8 популации (в четирите кържалийски, в хасковските Свиленград, Дъбовец и Мезек и в пловдивската популация Тракия) с честота от 0.016 до 0.2, а EST-3⁸⁰ – в генофонда на 6 популации – Славеево и Железино

(Хасковско), Винаца (Пловдивско), Панагюрище, Поибрене и Мало Конаре (Пазарджишко), с честота в диапазона 0.059 – 0.258.

Таблица 36. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Кърджали

Локуси/ алели	Област Кърджали			
	Кърджали	Крумовград	Долни Юруци	Тихомир
MDH-1				
65	0.578	0.429	0.455	0.136
100	0.422	0.357	0.545	0.864
80	0	0.214	0	0
ME				
100	1	0.95	0.9	0.889
106	0	0.05	0	0.111
90	0	0	0.1	0
EST-3				
100	0.957	0.9	0.8	0.925
118	0	0.05	0	0.025
94	0.043	0.05	0.2	0.05
ALP				
80	0.524	0.357	0.313	0.25
100	0.476	0.643	0.688	0.75
PGM				
100	0.917	0.955	1	1
114	0.083	0.045	0	0
HK				
87	0.044	0.013	0.03	0.019
100	0.956	0.988	0.97	0.981

В генофонда на популациите Крумовград, Тихомир, Свиленград и Тракия присъстваха по три алела на проучвания естеразен locus. В генофонда на болшинството от проучваните популации ALP locusът бе представен в два алелни варианта – ALP^{100} и ALP^{80} . Само за четири от тях (Свиленград и Мезек, Хасковско, и Овощарски институт и Винаца, Пловдивско) бе констатирано присъствието и на третия алел ALP^{90} , който бе с честота на срещане в границата от 0.054 до 0.15. Алелът ALP^{100} се срещаше по-често (0.518 – 0.75) в Любча (Смолянско), Крумовград, Долни Юруци и Тихомир (Кърджалийско), Славеево и Мандрица (Хасковско), Винаца (Пловдивско) и Димовци (Старозагорско). В генофонда на Златоград (Смолян), Железино и Дъбовец (Хасковско) алелите ALP^{100} и ALP^{80} бяха с еднаква честота (0.5). В генофонда на останалите 14 пчелни популации преобладаващо при-

състваше ALP⁸⁰, като за тях честотата му варираше от 0.45 при триалелна система до 0.688. В генофонда на хасковските популации Свиленград и Мезек, както и в пловдивските – Овощарски институт и Виница – бе установено наличие и на трите алела на този локус.

Таблица 37. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Хасково

Локус/ алели	Област Хасково						
	Свиленград	Варник	Дъбовец	Славеево	Железино	Мандрица	Мезек
MDH-1							
65	0.591	0.417	0.595	0.273	0.45	0.391	0.25
100	0.409	0.417	0.405	0.727	0.55	0.609	0.75
80	0	0.167	0	0	0	0	0
ME							
100	0.909	0.95	0.909	0.85	0.95	0.9	0.9
106	0.091	0.05	0.091	0.15	0.05	0.1	0.1
EST-3							
80	0	0	0	0.091	0.059	0	0
100	0.85	0.958	0.825	0.909	0.941	0.875	0.864
118	0.05	0.042	0	0	0	0.125	0
94	0.1	0	0.175	0	0	0	0.136
ALP							
80	0.409	0.6	0.5	0.444	0.5	0.313	0.55
100	0.455	0.4	0.5	0.556	0.5	0.688	0.3
90	0.136	0	0	0	0	0	0.15
PGM							
100	1	0.885	1	0.955	0.864	1	1
114	0	0.038	0	0.045	0.136	0	0
125	0	0.077	0	0	0	0	0
HK							
87	0.014	0.036	0	0.014	0.017	0.03	0.03
100	0.957	0.964	1	0.986	0.983	0.97	0.97
110	0.029	0	0	0	0	0	0

Локусът PGM бе представен в генофонда на изследваните популации основно в два алелни варианта – PGM¹¹⁴ и PGM¹⁰⁰. Само в една от популациите (Варник, Хасковско) бе установено присъствието и на трети алел PGM¹²⁵, с честота на срещане 0.077. По-често срещаният алел PGM¹⁰⁰ се оказва фиксиран в генофонда на популациите Смилян (Смолянско), Долни Юруци и Тихомир (Кърджалийско), Свиленград, Дъбовец, Мандрица и Мезек (Хасковско) и Мало Конаре (Пазар-

джишко). По-редкият алел PGM¹¹⁴ се срещаше с честота от 0.033 (Пловдив) до 0.15 (Върбина, Смолянско).

Хексокиназният локус НК бе полиморфен с общо 3 установени алела за изследваните популации – НК¹¹⁰, НК¹⁰⁰ и НК⁸⁷. Най-висока бе честотата на срещане на НК¹⁰⁰ алела. Тя варираше от 0.896 (Тракия, Пловдив) до 1.0. Алелът бе фиксиран в генофонда на хасковската популация Дъбовец. Алелът НК¹¹⁰, чиято честота се оказа в границите от 0.017 до 0.067, бе констатиран само за генофонда на 5 от изследваните популации – Смолян и Върбина (Смолянско), Свиленград (Хасковско), Тракия (Пловдив) и Мало Конаре (Пазарджишко). Другият алел – НК⁸⁷ – се срещаше в генофонда на останалите 19 популации от Южния централен район, като честотата му варираше от 0.013 (Крумовград) до 0.079 (Виница, Пловдивско).

Таблица 38. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Пазарджик

Локус/ алели	Област Пазарджик				
	Панагюрище	Стрелча	Поибрене	Септември	Мало Конаре
MDH-1					
65	0.51	0.44	0.581	0.375	0.563
100	0.49	0.56	0.419	0.625	0.438
ME					
100	0.97	0.936	0.957	1	1
106	0.03	0.064	0.043	0	0
EST-3					
80	0.258	0	0.091	0	0.1
100	0.742	1	0.909	1	0.9
ALP					
80	0.603	0.6	0.6	0.65	0.688
100	0.397	0.4	0.4	0.35	0.313
PGM					
100	0.879	0.872	0.878	0.875	1
114	0.121	0.128	0.122	0.125	0
НК					
87	0.019	0.02	0.059	0.016	0
100	0.981	0.98	0.941	0.984	0.983
110	0	0	0	0	0.017

Таблица 39. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от областите Пловдив и Стара Загора

Локус/ алели	Област Пловдив				Област Стара Загора
	Пловдив	Тракия	Овощ. инст.	Виница	Димовци
MDH-1					
65	0.25	0.36	0.375	0.595	0.641
100	0.75	0.64	0.625	0.405	0.359
ME					
100	0.891	0.879	0.85	1	0.891
106	0.109	0.086	0.15	0	0.087
90	0	0.034	0	0	0.022
EST-3					
80	0	0	0	0.065	0
100	0.955	0.976	0.94	0.935	0.957
118	0.045	0.008	0	0	0.043
94	0	0.016	0	0	0
105	0	0	0.06	0	0
ALP					
80	0.571	0.535	0.45	0.429	0.478
100	0.429	0.465	0.4	0.518	0.522
90	0	0	0.15	0.054	0
PGM					
100	0.967	0.935	0.917	0.853	0.891
114	0.033	0.065	0.083	0.147	0.109
HK					
87	0.045	0.063	0.047	0.079	0.03
100	0.955	0.896	0.953	0.921	0.97
110	0	0.042	0	0	0

В Таблицы 40 – 44 са представени данни за установения среден брой алели за локус, нивата на полиморфизъм и хетерозиготност. Проведеният в този аспект статистически анализ показва, че в изследваните популации от Южна Централна България средният брой алели за локус варира от 1.7 до 2.5, а процентът на полиморфизъм за отделните популации е от 50% (Смилян, Любча, Кърджали, Пловдив, Септември и Мало Конаре) до 100% (Върбина, Смолянско). Ниво на полиморфизъм от 66.7% бе изчислено за Смолян, останалите кърджалийски популации, всички хасковски (с изключение на Железино), Димовци (Старозагорско), Панагюрище и Стрелча. В Златоград, Железино (Хасковско), останалите пловдивски популации и Поибрене (Пазарджишко) нивото на полиморфизъм бе 83.3%.

Таблица 40. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Смолян

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Смолян	2 ± 0	66.7	0.196 ± 0.083	0.224 ± 0.086
Златоград	2.3 ± 0.2	83.3	0.253 ± 0.09	0.282 ± 0.078
Смилян	1.7 ± 0.2	50	0.167 ± 0.114	0.211 ± 0.097
Любча	1.8 ± 0.2	50	0.179 ± 0.087	0.24 ± 0.099
Върбина	2 ± 0	100	0.244 ± 0.097	0.28 ± 0.072

Таблица 41. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Кърджали

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Кърджали	1.8 ± 0.2	50	0.208 ± 0.105	0.222 ± 0.091
Крумовград	2.3 ± 0.2	66.7	0.196 ± 0.064	0.255 ± 0.103
Долни Юруци	1.8 ± 0.2	66.7	0.187 ± 0.095	0.254 ± 0.084
Тихомир	2 ± 0.3	66.7	0.11 ± 0.056	0.168 ± 0.058

Експериментално получената средна хетерозиготност (H_o) за изследваните популации варираше от 0.11 ± 0.056 (Тихомир, Кърджалийско) до 0.259 ± 0.107 (Виница, Пловдивско), а теоретично очакваната хетерозиготност (H_e) – от 0.168 ± 0.058 (Тихомир) до 0.289 ± 0.089 (Овощарски институт, Пловдив).

Таблица 42. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Хасково

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Свиленград	2.3 ± 0.3	66.7	0.198 ± 0.098	0.274 ± 0.099
Варник	2.3 ± 0.2	66.7	0.197 ± 0.082	0.267 ± 0.099
Дъбовец	1.7 ± 0.2	66.7	0.153 ± 0.069	0.245 ± 0.093
Славеево	2 ± 0	66.7	0.232 ± 0.087	0.244 ± 0.076
Железино	2 ± 0	83.3	0.237 ± 0.084	0.252 ± 0.087
Мандрица	1.8 ± 0.2	66.7	0.191 ± 0.092	0.233 ± 0.08
Мезек	2 ± 0.3	66.7	0.211 ± 0.097	0.245 ± 0.09

Таблица 43. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Пазарджик

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Панагюрище	2 ± 0	66.7	0.183 ± 0.066	0.282 ± 0.085
Стрелча	1.8 ± 0.2	66.7	0.143 ± 0.064	0.228 ± 0.089
Поибрене	2 ± 0	83.3	0.172 ± 0.06	0.26 ± 0.075
Септември	1.7 ± 0.2	50	0.255 ± 0.127	0.2 ± 0.093
Мало Конаре	1.7 ± 0.2	50	0.206 ± 0.103	0.195 ± 0.093

Таблица 44. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – области Пловдив и Стара Загора

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Пловдив	2 ± 0	50	0.225 ± 0.114	0.219 ± 0.074
Тракия	2.5 ± 0.2	83.3	0.23 ± 0.115	0.258 ± 0.075
Овощ. инст.	2.2 ± 0.2	83.3	0.245 ± 0.115	0.289 ± 0.089
Виница	2 ± 0.3	83.3	0.259 ± 0.107	0.262 ± 0.089
Димовци	2.2 ± 0.2	66.7	0.221 ± 0.077	0.252 ± 0.078

Генетичната дистанция (Nei, 1972) за популациите от територията на Южния централен район бе в границите от 0.002 до 0.061 – Таблицы 45 – 49.

Таблица 45. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализирани пчелни популации от област Смолян

Популация	Смолян	Златоград	Смилян	Любча	Върбина
Смолян	***	0.011	0.003	0.008	0.005
Златоград		***	0.018	0.025	0.025
Смилян			***	0.012	0.008
Любча				***	0.015
Върбина					***

Таблица 46. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализирани пчелни популации от област Кърджали

Популация	Кърджали	Крумовград	Долни Юруци	Тихомир
Кърджали	***	0.016	0.022	0.061
Крумовград		***	0.016	0.044
Долни Юруци			***	0.028
Тихомир				***

Таблица 47. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите пчелни популации от област Хасково

Популация	Свиленград	Варник	Дъбовец	Славеево	Железино	Мандрица	Мезек
Свиленград	***	0.019	0.004	0.03	0.015	0.02	0.032
Варник		***	0.017	0.027	0.01	0.03	0.029
Дъбовец			***	0.03	0.014	0.022	0.034
Славеево				***	0.012	0.011	0.015
Железино					***	0.016	0.024
Мандрица						***	0.033
Мезек							***

Таблица 48. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите пчелни популации от област Пазарджик

Популация	Панагюрище	Стрелча	Поибрене	Септември	Мало Конаре
Панагюрище	***	0.016	0.008	0.018	0.009
Стрелча		***	0.006	0.002	0.011
Поибрене			***	0.012	0.005
Септември				***	0.013
Мало Конаре					***

Таблица 49. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите пчелни популации от областите Пловдив и Стара Загора

Популация	Пловдив	Тракия	Овощ. инст.	Виница	Димовци
Пловдив	***	0.004	0.008	0.036	0.037
Тракия		***	0.006	0.02	0.02
Овощ. инст.			***	0.021	0.022
Виница				***	0.005
Димовци					***

Югоизточна България

По официални данни на МЗХ (2016) 17.7% от пчелните семейства са в Югоизточна България. Пчелните популации, включени в настоящото изследване (общо 18 на брой), са локализирани в областите Ямбол, Сливен и Бургас. По биогеографското райониране на страната ни (Груев, 1988) техните местонахождения са на територията на подрайона на Тунджанската хълмиста низина (Среднобългарския район) и южния дял на Черноморския район. По местоположения изследваните популации са с надморска височина от 0 до 438 м.

Проведеният изоензимен анализ демонстрира полиморфизъм по всички изследвани локуси в почти всички от проучваните пчелни популации на територията на този район – Таблицы 50 и 51.

Таблица 50. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от областите Ямбол и Сливен

Локус/ алели	Област Ямбол				Област Сливен	
	Крайново	Вълча поляна	Странджа	Палаузово	Сливен 1	Сливен 2 НРАП
MDH-1						
65	0.545	0.5	0.292	0.458	0.489	0.469
100	0.409	0.455	0.708	0.542	0.511	0.531
80	0.045	0.045	0	0	0	0
ME						
100	0.944	1	0.868	0.9	0.957	0.938
106	0	0	0.105	0	0.043	0
90	0.056	0	0.026	0.1	0	0.063
EST-3						
80	0	0	0	0	0	0.045
100	0.962	0.958	1	0.909	0.967	0.955
94	0	0.042	0	0	0.033	0
105	0.038	0	0	0.091	0	0
ALP						
80	0.444	0.556	0.375	0.6	0.333	0.571
100	0.556	0.278	0.625	0.4	0.567	0.429
90	0	0.167	0	0	0.1	0
PGM						
100	1	0.917	0.978	0.786	0.865	0.81
114	0	0.083	0.022	0.214	0.135	0.155
125	0	0	0	0	0	0.034
HK						
87	0	0.019	0.012	0	0	0
100	0.952	0.981	0.94	1	0.967	0.979
110	0.048	0	0.048	0	0.033	0.021

Малатдехидрогеназният локус MDH-1 показва полиморфизъм с общо три изявиени алела – MDH-1¹⁰⁰, MDH-1⁸⁰ и MDH-1⁶⁵. Алелът MDH-1⁸⁰ бе наличен в генофонда само на три популации – Крайново и Вълча поляна (Ямболско) и Сливарово (Бургаско) – с честота 0.045 и 0.136 за двете области съответно. За генофонда на тези три популации е важно да се отбележи присъствието и на трите описани малатдехидрогеназни алела. Алелът MDH-1⁶⁵ се срещаше с по-голяма честота в ямболските популации Крайново (0.545) и Вълча поляна (0.5) и в бургаските – Бостанлъка (0.667) и Кости (0.542). Във всички останали популации MDH-1¹⁰⁰ бе по-често срещаният се алел.

По отношение на ME локус бе констатирано наличие на общо три алела в проучваните популации (ME¹⁰⁶, ME¹⁰⁰ и ME⁹⁰). Най-често сре-

щаният алел навсякъде бе ME¹⁰⁰. Честотата му варираше от 0.727 (Велика, Бургаско) до 1.0 (Вълча поляна, Ямболско, и Бостанлъка, Резово, Кости и Граничар, Бургаско). Алелът ME¹⁰⁶ присъстваше с честота от 0.043 до 0.13 в популациите Странджа, Сливен 1, Бургас, Поморие, Китен и Венец, а ME⁹⁰ – с честота от 0.026 до 0.273 в ямболските популации Крайново, Странджа, Палаузово, една от сливенските популации (Сливен 2) и в бургаските популации Бургас, Равадиново, Велика, Сливарово, Бръшлян и Венец. И трите алела присъстваха в генофонда на Странджа, Бургас и Венец.

Общо 6 алелни варианта бяха отчетени за EST-3 локуса в пчелните популации от Югоизточна България. Това бяха алелите EST-3¹¹⁸, EST-3¹⁰⁵, EST-3¹⁰⁰, EST-3⁹⁴, EST-3⁸⁸ и EST-3⁸⁰. Най-често срещаният алел бе EST-3¹⁰⁰. Същият бе фиксиран в Странджа (Ямболско) и в бургаските популации Бостанлъка, Равадиново, Резово и Бръшлян.

Алелът EST-3¹¹⁸ присъстваше в генофонда само на бургаските популации Велика, Кости и Венец, с ниска честота (0.029, 0.042 и 0.045, съответно). Естеразният алел EST-3¹⁰⁵ бе установен в генофонда на ямболските популации Крайново и Палаузово, в Бургас и Сливарово (Бургаско) с честота от 0.038 до 0.091. Алелът EST-3⁹⁴ присъстваше в генофонда на 3 от изследваните популации – Вълча поляна, Ямболско (0.042), Сливен 1 (0.033) и Велика, Бургаско (0.118). Алелният вариант EST-3⁸⁸ бе установен само за генофонда на две от бургаските популации – Поморие и Граничар – с честота 0.032 и 0.042 съответно. Алелът EST-3⁸⁰ бе открит в генофонда на популациите Сливен 2 (0.045), Китен (0.022) и Велика (0.147). Интересен е фактът, че в генофонда на бургаската популация Велика бе констатирано присъствие на 4 от 6-те естеразни алела (EST-3¹¹⁸, EST-3¹⁰⁰, EST-3⁹⁴ и EST-3⁸⁰).

В изследваните пчелни популации от Югоизточна България ALP locusът бе полиморфен с триалелна система на унаследяване (ALP¹⁰⁰, ALP⁹⁰ и ALP⁸⁰). ALP¹⁰⁰ алелът се срещаше по-често в генофонда на 8 от изследваните популации – Крайново и Странджа (Ямболско), Сливен 1, Равадиново, Китен, Велика, Резово и Бръшлян (Бургаско).

Таблица 51. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от област Бургас

Локус/ алели	Област Бургас											
	Бургас	Бостанлъка	Поморие	Равадиново	Китен	Велика	Резово	Кости	Сливарово	Бръшлян	Граничар	Венец
MDH-1												
65	0.324	0.667	0.31	0.5	0.5	0.361	0.25	0.542	0.182	0.462	0.333	0.45
100	0.676	0.333	0.69	0.5	0.5	0.639	0.75	0.458	0.682	0.538	0.667	0.55
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0.136	0	0	0
ME												
100	0.846	1	0.87	0.909	0.955	0.727	1	1	0.909	0.929	1	0.818
106	0.077	0	0.13	0	0.045	0	0	0	0	0	0	0.091
90	0.077	0	0	0.091	0	0.273	0	0	0.091	0.071	0	0.091
EST-3												
80	0	0	0	0	0.022	0.147	0	0	0	0	0	0
100	0.957	1	0.968	1	0.978	0.706	1	0.958	0.909	1	0.958	0.955
88	0	0	0.032	0	0	0	0	0	0	0	0.042	0
118	0	0	0	0	0	0.029	0	0.042	0	0	0	0.045
94	0	0	0	0	0	0.118	0	0	0	0	0	0
105	0.043	0	0	0	0	0	0	0	0.091	0	0	0
ALP												
80	0	0.524	0.838	0.444	0.44	0	0.4	0.55	0.045	0.35	0	0.6
100	0.4	0.452	0.162	0.5	0.52	0.667	0.55	0.45	0.455	0.6	0.45	0.4
90	0.6	0.024	0	0.056	0.04	0.333	0.05	0	0.5	0.05	0.55	0
PGM												
100	0.827	1	0.935	0.957	0.917	0.95	0.917	1	0.958	0.962	0.957	0.786
114	0.173	0	0.065	0.043	0.083	0.05	0.083	0	0.042	0	0.043	0.214
80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.038	0	0
HK												
87	0	0	0.023	0.032	0	0	0.024	0.036	0	0.045	0.017	0
100	0.938	0.964	0.977	0.935	0.967	1	0.952	0.964	0.955	0.955	0.983	1
110	0.063	0.036	0	0.032	0.033	0	0.024	0	0.045	0	0	0

В генофонда на популациите Бургас, Сливарово и Граничар по-често срещащ се алел бе ALP^{90} . В останалите 7 популации по-често срещаният алел бе ALP^{80} . Прави впечатление фактът, че в 50% от проучваните бургаски популации, както и в ямболската популация Вълча поляна се срещаха и трите алела на ALP локуса.

Фосфоглюкомутазният локус бе полиморфен с наличие основно на два алела (PGM^{114} и PGM^{100}) в генофонда на болшинството от изследваните популации, като по-често срещащ се беше PGM^{100} . Честотата на този алел варираше от 0.786 (Палаузово, Ямболско, и Венец, Бургаско) до 1.0 (Крайново, Ямболско, Бостанлъка и Кости, Бургаско). Само в генофонда на популацията Сливен-2 бе констатирано присъствие на алела PGM^{125} и само в генофонда на бургаската популация Брашлян – на алела PGM^{80} , и двата с ниска честота на срещане (0.034 и 0.038 съответно).

Хексокиназният локус бе представен от общо три алела в генофонда на изследваните популации – HK^{110} , HK^{100} и HK^{87} . С най-висока честота на срещане бе HK^{100} . Този локус бе фиксиран в генофонда на популациите Палаузово (Ямболско), Велика и Венец (Бургаско). В генофонда на 10 от изследваните популации присъстваше алелът HK^{110} (0.021 – 0.063), а в останалите 8 популации – алелът HK^{87} (0.012 – 0.045). И трите хексокиназни алела присъстваха в генофонда на популациите Странджа (Ямболско), Равадиново и Резово (Бургаско).

Средният брой алели за локус в изследваните популации от Югоизточна България варираше от 1.7 до 2.3, а процентът на полиморфизъм – от 33.3% (Бостанлъка, Кости и Граничар, Бургаско) до 83.3% (Палаузово, Ямболско, Бургас и Велика, Бургаско) – Таблици 52 и 53.

Таблица 52. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – области Ямбол и Сливен

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси ($P = 0.95$)	H_o Получена хетерозиготност	H_e Очаквана хетерозиготност
Крайново	2 ± 0.3	50	0.165 ± 0.082	0.222 ± 0.098
Вълча поляна	2.2 ± 0.3	50	0.265 ± 0.124	0.239 ± 0.11
Странджа	2.2 ± 0.3	66.7	0.181 ± 0.089	0.217 ± 0.082
Палаузово	1.8 ± 0.2	83.3	0.293 ± 0.119	0.283 ± 0.082
Сливен 1	2.2 ± 0.2	50	0.213 ± 0.076	0.254 ± 0.093
Сливен 2 НРАП	2.2 ± 0.2	66.7	0.316 ± 0.111	0.265 ± 0.086

Таблица 53. Среден брой алели за локус, ниво на полиморфизъм, получена и очаквана хетерозиготност – област Бургас

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси (P = 0.95)	H _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
Бургас	2.2 ± 0.2	83.3	0.298 ± 0.131	0.286 ± 0.067
Бостанлъка	1.7 ± 0.3	33.3	0.151 ± 0.088	0.176 ± 0.101
Поморие	2 ± 0	66.7	0.185 ± 0.064	0.195 ± 0.06
Равадиново	2.2 ± 0.3	66.7	0.183 ± 0.104	0.243 ± 0.096
Китен	2.2 ± 0.2	50	0.27 ± 0.116	0.235 ± 0.094
Велика	2.2 ± 0.4	83.3	0.186 ± 0.071	0.316 ± 0.086
Резово	2 ± 0.4	50	0.183 ± 0.081	0.197 ± 0.091
Кости	1.7 ± 0.2	33.3	0.232 ± 0.131	0.194 ± 0.1
Сливарово	2.3 ± 0.2	66.7	0.155 ± 0.082	0.259 ± 0.086
Бръшлян	2 ± 0.3	50	0.21 ± 0.108	0.223 ± 0.095
Граничар	1.8 ± 0.2	33.3	0.201 ± 0.096	0.194 ± 0.092
Венец	2.3	66.7	0.17 ± 0.07	0.293 ± 0.085

Ниво на полиморфизъм от порядъка на 50% бе характерно за популациите Крайново и Вълча поляна (Ямболско), Сливен 1, Китен, Резово и Бръшлян (Бургаско). 66.7% бе установеният процент на полиморфизъм за популациите Странджа, Сливен 2, Поморие, Равадиново, Сливарово и Венец. Средните стойности на получената и очакваната хетерозиготност (H_o и H_e съответно) варираха, както следва: H_o – от 0.151 ± 0.088 (Бостанлъка, Бургаско) до 0.316 ± 0.111 (Сливен НРАП); H_e – от 0.176 ± 0.101 (Бостанлъка, Бургаско) до 0.316 ± 0.086 (Велика, Бургаско) – Таблицы 54 и 55.

За популациите от проучваните области на Югоизточна България бе установена генетична дистанция от порядъка на 0.002 – 0.152 – Таблицы 52 и 53.

Таблица 54. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализирани пчелни популации от областите Ямбол и Сливен

Популация	Крайново	Вълча поляна	Странджа	Палаузово	Сливен 1	Сливен 2 НРАП
Крайново	***	0.016	0.02	0.019	0.009	0.013
Вълча поляна		***	0.036	0.013	0.017	0.01
Странджа			***	0.029	0.014	0.023
Палаузово				***	0.017	0.003
Сливен 1					***	0.011
Сливен 2 НРАП						***

Таблица 55. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираните пчелни популации от област Бургас

[illegible]

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

Получените и коментирани дотук резултати дават възможност за реализирането на обстоен генетичен анализ, базиран на проучвания върху изоензимната изменчивост в голям брой популации медоносни пчели, локализирани на територията на цялата страна с местонахождения из всички биогеографски райони на България. Такъв тип анализ представя достатъчно обективна информация за характера на генетичния полиморфизъм в изучаваните популации и предоставя възможност за последващи качествени сравнения, включително и с цел определяне на филогенетични връзки както между изучаваните български популации, така и между тях и популации медоносни пчели, принадлежащи към други европейски подвидове.

Обобщените данни от настоящото изследване показват, че в българските популации медоносни пчели е налице полиморфизъм по всички изследвани изоензимни системи (Таблицы 56, 57 и 58). Направеният обобщен анализ по местонахождения и области сочи присъствието на общо три алела ($MDH-1^{65}$, $MDH-1^{80}$ и $MDH-1^{100}$) по отношение на $MDH-1$ локуса, четири – за ME локуса (ME^{90} , ME^{100} , ME^{106} и ME^{115}), шест – за $EST-3$ локуса (EST^{80} , EST^{88} , EST^{94} , EST^{100} , EST^{105} и EST^{118}), три – за ALP (ALP^{80} , ALP^{90} и ALP^{100}), четири – за PGM (PGM^{80} , PGM^{100} , PGM^{114} и PGM^{125}) и три – за HK (HK^{87} , HK^{100} и HK^{110}). В Таблица 56 са представени обобщените данни за констатирания полиморфизъм в изследваните популации по области и райони. Видно е, че с най-висока честота на срещане в генофонда на повечето от проучваните български популации медоносни пчели са алелните варианти $MDH-1^{100}$, ME^{100} , EST^{100} , ALP^{80} (с изключение на популациите в Югоизточна България, където ALP^{100} е с малко по-висока или сходна честота), PGM^{100} и HK^{100} . Бе констатирано, че алелите ME^{115} и PGM^{80} се срещат в генофонда само на по една от българските популации – Илинден, Благоевградско, и Бръшлян, Бургаско, съответно.

В Таблица 58 са представени обобщени данни за полиморфни локуси и алелни честоти по райони.

Сравнителна графична информация за алелните честоти по области е представена на Фигури 18 – 23 (Приложение), откъдето е видно кои са най-често срещаните алелни варианти по анализирания локуси, както и кои са зоните на разпространение на по-редките алели, констатирани при характеризиране на генофонда и генотипната структура на изследваните популации.

Таблица 56. Аеллни честоти за изследваните полиморфни локуси, обобщени по области и райони

Локус	Аел	Североизточен					Северен централен					Северозападен					Югозападен					Южен централен					Югоизточен				
Локус	Аел	Vrm	Dbr	Shm	Rzg	Trg	Rus	V.Tr	Plv	Lov	Vdn	Mon	Blg	Knd	Ptm	Sf	Sm	Kr	Has	Pz	Pld	St.Z	Brg	Yam	Sl						
MDH1	65	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	0.021	0.021	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	0.017	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						

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 очакваната хетерозиготност (H_o и H_e) варираха в диапазон от 0.142 (област Видин) до 0.253 (област Сливен) и от 0.219 (областите Русе и Разград) до 0.296 (област Монтана) съответно (Таблица 57).

Таблица 57. Обобщени данни относно среден брой алели за локус, процент на полиморфни локуси, получена (H_o) и очаквана (H_e) хетерозиготност при проучваните български популации по области и райони

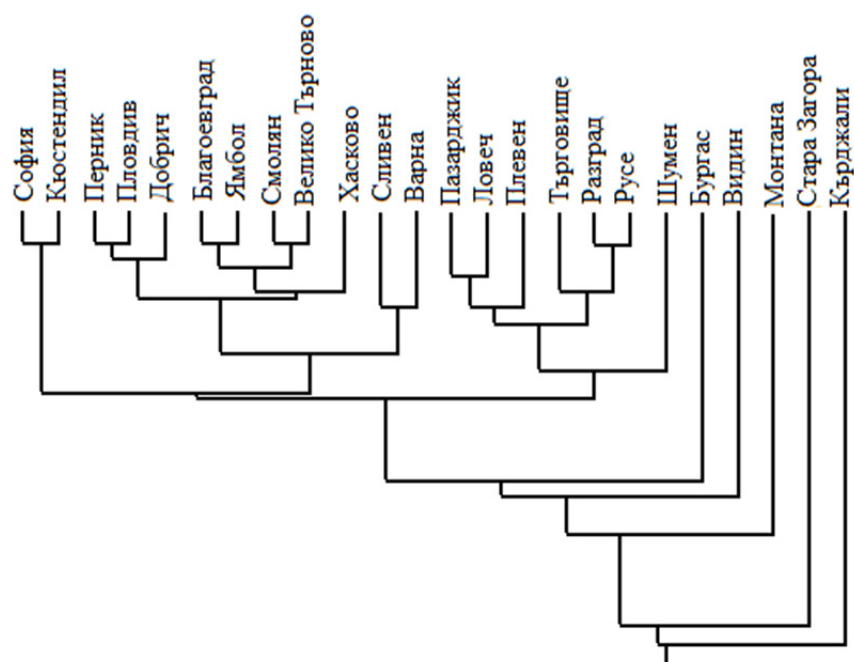
Райони	Области	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси ($P = 0.95$)	H_o Получена хетерозиготност	H_e Очаквана хетерозиготност
Северо-източен	Варна	2.3 ± 0.2	66.7	0.244 ± 0.089	0.251 ± 0.082
	Добрич	2.5 ± 0.2	83.3	0.23 ± 0.089	0.237 ± 0.084
	Шумен	2.5 ± 0.2	50	0.187 ± 0.073	0.234 ± 0.096
	Разград	1.8 ± 0.2	50	0.223 ± 0.1	0.219 ± 0.087
	Търговище	2.8 ± 0.2	50	0.205 ± 0.103	0.243 ± 0.099
Северен централен	Русе	2.3 ± 0.2	50	0.161 ± 0.072	0.219 ± 0.087
	Велико Търново	2.7 ± 0.2	83.3	0.229 ± 0.081	0.282 ± 0.076
	Плевен	2.5 ± 0.2	83.3	0.162 ± 0.07	0.228 ± 0.083
	Ловеч	3 ± 0.3	66.7	0.181 ± 0.065	0.235 ± 0.084
Северо-западен	Видин	2 ± 0.3	66.7	0.142 ± 0.052	0.224 ± 0.084
	Монтана	2.5 ± 0.2	100	0.19 ± 0.056	0.296 ± 0.09
Юго-западен	Благоевград	3 ± 0.3	50	0.213 ± 0.096	0.226 ± 0.091
	Кюстендил	2.5 ± 0.2	50	0.214 ± 0.1	0.233 ± 0.09
	Перник	2.3 ± 0.2	50	0.204 ± 0.08	0.224 ± 0.085
	София	2 ± 0	66.7	0.218 ± 0.091	0.255 ± 0.087
Южен централен	Смолян	2.7 ± 0.2	83.3	0.216 ± 0.087	0.249 ± 0.08
	Кърджали	2.3 ± 0.2	66.7	0.18 ± 0.077	0.232 ± 0.079
	Хасково	3 ± 0.3	66.7	0.202 ± 0.079	0.264 ± 0.088
	Пазарджик	2.2 ± 0.2	66.7	0.18 ± 0.066	0.247 ± 0.079
	Пловдив	3 ± 0.4	83.3	0.24 ± 0.111	0.259 ± 0.08
	Стара Загора	2.2 ± 0.2	66.7	0.221 ± 0.077	0.252 ± 0.078
Юго-източен	Бургас	3.5 ± 0.5	83.3	0.206 ± 0.084	0.265 ± 0.095
	Ямбол	2.7 ± 0.2	66.7	0.223 ± 0.093	0.245 ± 0.088
	Сливен	2.7 ± 0.2	66.7	0.253 ± 0.089	0.262 ± 0.092

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.

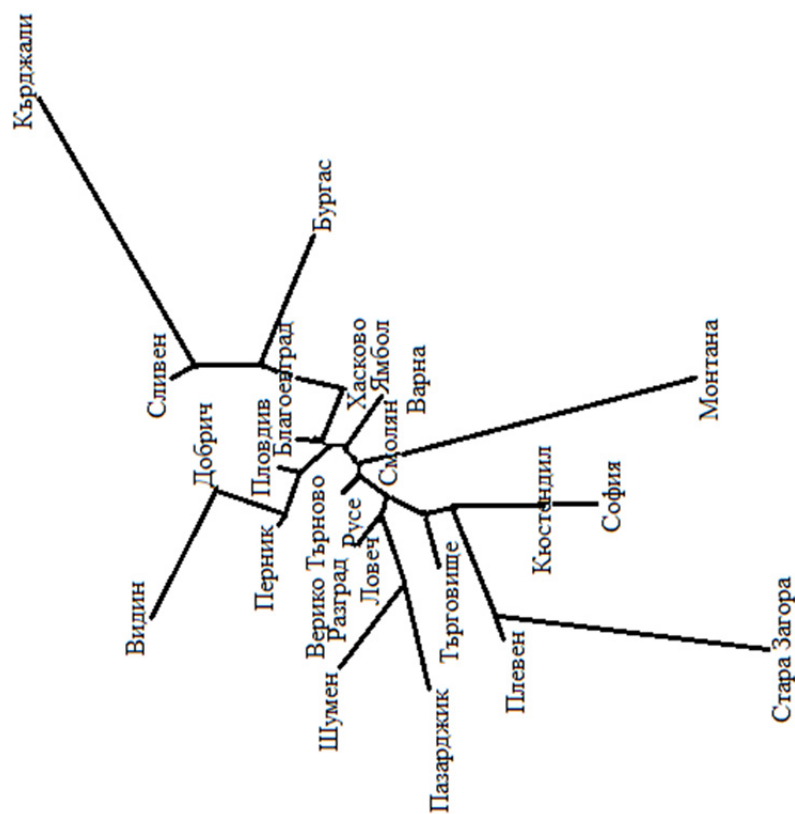
Алелните честоти за всички полиморфни локуси бяха използвани като база за изчисляване на генетичната дистанция и бе установено, че тя варира между 0.001 (Русе – Разград, Русе – Ловеч, Смолян – Пловдив, Смолян – Велико Търново, Смолян – Благоевград, Благоевград – Пловдив, Ямбол – Варна, Перник – Добрич 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 (Таблица 59).

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

Допълнително общите популации, обединяващи областите по райони, бяха филогенетично сравнени с оглед на възможностите за отчитане на тенденции за генетична близост и генетична дистанция. Изчислените алелни честоти (Таблица 58) и генетични дистанции (Таблица 59) по райони позволиха построяването и на обобщени UPGMA и NJ филогенетични схеми (Фигура 25).



А)



Б)

Фигура 24. UPGMA (А) и Neighbor-joining (Б) дендрограми на изследваните популации по области

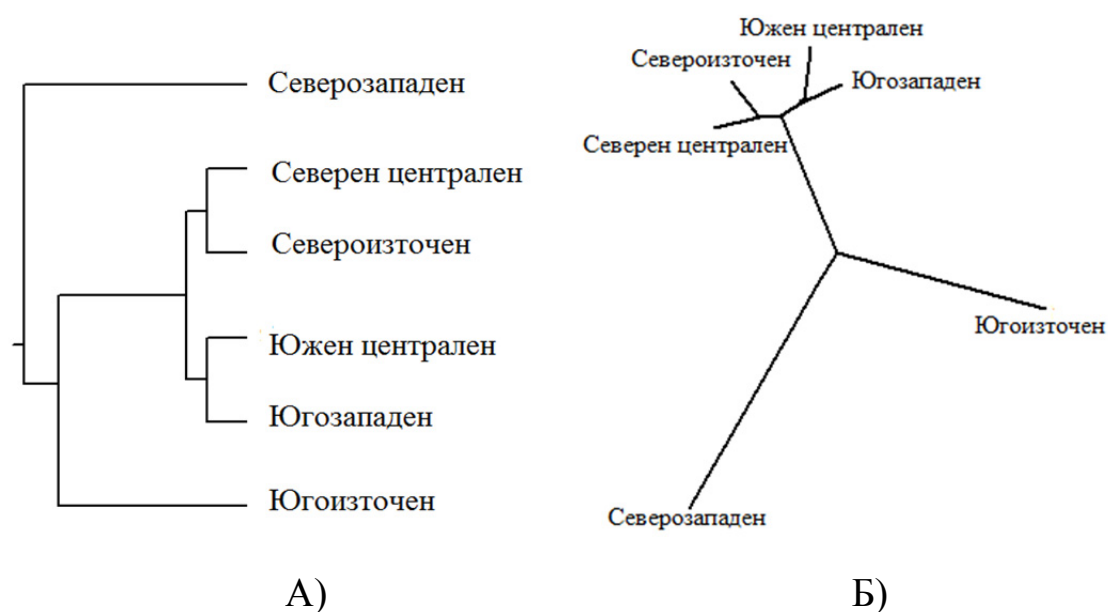
Таблица 58. Обобщени данни за полиморфни локуси и алелни честоти по райони

Локус	Юго-западен	Южен централен	Югоизточен	Северо-източен	Северен централен	Северо-западен
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

Таблица 59. Обобщени данни за генетична дистанция (Nei, 1972) по райони

Райони	ЮЗ	ЮЦ	ЮИ	СИ	СЦ	СЗ
ЮЗ	***	0.001	0.004	0.001	0.002	0.004
ЮЦ		***	0.004	0.001	0.002	0.004
ЮИ			***	0.004	0.007	0.008
СИ				***	0.001	0.005
СЦ					***	0.007
СЗ						***

От обобщените по райони данни и построените на тяхна база филогенетични схеми е видно генетичното сходство сред „южните“ и „северните“ популации. Северозападният район е клъстриран отделно. В два други клъстера са позиционирани поотделно югоизточният и останалите четири района. Най-голямо е генетичното сходство, отчетено между Северния централен и Североизточния район, от една страна, и между Южния централен и Югозападния район, от друга. Именно тези четири района формират и двата основни субклъстера в дендрограмите.



Фигура 25. 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 на 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*. Такъв анализ би допринесъл за по-детайлното сравнително характеризиране на състава на генофонда, особеностите на генотипната структура, степента на генетична хетерогенност, генетичното сходство и генетичната дистанция, както и филогенетичните връзки между изследваните популации и подвидове.

Тези сравнения биха подпомогнали изясняването на въпроса за степента на генетична хетерогенност и нивото на евентуална метизация на българските медоносни пчели към момента предвид факта, че в миналото посочените по-горе подвидове са били включвани в селекционни схеми на територията на България, а от 1999 г. (вече повече от 15 години) се работи по нова Национална програма, чиято основна цел е запазване на генофонда на българската медоносна пчела. Сравнението бе направено по две схеми: 1) местната българска популация, подложена на селекционен контрол, и популации на посочените в частта „Материал и методи“ подвидове и 2) изследваните неконтролирани български популации по области и популации на *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 60 и 61.

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-1⁶⁵, MDH-1⁸⁰, MDH-1¹⁰⁰ и MDH-1¹²⁵) за MDH-1 локуса, три – за ME локуса (ME⁹⁰, ME¹⁰⁰ и ME¹⁰⁶), пет – за EST-3 локуса (EST-3⁸⁸, EST-3⁹⁴, EST-3¹⁰⁰, EST-3¹⁰⁵ и EST-3¹¹⁸), три – за ALP (ALP⁸⁰, ALP⁹⁰ и ALP¹⁰⁰), три – за PGM (PGM⁸⁰, PGM¹⁰⁰ и PGM¹¹⁴), и три – за HK (HK⁸⁷, HK¹⁰⁰ и HK¹¹⁰). Получените резултати сочат, че алелът MDH-1¹²⁵ на MDH-1 локуса присъства само в генофонда на изследваната популация от подвида *A. m. carnica*.

Алелът ME¹⁰⁰ бе фиксиран в генофонда на *A. m. carnica*. ME⁹⁰ липсваше при *A. m. carnica* и *A. m. caucasica*, а ME¹⁰⁶ – при *A. m. carnica* и *A. m. ligustica*. По-рано описаните алели EST-3⁸⁰ и PGM¹²⁵ не бяха установени в генофонда на сравнително проучваните популации от *A. m. carnica*, *A. m. caucasica*, *A. m. ligustica* и *A. m. macedonica*.

Алелът НК⁸⁷ бе констатиран само в генофонда на контролираната българска *A. m. macedonica*, тип *rodopica*. Алелът EST-3⁸⁸ бе открит само при *A. m. macedonica* с небългарски произход, EST-3⁹⁴ присъстваше в генофонда на двете популации на *A. m. macedonica* и при *A. m. caucasica*, EST-3¹⁰⁵ – при *A. m. carnica* и *A. m. ligustica*, EST-3¹¹⁸ – при *A. m. macedonica*, тип *rodopica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica*. Алелният вариант ALP⁹⁰ липсваше в генофонда на пчелните популации от *A. m. macedonica* с различен произход. PGM¹⁰⁰ алелът беше фиксиран в генофонда на „carnica“ популацията, а PGM⁸⁰ присъстваше само в генофонда на „caucasica“ популацията (Таблица 60).

Таблица 60. 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
НК					
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

Таблица 61. 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 _o Получена хетерозиготност	H _e 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

От данните, представени в Таблица 61, е видно, 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 очакваната хетерозиготност (H_o and H_e) варират 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.

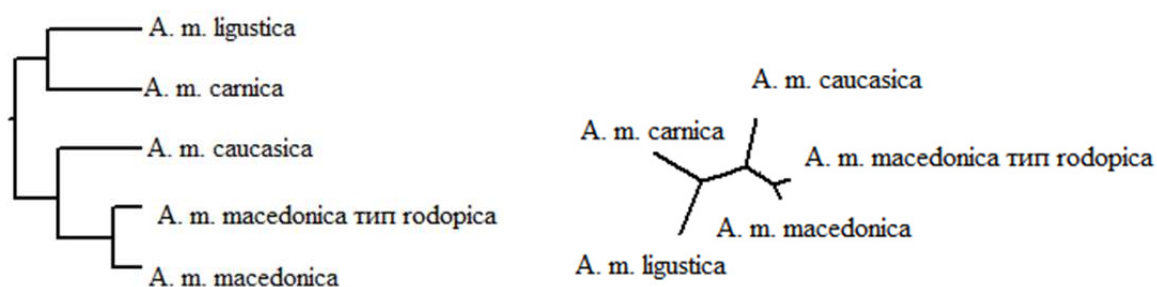
Средната изчислена стойност на показателя F_{ST} за популациите на изследваните подвидове е 0.0767, което показва, че 7.67% от констатираната генетична изменчивост е междупопулационна, а 92.33% – вътрепопулационна.

Алелните честоти за всички полиморфни локуси са използвани като база за изчисляване на генетичната дистанция по Nei (1972) между популациите на изследваните европейски подвидове (Таблица 62) 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*).

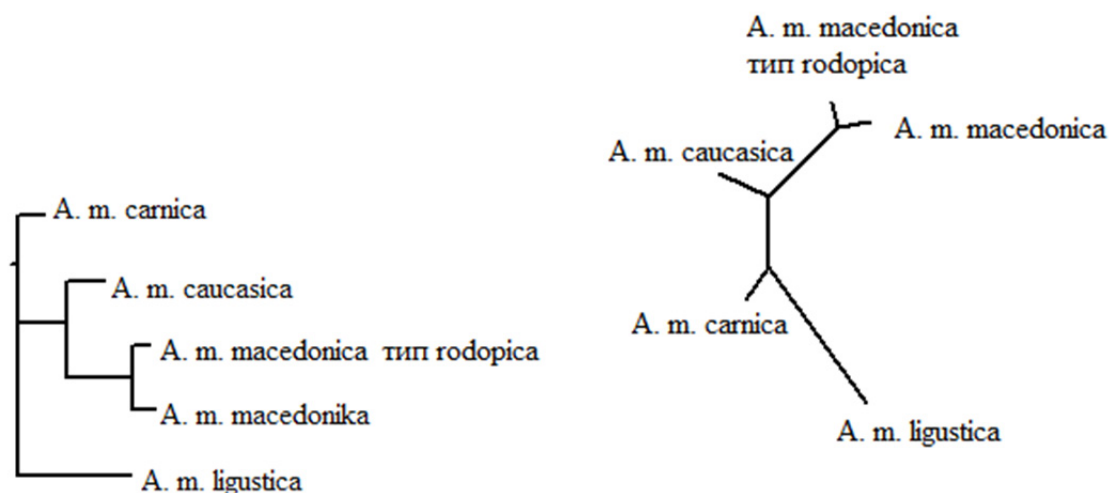
Таблица 62. Генетична дистанция по Nei (1972) между популациите на изследваните подвидове медоносни пчели

Популации	<i>A. m. macedonica</i>	<i>A. m. carnica</i>	<i>A. m. macedonica</i> , тип <i>rodopica</i>	<i>A. m. caucasica</i>	<i>A. m. ligustica</i>
<i>A. m. macedonica</i>	***	0.039	0.012	0.036	0.087
<i>A. m. carnica</i>		***	0.05	0.038	0.042
<i>A. m. macedonica</i> , тип <i>rodopica</i>			***	0.038	0.07
<i>A. m. caucasica</i>				***	0.056
<i>A. m. ligustica</i>					***

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) филогенетични схеми (Фигури 26 и 27). И в двата типа дендрограми *A. m. macedonica* и *A. m. macedonica*, тип *rodopica*, са групирани в общ клъстер с два субклъстера, а *A. m. ligustica*, *A. m. carnica* и *A. m. caucasica* формират три други отделни клъстера.



Фигура 26. Два типа UPGMA дендрограми на изследваните подвидове

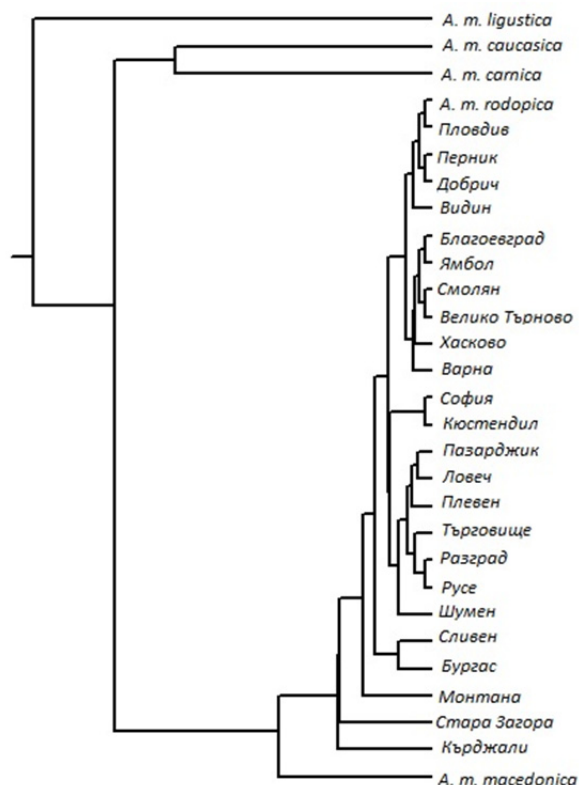


Фигура 27. Два типа Neighbor-joining (NJ) дендрограми на изследваните подвидове

Клъстрирането 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 28. 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 клъстер заедно с *A. m. macedonica*, но формират втори негов клон. 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 Reševa et al. (2015) и Георгиева (2016).

Проучването на литературните данни относно аналогични изследвания върху изоензимния полиморфизъм при популации медоносни пчели в Европа и по света показва наличие на общо седем алела по MDH-1 локуса (Meixner et al., 1994; Kandemir et al., 2000; Ivanova et al., 2010b). Три от тях са описани за популации от Гърция (Bouga et al., 2005b). Различно от това, Dedej et al. (1996) съобщават за присъствието само на два алела на този локус в генофонда на изследваните *A. m. macedonica* популации на територията на Гърция. В настоящото изследване ние констатирахме наличието на три алела на MDH-1 локуса в генофонда на изследваната популация на подвида *A. m. macedonica* с произход Гърция – MDH-1¹⁰⁰, MDH-1⁸⁰ и MDH-1⁶⁵. Алелът MDH-1⁸⁰ не бе констатиран при *A. m. macedonica*, тип *rodopica*, въпреки че бе установен в генофонда на някои от изследваните български популации от областите Търговище, Ловеч, Монтана, Смолян, Хасково и Бургас. MDH-1¹²⁵ алелът присъстваше само в генофонда на изследваната популация от подвида *A. m. carnica* (0.154).



Фигура 28. UPGMA обобщена дендрограма на проучваните български и европейски популации медоносни пчели по области и подвидове

По отношение на ME локуса литературните данни съобщават за наличието на общо пет алела, като три от тях (ME^{90} , ME^{100} и ME^{106}) са констатирани в популациите на *A. mellifera* от Норвегия, Италия и западна бивша Чехословакия (Sheppard and Berlocher, 1984, 1985; Sheppard and McPherson, 1986). В своето проучване Dedej et al. (1996) не откриват полиморфизъм по ME локуса, но Bouga et al. (2005b) коментират, че за популациите на *A. m. macedonica* в Гърция този локус е полиморфен с наличие на два алела. Данните от настоящото проучване също сочат, че този локус е полиморфен и че алелите ME^{100} и ME^{106} присъстват в генофонда на почти всички от изследваните български популации, както и в генофонда на *A. m. macedonica* и *A. m. caucasica* популациите. Алелът ME^{90} бе констатиран в генофонда на значима част от българските популации, както и при популациите медоносни пчели от подвидовете *A. m. macedonica* и *A. m. ligustica*. Алелът ME^{115} бе установен като наличен в генофонда само на една популация от област Благоевград – Илинден, с честота на срещане 0.13 (0.009 общо за областта). Тъй като изчислената честота е достатъчно висока (> 0.05), този алел може да се определи като частен и при не-

обходимост да се използва като надежден генетичен маркер за междупопулационни сравнения.

Установено е, че EST-3 locusът е полиморфен с наличие на три алела (EST-3⁷⁰, EST-3¹⁰⁰ и EST-3¹³⁰) в проучвани популации медоносни пчели от територията на бивша Чехословакия (Sheppard and McPheron, 1986) и в Централна Анатолия (Kandemir and Kence, 1995). Три естеразни алела са описани също и за популациите на *A. m. macedonica* в Гърция (Bouga et al., 2005b), но в настоящото проучване бе констатиран полиморфизъм по този locus с изява на общо шест алелни варианта. Алелът EST-3⁸⁰ бе наличен в генофонда на част от включените в изследването български популации, но не бе открит в изследваната популация на *A. m. macedonica*, тип *rodopica*, подложена на селекционен контрол. Алелният вариант EST-3⁸⁸ бе констатиран в генофонда на *A. m. macedonica* и при някои български популации от областите Варна, Добрич, Монтана и Благоевград. Алелът EST-3⁹⁴ отсъстваше в генофонда на популациите *A. m. carnica* и *A. m. ligustica*, в които обаче бе констатирано присъствието на EST-3¹⁰⁵.

Литературните проучвания показват, че ALP locusът е характеризирани като полиморфен с два алела (ALP¹⁰⁰ и ALP⁸⁰) в изследвани гръцки (Bouga et al., 2005b) и български (Ivanova et al., 2010a) популации медоносни пчели. В настоящото изследване бе констатирано наличието и на трети алел по този locus – ALP⁹⁰, като и трите алела на ALP locusа присъстваха едновременно в генофонда на част от популациите на 11 от обследваните области. Същите три алела бяха установени и в генофонда на изследваните *A. m. carnica* и *A. m. caucasica* популации.

Пръв Del Lama et al. (1985) съобщават за наличието на три алела по отношение на PGM locusа в африканизирани пчелни популации и на два алела в популации на *A. m. carnica* с произход Германия. Meixner et al. (1994) съобщават за три алела на този locus, от които PGM¹²⁰ е бил неизвестен дотогава. Констатиран е полиморфизъм по PGM locusа с налични два алела (PGM¹⁰⁰ и PGM¹¹⁴) в изследвани по-рано български популации (Ivanova et al., 2007, 2010). В настоящото проучване бе установено присъствие освен на съобщените по-горе фосфоглюкомутазни алели, но и на още два алела (PGM⁸⁰ и PGM¹²⁵), характерни за генофонда само на някои от българските популации: PGM⁸⁰ – само в Бръшлян, Бургаско, и PGM¹²⁵ – в единични популации на областите Русе (Коприево), Благоевград (Гайтаниново), Кюстендил (Гюешево), Перник (Горна Мелна), Хасково (Варник) и Сливен. Алелът PGM⁸⁰ бе констатиран и в генофонда на популацията *A. m. caucasica*.

Хексокиназният локус НК е описан като мономорфен в генофонда на популации медоносни пчели от Норвегия, Италия, бивша Чехословакия, Гърция и Германия (Sheppard and Berlocher, 1985; Sheppard and McPheron, 1986; Badino et al., 1988; Del Lama et al., 1990). В африканизирани пчелни популации от Бразилия и Централна Америка този локус е характеризирен като полиморфен с наличие на два алела (НК⁸⁷ и НК¹⁰⁰) (Del Lama et al., 1988, 1990). По-късни проучвания коментират наличието на четири алела по този локус (Kandemir and Kence, 1995). Допълнителен хексокиназен алел (НК⁷⁷) е съобщен в по-ново изследване на Kandemir et al. (2000) по отношение на генофонда на популации от територията на Турция. В настоящото изследване бе констатирано присъствие на три НК алела – НК¹¹⁰, НК¹⁰⁰ и НК⁸⁷. Алелният вариант НК⁸⁷ бе установен само в генофонда на български популации от почти всички области на страната (включително и в генофонда на селекционно контролираната популация *A. m. macedonica*, тип *rodorica*).

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*; НК⁸⁷ – за *A. m. macedonica* (тип *rodorica*). 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 проведения 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 *rodorica*, 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 биохимико-генетично 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. cecropia* и *A. m. carnica* (Ruttner, 1988). Карниолските пчели, *A. m. carnica* Pollmann, са разпространени на територията на бивша Югославия, Южна Австрия, части от Унгария и Румъния. Подвидът *A. m. macedonica* се среща в България, Македония и Северна Гърция (Ruttner, 1988). Както вече бе упоменато, 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 Средиземноморски 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 дават основание да определи областта 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 на проучване на 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 вътревидова 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 на генетичното разнообразие сред популации медоносни пчели в Европа. Изоензимният анализ успешно е прилаган за характеризиране 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 на ефекта на родоначалника (Cornuet, 1979; Sheppard, 1988). Алоензимите се използват успешно за характеризиране на поведенчески (Robinson and Page, 1988, 1989; Robinson et al., 1990) и репродуктивни (Visscher, 1996) особености, за изясняване на 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 на 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 популации от България (Пловдив и Смолян), Гърция (Лариса I и II, Арта, Халкидики и Кастория), Сърбия (Врач и Вране), Черна гора (Бело поле и Сутоморе), Румъния (Букурещ) и Република Македония (Скопие) – Фигура 1.

Таблица 63. Алелни честоти по локуси за изследваните пчелни популации от подвидовете *A. m. macedonica* и *A. m. carnica* на територията на Балканския полуостров

Локус/ алели	<i>A. m. macedonica</i>				<i>A. m. carnica</i>				<i>A. m. macedonica</i>			
	Гърция Лариса I/II	Гърция Арга	Гърция Халкидики	Гърция Кастория	Черна гора Бело поле/ Сутоморе	Сърбия Врач/ Вране	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		

Данните относно изчислените алелни честоти, средният брой алели за локус, нивата на полиморфизъм и хетерозиготност са представени в Таблицы 63 и 64. Филогенетичните връзки са онагледени 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-3¹⁰⁰ се оказва фиксиран в генофонда на популацията от Лариса I (Гърция), а ME¹⁰⁰ – в генофонда на пчелните популации от Сърбия (Таблица 63).

Таблица 64. Среден брой алели за локус, процент на полиморфни локуси, получена (H_o) и очаквана (H_e) хетерозиготност при проучваните популации от подвидовете *A. m. macedonica* и *A. m. carnica* на територията на Балканския полуостров

Популация	Среден брой алели за локус	Процент на полиморфни локуси ($P = 0.95$)	H_o Получена хетерозиготност	H_e Очаквана хетерозиготност
Лариса I Гърция	2.2 ± 0.3	66.7	0.161 ± 0.067	0.247 ± 0.094
Лариса II Гърция	2.5 ± 0.3	50	0.208 ± 0.095	0.235 ± 0.088
Арта, Гърция	2.3 ± 0.2	100	0.237 ± 0.086	0.339 ± 0.085
Халкидики Гърция	2.5 ± 0.2	83.3	0.276 ± 0.09	$0.29 \pm .103$
Кастория Гърция	2.5 ± 0.2	66.7	0.219 ± 0.068	0.242 ± 0.083
Черна гора Бело поле	2.5 ± 0.2	100	0.213 ± 0.075	0.309 ± 0.084
Черна гора Сутоморе	2.3 ± 0.2	100	0.222 ± 0.074	0.262 ± 0.074
Сърбия, Врач	2.2 ± 0.3	83.3	0.254 ± 0.098	0.247 ± 0.083
Сърбия Вране	2.3 ± 0.3	83.3	0.272 ± 0.107	0.285 ± 0.094
Румъния Букурещ	2.2 ± 0.2	100	0.36 ± 0.12	0.389 ± 0.061
България Пловдив	2.5 ± 0.2	83.3	0.234 ± 0.113	0.247 ± 0.074
България Смолян	2 ± 0	66.7	0.196 ± 0.083	0.224 ± 0.086
Македония Скопие	2.5 ± 0.2	83.3	0.166 ± 0.088	0.248 ± 0.083

Таблица 65. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираните пчелни популации от подвидовете *A. m. macedonica* и *A. m. carnica* на територията на Балканския полуостров

[illegible]

Общият преглед на констатирания полиморфизъм показва наличие на четири алела за MDH-1 локуса (MDH-1⁶⁵, MDH-1⁸⁰, MDH-1¹⁰⁰ и MDH-1¹²⁵), три – за ME локуса (ME⁹⁰, ME¹⁰⁰ и ME¹⁰⁶), шест – за EST-3 (EST-3⁸⁰, EST-3⁸⁸, EST-3⁹⁴, EST-3¹⁰⁰, EST-3¹⁰⁵ и EST-3¹¹⁸), три – за ALP (ALP⁸⁰, ALP⁹⁰ и ALP¹⁰⁰), два – за PGM (PGM¹⁰⁰ и PGM¹¹⁴), и четири – за HK (HK⁸⁷, HK¹⁰⁰, HK¹¹⁰ и HK¹²¹). *Алелът MDH-1¹²⁵ бе констатиран като наличен само в генофонда на сръбската популация Вране, MDH-1⁸⁰ – в гръцките популации (с изключение на Лариса II) и в популацията от Скопие (Република Македония), EST-3⁸⁸ – в Лариса II (Гърция) и Скопие, Р. Македония, HK⁸⁷ – в генофонда на пчелната популация Пловдив (България), и HK¹²¹ – само в сръбските популации (Врач и Вране).* MDH-1⁶⁵ алелът показва най-висока честота на срещане в генофонда на сръбската популация Врач (0.6), а MDH-1¹⁰⁰ алелът – в генофонда на Кастория, Гърция (0.774). Алелът EST-3⁸⁰ бе открит в генофонда на Арта и Халкидики, Гърция, а също и в черногорската популация Сутоморе и сръбската Врач, с ниска честота на срещане (0.027, 0.025 и 0.027 съответно). Алелът EST-3⁹⁴ присъстваше в генофонда на Лариса II, Пловдив и Скопие, а EST-3¹⁰⁵ – в Лариса, Халкидики, Кастория (Гърция) и Бело поле (Черна гора). EST-3¹¹⁸ алелът не се изяви в генофонда на пчелните популации от Лариса – I и II, Халкидики (Гърция) и Скопие (Република Македония). Алелът ALP⁸⁰ не бе открит в генофонда на Сутоморе, Врач и Букурещ, а алелът ALP⁹⁰ – в Арта (Гърция), Пловдив, Смолян (България) и Скопие (Република Македония). Алелът ALP¹⁰⁰ се срещаше с най-висока честота в генофонда на пчелната популация от Вране (0.600). Алелите PGM¹⁰⁰ и HK¹⁰⁰ бяха с висока честота на срещане в генофонда на всички изследвани популации (диапазон 0.786 – 0.981 и 0.767 – 0.984 съответно), за разлика от PGM¹¹⁴ и HK¹¹⁰ алелите, чиято честота на срещане бе значително по-ниска.

Средният брой алели за локус варираше от 2.0 (Смолян, България) до 2.5 (Лариса II, Халкидики, Кастория – Гърция, Бело 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, Бело поле и Сутоморе – Черна гора, и Букурещ – Румъния) (Таблица 64). Експериментално получената и очакваната хетерозиготност (H_o и H_e) варираха от 0.161 ± 0.067 (Лариса I, Гърция) до 0.36 ± 0.12 (Букурещ, Румъния) и от 0.224 ± 0.086 (Смолян, България) до 0.389 ± 0.061 (Букурещ, Румъния) съответно. Бяха констатирани отклонения в генотипните честоти по закона на Харди – Вайнберг за значима част от популациите, но по

отношение на повечето от анализирани локуси P беше ≥ 0.01 . Чрез прилагане на метода на нулевата хипотеза χ^2 (df: 1 – 6) бяха установени отклонения основно в полза на хомозиготите при някои от изследваните локуси.

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.

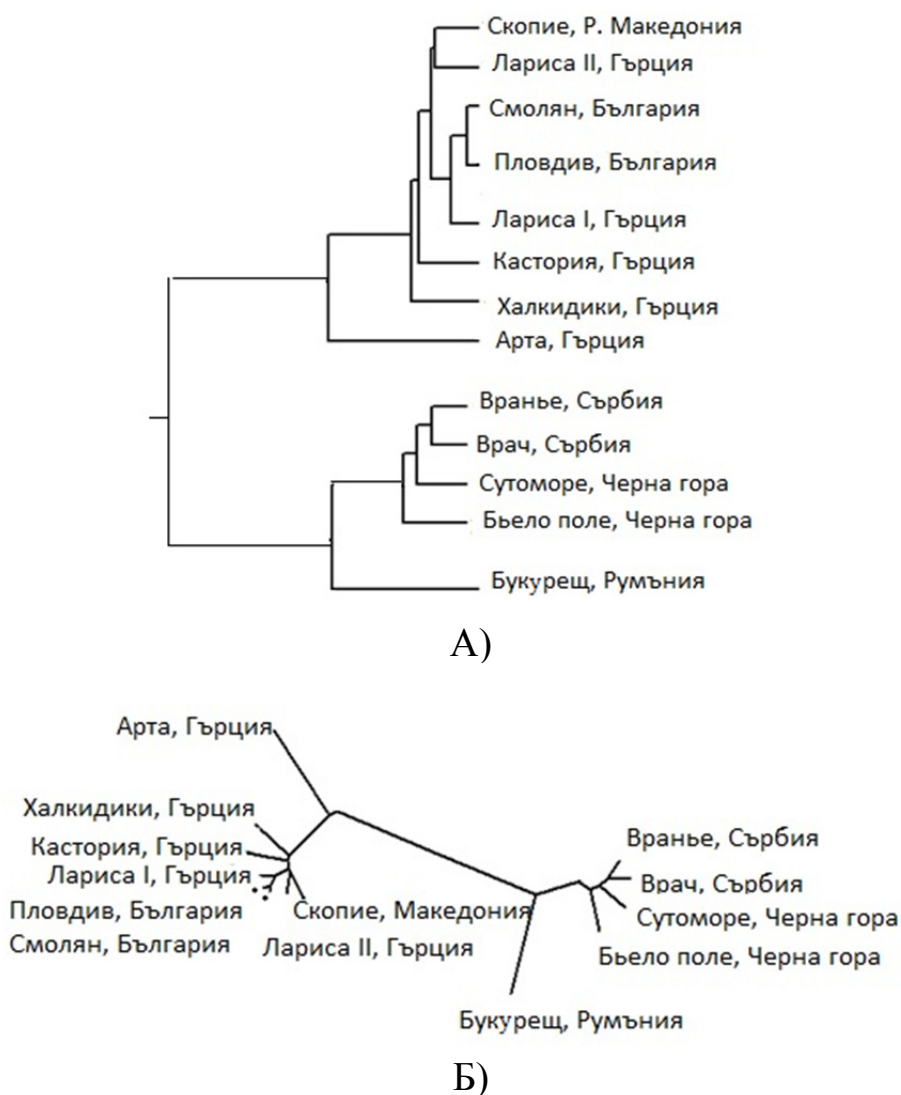
Генетичната дистанция по Nei (1972) варираше в границите от 0.001 (между сръбската популация Врач и черногорската Сутоморе) до 0.141 (между Арта – Гърция, и Букурещ – Румъния) – Таблица 65.

В UPGMA и Neighbor-joining дендрограмите популациите от България, Гърция и Македония са клъстрирани отделно от популациите на Сърбия, Черна гора и Румъния (Фигура 29), което потвърждава различната им подвидова принадлежност.

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

От четирите установени малатдехидрогеназни алела MDH-1¹⁰⁰ вариантът бе с по-висока честота на срещане в повечето от изследваните популации с изключение на Арта и Халкидики (Гърция), Сутоморе (Черна гора) и Врач (Сърбия). Алелът MDH-1⁸⁰ се срещаше в генофонда на гръцките популации (с изключение на Лариса II) и в македонската популация от Скопие. Тези данни са в съгласие с установеното от Bouga et al. (2005) наличие на три алела по този локус за изследваните от тях популации медоносни пчели на територията на Гърция, но се различават от представената от Dedej et al. (1996) информация за наличие на двуалелен полиморфизъм по MDH-1 локуса в изследвани от екипа му гръцки популации от подвида *A. m. macedonica*. Установеният в настоящото проучване триалелен полиморфизъм по този локус е характерен освен за гръцките популации медоносни пчели, също и за изследваната популация от Република Македония. Наличието на този алел в генофонда на популации от подвида *A. m. macedonica* и липсата му при популациите от *A. m. carnica* би могло успешно да се използва при разграничаване на двата подвида. **От друга страна, отсъствието на MDH-1⁸⁰ 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.**

При характеризирането на алоензимните генетични маркери за разграничаване на изследваните популации заслужава да се обърне внимание и на факта, че MDH-1¹²⁵ алелът бе открит в генофонда само на сръбската популация Вране (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-1⁶⁵ и MDH-1¹⁰⁰, бяха с еднакви честоти (0.5).



Фигура 29. UPGMA (А) и Neighbor-joining (Б) дендрограми на изследваните популации от подвидовете *A. m. macedonica* и *A. m. carnica* на територията на Балканския полуостров

По отношение на трите установени алела на ME локуса от генетична гледна точка е важно да се отбележи, че предвид данните от настоящото изследване ME¹⁰⁰ алелът бе фиксиран в сръбските популации (1.0) – удачен маркер, който може да се използва при дискриминирането им сред други популации от територията на Балканите. Алелът ME⁹⁰ се оказа със сравнително значимо по-висока честота (0.267) в генофонда на популацията от Букурещ (Румъния), което също го прави подходящ генетичен маркер при характеризиране на полиморфизма в балканските популации. Алелът ME¹⁰⁶ бе с най-висока честота на срещане в гръцката популация Арта (0.196). Присъствието и на трите ME алела бе установено в генофонда на популациите от Черна гора, Румъния, Р. Македония и българската популация Пловдив. Противоположни на това са данните от проучването на Dedej et al. (1996), които съобщават, че ME локусът не е полиморфен за изследваните от тях балкански популации, но според Bouga et al. (2005b) този локус се характеризира с двуалелен полиморфизъм в популации на подвида *A. m. macedonica* от Гърция. В настоящото изследване EST-3 локусът се характеризираше с по-сложен полиморфизъм и с установени общо шест алелни варианта в проучваните популации медоносни пчели на територията на Балканския полуостров. Алелът EST-3¹⁰⁰ бе с най-висока честота и фиксиран в една от изследваните популации – Лариса I (Гърция). В своето проучване върху изoenзимния полиморфизъм, характерен за пчелни популации, принадлежащи към подвида *A. m. macedonica* от Гърция, Bouga et al. (2005b) коментират присъствието на три естеразни алела. Резултатите от настоящото проучване са в съгласие с това с тази особеност, че в генофонда на една от изследваните гръцки популации (Лариса II) бе констатирано присъствието на четири алела – EST-3⁸⁸, EST-3⁹⁴, EST-3¹⁰⁰ и EST-3¹⁰⁵. Във всички останали проучвани популации EST-3 локусът показваше дву- или триалелен полиморфизъм, изявен главно в различни генотипни комбинации на EST-3¹⁰⁰ алела с някой от другите пет по-рядко срещани се варианта.

За отбелязване е фактът, че EST-3⁸⁸ 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 характеризиране 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 (ALP¹⁰⁰ и

ALP⁸⁰) с по-висока честота на срещане за ALP⁸⁰ алела в генофонда на изследвани гръцки и български популации на *A. m. macedonica*, в настоящото проучване бе констатирано присъствието и на трети алел – ALP⁹⁰, 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, той би могъл да се използва като добър генетичен маркер за междупопулационни сравнения на подвидово ниво. ALP⁸⁰, 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 пониска 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 (PGM¹⁰⁰ и PGM¹¹⁴), което е в съгласие с резултатите от предходни изследвания на Ivanova et al. (2007, 2010). Алелът PGM¹¹⁴ бе с най-висока честота на срещане в гръцката популация Арта (0.214).

В настоящото изследване НК се оказа полиморфен с четириалелна система на унаследяване за разлика от данните на Sheppard and Berlocher (1985), Sheppard and McPheron (1986), Badino et al. (1988) и Del Lama et al. (1990), които констатираха липса на полиморфизъм по този локус в пчелни популации от Европа. Двуалелен полиморфизъм по този локус (НК⁸⁷ и НК¹⁰⁰) е докладван за популации от Бразилия и Централна Америка (Del Lama et al., 1988, 1990), а триалелен полиморфизъм (с присъствие и на алела НК⁷⁷) – за пчелни популации на територията на Турция (Kandemir and Kence, 1995; Kandemir et al., 2000). В настоящото изследване бе установено наличие на четири алела по този локус, като два от тях – НК¹⁰⁰ и НК¹¹⁰, присъстваха в генофонда на всички изследвани популации на *A. m. macedonica* и *A. m. carnica*. **Алелът НК⁸⁷ бе открит само в генофонда на българската популация Пловдив (0.063), а алелът НК¹²¹ – 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 упоменатите по-горе специфични характеристики на алелно присъствие и алелни честоти по отношение на някои от анализиранияте локуси позволява по-ясното отдиференциране на изследваните пчелни популации от двата подвида.

Изчислените генетични дистанции (Nei, 1972) (Таблица 65), средната стойност на фиксационния индекс F_{ST} и топологията на двете дендрограми (Фигура 29) 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 клъстер, 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 подклъстер на *A. m. macedonica* групата, както и популацията от Румъния е в различен подклъстер 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 на необходимостта да се определи точно генетичният 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. cecropia* 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 акция 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 акция 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 медоносните 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 се 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 анализ (Meixner et al., 2013; Francis et al., 2014). На Фигура 2. са представени тестлокациите на изследваните пчелни популации от територията на Европа (по 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 HK (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-1⁶⁵, MDH-1⁸⁰ и MDH-1¹⁰⁰), три алела по ME локуса (ME⁹⁰, ME¹⁰⁰ и ME¹⁰⁶), седем алела – по EST-3 локуса (EST-3⁸⁰, EST-3⁸⁸, EST-3⁹⁴, EST-3¹⁰⁰, EST-3¹⁰⁵, EST-3¹¹⁸ и EST-3¹³⁰), три алела – по ALP локуса (ALP⁸⁰, ALP⁹⁰ и ALP¹⁰⁰), два алела по PGM локуса (PGM¹⁰⁰ и PGM¹¹⁴) и три алела по HK локуса (HK⁸⁷, HK¹⁰⁰ и HK¹¹⁰).

Детайлите от получените в това сравнително изследване резултати относно алелните честоти, средния брой алели за локус, процента на полиморфните локуси ($P = 0.95$), получената (Ho) и очакваната (He) хетерозиготност и генетичните дистанции са представени в Таблици 66 – 68. На фигурите 30 и 31 чрез UPGMA и Neighbor-joining дендрограми са конструирани 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 ME¹⁰⁰, EST¹⁰⁰, PGM¹⁰⁰ и HK¹⁰⁰ бяха с най-висока честота на срещане в генофонда на всички изследвани популации, MDH-1 и ALP локусите имаха различни по-често срещани се 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-1¹⁰⁰, в генофонда на популациите от подвида *A. m. mellifera* с произход Дания и Полша по-често срещаният алел бе MDH-1⁸⁰ и в генофонда на популациите от подвида *A. m. carnica* с произход Германия, Хърватия и Австрия и

подвида *A. m. ligustica* с по-висока честота се срещаше алелът MDH-1⁶⁵. По отношение на ALP локуса бе установено, че алелът ALP⁸⁰ 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 ALP¹⁰⁰ – с по-висока честота в популациите на *A. m. macedonica* от Гърция и *A. m. carnica* от Полша. Алелът ALP⁹⁰ се срещаше със значително по-ниска честота или липсваше в генофонда на *A. m. macedonica* (Таблица 66).

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-1⁸⁰ отсъства в генофонда на популациите *A. m. macedonica* от България и Република Македония. Относно ME локуса бе установено, че алелът ME¹⁰⁶ 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 ME⁹⁰ алелът се среща с честота от порядъка на 0.019 до 0.276. Във всички останали изследвани популации ME¹⁰⁶ беше наличен и честотата му варираше между 0.018 и 0.19. Проучването на полиморфизма по EST-3 локуса показва, че алелът EST-3⁸⁰ присъства само в генофонда на популацията *A. m. mellifera* от Дания (0.026), а алелът EST-3¹³⁰ (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-3⁸⁸ 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-3⁹⁴ бе открит в популациите на *A. m. carnica* от Полша и *A. m. macedonica* от България и Гърция. Алелният вариант EST-3¹⁰⁵ 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 EST¹¹⁸ бе установен като наличен в генофонда на по-голямата част от изследваните популации (Таблица 66). 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 ALP⁸⁰ и ALP⁹⁰ алелите бяха с еднаква честота) и *A. m. macedonica* от България и Република Македония (където

ALP¹⁰⁰ и ALP⁸⁰ бяха със сходна или еднаква честота респективно). По отношение на PGM локуса бе констатирано, че PGM¹⁰⁰ алелът е фиксиран в генофонда на популацията от подвида *A. m. siciliana*. Полиморфният хексокиназен локус (НК) бе с три алелни варианта (НК⁸⁷, НК¹⁰⁰ и НК¹¹⁰) в популациите на *A. m. mellifera* от Полша, *A. m. ligustica* от Италия и *A. m. macedonica* от България.

Отчетените тук характеристики са значими, 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*.

Както е видно от Таблица 67, 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 очакваната 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.

Таблица 66. Алелни честоти по локуси за изследваните европейски популации на *Apis mellifera*

Локус	Попу- ляция	A. m. carni са Пол- ша 1	A. m. carni са Пол- ша 2	A. m. carnica Гер- мания 1	A. m. carnica Гер- мания 2	A. m. carnica Хърва- тия	A. m. carnica Авст- рия	A. m. mellife га Фран- ция	A. m. mellife га Дания	A. m. mellife га Пол- ша	A. m. ligustica Фин- ландия	A. m. ligusti са Ита- лия	A. m. sicilia па Ита- лия	A. m. macedo- nica Р. Ма- кедония	A. m. macedo- nica Гърция	A. m. macedo- nica Бълга- рия
MDH-1	Алели	65	0.4	0.079	0.511	0.837	0.756	0.386	0.022	0.293	0.674	0.598	0.098	0.348	0.227	0.337
		100	0.52	0.789	0.457	0.13	0.156	0.25	0.244	0.13	0.283	0.239	0.696	0.652	0.682	0.663
		80	0.08	0.132	0.033	0.033	0.089	0.364	0.733	0.576	0.043	0.163	0.207	0	0.091	0
ME		100	0.891	0.9	0.886	0.957	0.944	0.933	0.813	0.94	0.724	0.833	0.741	0.93	0.958	0.885
		106	0.109	0.1	0.114	0	0.056	0	0	0.06	0	0.119	0	0.018	0.042	0.096
		90	0	0	0	0.043	0	0.067	0.188	0	0.276	0.048	0.259	0.053	0	0.019
EST-3		80	0	0	0	0	0	0	0.026	0	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	0.739	0.88	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	0.076	0.087	0.12	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	0.026	0.033	0.076	0.13	0	0	0.012	0
ALP		130	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.043	0	0	0	0
		80	0.389	0.324	0.25	0.405	0.429	0.5	0.413	0.543	0.44	0.714	0.528	0.5	0.4	0.547
		100	0.407	0.5	0.25	0.238	0.238	0	0.196	0.174	0.217	0.071	0.111	0.5	0.5	0.453
PGM		90	0.204	0.176	0.5	0.357	0.333	0.5	0.391	0.283	0.33	0.214	0.361	0	0.1	0
		100	0.935	0.913	0.872	0.911	0.903	0.848	0.935	0.958	0.75	0.579	1	0.981	0.947	0.942
		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
HK		87	0.017	0.016	0	0	0	0.162	0.022	0.174	0	0.138	0	0	0	0.051
		100	0.983	0.984	0.909	0.946	0.984	0.838	0.978	0.826	0.864	0.759	0.935	0.919	0.974	0.927
		110	0	0	0.091	0.054	0.016	0	0	0.05	0.136	0.103	0.065	0.081	0.026	0.022

Таблица 67. 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 _o Получена хетерозиготност	H _e Очаквана хетерозиготност
A. m. carnica Полша 1	2.3 ± 0.2	66.7	0.232 ± 0.095	0.273 ± 0.111
A. m. carnica Полша 2	2.7 ± 0.3	83.3	0.238 ± 0.054	0.274 ± 0.085
A. m. carnica Германия 1	2.5 ± 0.2	100	0.268 ± 0.079	0.344 ± 0.08
A. m. carnica Германия 2	2.3 ± 0.2	83.3	0.235 ± 0.065	0.266 ± 0.088
A. m. carnica Хърватия	2.3 ± 0.2	83.3	0.261 ± 0.084	0.278 ± 0.094
A. m. carnica Австрия	2.3 ± 0.2	100	0.264 ± 0.089	0.345 ± 0.064
A. m. mellifera Франция	2.3 ± 0.2	83.3	0.262 ± 0.109	0.307 ± 0.114
A. m. mellifera Дания	2.5 ± 0.2	83.3	0.239 ± 0.075	0.3 ± 0.08
A. m. mellifera Полша	2.5 ± 0.2	66.7	0.308 ± 0.14	0.271 ± 0.105
A. m. ligustica Финландия	2.5 ± 0.2	100	0.286 ± 0.049	0.403 ± 0.061
A. m. ligustica Италия	3 ± 0.3	100	0.374 ± 0.071	0.439 ± 0.037
A. m. siciliana Италия	2.2 ± 0.3	83.3	0.206 ± 0.092	0.297 ± 0.091
A. m. macedonica Р. Македония	2.2 ± 0.2	66.7	0.155 ± 0.071	0.223 ± 0.086
A. m. macedonica Гърция	2.5 ± 0.3	66.7	0.2 ± 0.096	0.219 ± 0.088
A. m. macedonica България	2.5 ± 0.2	83.3	0.234 ± 0.113	0.247 ± 0.074

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

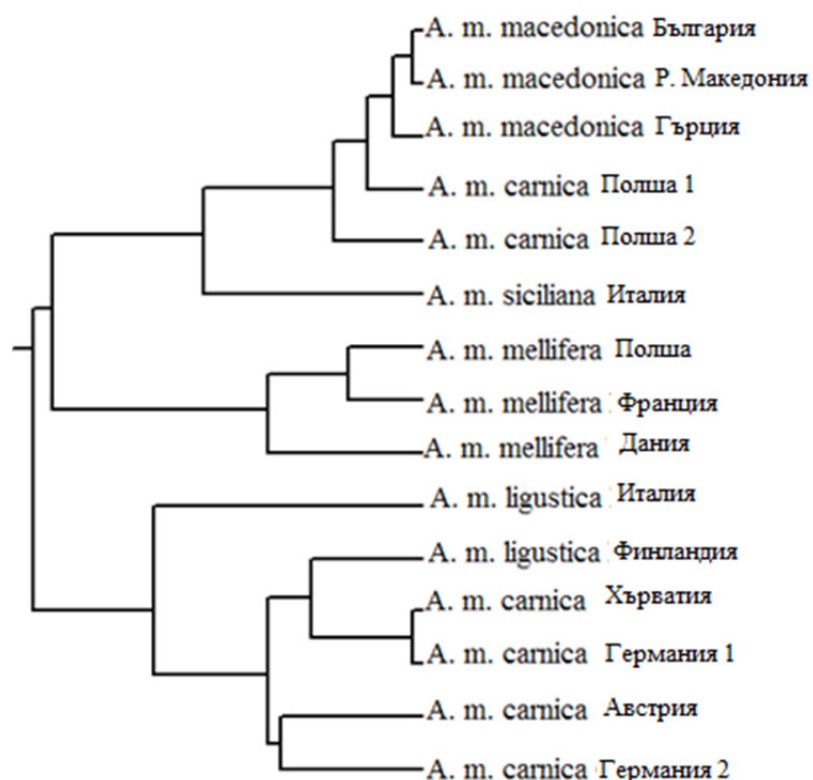
Изчисленият на базата на изоензимния анализ коефициент F_{ST} беше 0.133, което показва, че от констатираната обща генетична изменчивост 13.3% е междупопулационна за разлика от вътрепопулационната, която се равнява на 86.7%.

Таблица 68. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираниите европейски популации *Apis mellifera*

Популация	A. m. carnica Полша 1	A. m. carnica Полша 2	A. m. carnica Германия 1	A. m. carnica Германия 2	A. m. carnica Хърватия	A. m. carnica Австрия	A. m. mellifica Франция	A. m. mellifica Дания	A. m. mellifica Полша	A. m. ligustica Финландия	A. m. ligustica Италия	A. m. siciliana Италия	A. m. macedonica Р. Македония	A. m. macedonica Гърция	A. m. macedonica България
A. m. carnica, Полша 1	*****	0.025	0.026	0.055	0.043	0.053	0.033	0.102	0.057	0.05	0.094	0.049	0.013	0.013	0.012
A. m. carnica, Полша 2		***	0.063	0.144	0.122	0.127	0.076	0.116	0.101	0.12	0.165	0.046	0.025	0.008	0.024
A. m. carnica Германия 1			***	0.039	0.034	0.033	0.036	0.139	0.08	0.041	0.094	0.069	0.06	0.053	0.061
A. m. carnica Германия 2				***	0.002	0.035	0.04	0.167	0.08	0.025	0.067	0.128	0.089	0.109	0.092
A. m. carnica Хърватия					***	0.028	0.028	0.143	0.063	0.027	0.059	0.111	0.077	0.094	0.077
A. m. carnica Австрия						***	0.036	0.118	0.065	0.038	0.047	0.085	0.099	0.108	0.089
A. m. mellifera Франция							***	0.049	0.017	0.048	0.078	0.051	0.067	0.071	0.068
A. m. mellifera Дания								***	0.023	0.147	0.15	0.071	0.128	0.133	0.126
A. m. mellifera Полша									***	0.089	0.094	0.079	0.088	0.1	0.088
A. m. ligustica Финландия										***	0.046	0.09	0.075	0.093	0.076
A. m. ligustica Италия											***	0.139	0.12	0.141	0.107
A. m. siciliana (sicula) Италия												***	0.055	0.05	0.054
A. m. macedonica Р. Македония													***	0.006	0.002
A. m. macedonica Гърция														***	0.007
A. m. macedonica България															***

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) – Таблица 68.

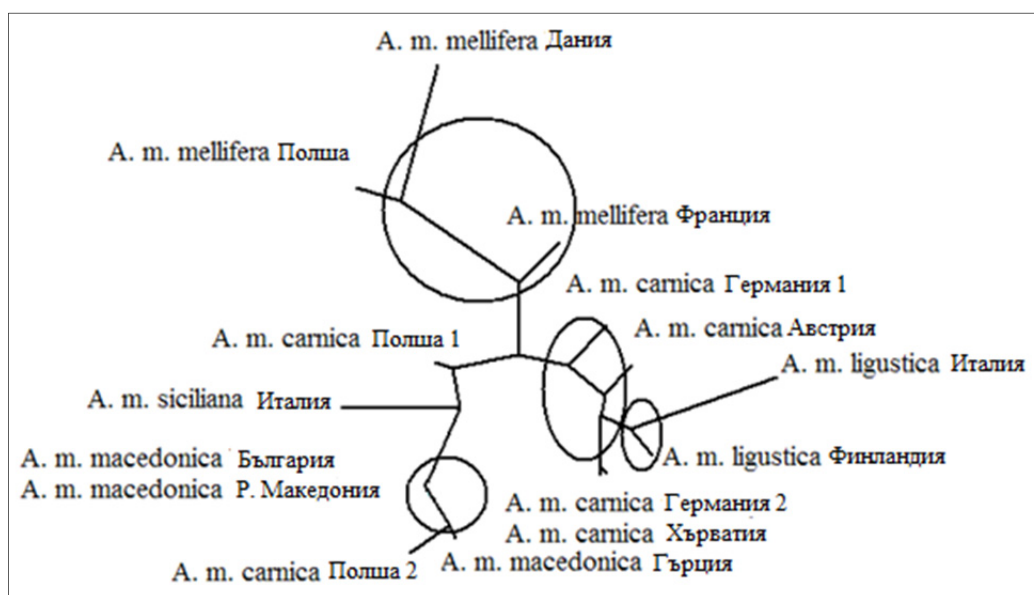
В UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) и Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) дендрограмите бяха формирани три основни клъстера с шест суб-клъстера (Фигури 30 и 31), които показваха ясно разграничаване на популациите от различните подвидове на *A. m. mellifera*.



Фигура 30. UPGMA дендрограма на анализираните европейски популации на *Apis mellifera*, базирана на алоензимен анализ

И от двете фигури е видно ясното клъстриране 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 подклъстери 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. carnica* 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 31. Neighbor-joining дендрограма на анализираните европейски популации *Apis mellifera*, базирана на алоензимен анализ

С оглед на по-голяма прецизност на направените сравнения, базирани на алоензимния анализ, получените резултати от GEI експеримента бяха обработени и със софтуерния продукт GenAlEx 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 са представени на Фигури 32 – 35 (Приложение). В повечето графични изображения е видно ясното разграничение на 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 произход 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 медоносни 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. Българската медоносна пчела, макар и клъстрирана в общ клъстер с другите популации на подвида *A. m. macedonica* от Гърция и Р. Македония, формира отделен субклъстер и може да се разграничи на биохимико-генетично 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 алелно разнообразие, както и описаните значими разлики в честотата на срещане на определени алели в генофонда на проучваните пчелни популации са важен оригинален принос в характеризирането 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 алоензимния 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 екотиповете 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 бигеографското 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 (Garner et al., 1998a).

Важна 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; Garner 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), 1028bp и 822bp 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 наличен 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 69 – 71.

Таблица 69. Размери (в базови двойки – bp) на фрагментните образци, установени по отношение на 16s rDNA гена в анализираните 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>
В	А	А	А	А
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 ядрената изменчивост би могло да се дължи на различните модели на трансмисия и еволюция на тези генетични системи (Moritz et al., 1986; Avise, 1994).

Таблица 70. Размери (в базови двойки – bp) на фрагментните образци, установени по отношение на COI гена в анализираните 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>
В	А	А	А	А	А	В	А
1028	371	476	465	1028	1028	1028	1028
	349	425	326				
	280	127	237				
	28						

Таблица 71. Размери (в базови двойки – bp) на фрагментните образци, установени по отношение на ND5 гена в анализираните 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>
А	А	А	А	А	А
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), можем да направим 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 данните 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 сравняването им с данни, публикувани от Kekesoglu et al. (2009) относно генетични проучвания на пчелни популации от територията на Турция, интересен се оказва фактът, че *Dra I* няма рестрикционен сайт в 16s rDNA генния сегмент на анализираните български и турски популации. Това сходство следва да е обект и на следващи по-детайлни генетични сравнения с оглед на определяне на 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 клъстрират българските популации в групата на *A. m. macedonica*. По отношение на коментираните 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 на 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.

Литературните данни сочат, че при насекомите микросателитите варират по разположение и композиции. Значително равномерното им разпределение в генома ги прави лесни за откриване чрез PCR. Установено е, че фактори като брой, последователност и дължина на повторенията, фрагментации в микросателитите, скорост на рекомбинация и степен на транскрипция оказват влияние върху микросателитната еволюционна динамика (Schlötterer, 2000). 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 локуса 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 FA0803COLOSS 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.

Както 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 – с произход България; *A. m. macedonica* G – с произход Гърция, и *A. m. macedonica* M – с

произход Република Македония, с референтни данни за подвидовете *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. mellifera* и *A. m. anatoliaca*.

Настоящото проучване показва, че всички включени в изследването 24 микросателитни локуса са полиморфни с наличие на общо 260 алелни варианта. 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 изявения полиморфизъм по всеки локус, алелните варианти в генофонда на проучваните популации и алелните честоти.

Както е видно от Таблица 72, A8 микросателитният локус е полиморфен с изявени 9 алелни варианта. В генофонда на българската популация *A. m. macedonica* Bg (включваща проби от 32 местонахождения на територията на страната), както и при селекционно контролираната популация *A. m. macedonica* B бяха открити 4 алела – 175, 177, 179 и 181, като с най-висока честота на срещане бе 177 (Фигура 36). Този алелен вариант се оказа най-често срещаният и в генофонда на другите *A. m. macedonica* популации, както и при *A. m. carnica*. От тези посочени популации алелът 177 бе с малко по-ниска честота при *A. m. macedonica* с произход Република Македония. Алелът 175, открит в генофонда на всички *A. m. macedonica* популации с честота от порядъка на 0.115 (*A. m. macedonica* B) – 0.261 (*A. m. macedonica* Mac), беше с ниска честота в популациите на подвидовете *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* (0.024 и 0.014 съответно), липсваше в генофонда на *A. m. mellifera* и бе най-често срещаният алел в генофонда на *A. m. anatoliaca* (0.610). Алелът 179 бе с най-ниска честота в генофонда на българските популации (неконтролирана и селекционно контролирана), а 181 – с най-висока такава в сравнение с другите произходи на подвида *A. m. macedonica* (Фигура 36 – Приложение).

Таблица 72. Полиморфизъм по A8 локуса: алели и алелни честоти

Локус A8	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.	162	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	165	0.000	0.000	0.023	0.024	0.081	0.798	0.007	0.000	0.019	0.000
3.	173	0.000	0.042	0.091	0.048	0.014	0.096	0.147	0.038	0.019	0.167
4.	175	0.227	0.167	0.261	0.024	0.014	0.000	0.610	0.115	0.212	0.250
5.	176	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6.	177	0.523	0.583	0.432	0.571	0.203	0.058	0.154	0.519	0.558	0.333
7.	179	0.068	0.167	0.091	0.071	0.432	0.000	0.037	0.019	0.077	0.167
8.	181	0.182	0.042	0.091	0.262	0.216	0.029	0.044	0.308	0.115	0.083
9.	183	0.000	0.000	0.011	0.000	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Микросателитният локус A14 се оказа полиморфен с общо 8 алелни варианта (Таблица 73), четири от които присъстващи в генофонда на неконтролираните и контролираните български популации – 110, 112, 114 и 118. Алелът 110 бе с най-висока честота при всички включени в изследването произходи и подвидове с изключение на *A. m. macedonica* B, където най-често срещан се оказа алелният вариант 112 (0.5). По отношение на останалите *A. m. macedonica* популации прави впечатление фактът, че броят на алелите в генофонда им е по-малък, съответно 2 – за популацията с произход Гърция, и 3 – за популацията с произход Република Македония – Фигура 37 (Приложение).

Таблица 73. Полиморфизъм по A14 локуса: алели и алелни честоти

Локус A14	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.	108	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	110	0.625	0.792	0.682	0.810	0.639	0.375	0.150	0.444	0.556	0.667
3.	112	0.292	0.208	0.307	0.167	0.014	0.034	0.793	0.500	0.389	0.333
4.	114	0.042	0.000	0.011	0.000	0.028	0.227	0.050	0.037	0.019	0.000
5.	116	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.102	0.007	0.000	0.000	0.000
6.	118	0.042	0.000	0.000	0.024	0.069	0.227	0.000	0.019	0.000	0.000
7.	120	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.019	0.000
8.	122	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.019	0.000

По-голямо алелно разнообразие и присъствие на общо 5 алела, три от които с ниска честота на срещане (0.019), бе установено за включената в GEI експеримента местна популация от Гърция (*A. m. macedonica* G).

Алелът 118, присъстващ с ниска честота в българските популации (неконтролирана и селекционно контролирана), не бе констатиран в генофонда на останалите *A. m. macedonica* популации, но присъстваше като рядък алел в генофонда на *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и с по-висока честота на срещане (0.227) – при *A. m. mellifera* (Фигура 37) – подвид, за който бе констатиран и един рядък частен алел на този локус (0.011) – Таблица 73.

Общо шест алела бяха установени за микросателитния A24 локус (Таблица 74), като три от тях (104, 106 и 108) присъстваха в генофонда на неконтролираната българска популация и пет – при селекционно контролираната *A. m. macedonica* B. Алелът 96 присъстваше с ниска честота в генофонда на *A. m. macedonica* B, *A. m. macedonica* G (0.019), *A. m. anatoliaca* (0.021) и *A. m. carnica* (0.048) и със значител-

но по-висока честота – в популациите на *A. m. ligustica* (0.162) и *A. m. mellifera* (0.731). Алелът 102, открит в генофонда на *A. m. macedonica* В, присъстваше и в генофонда на *A. m. macedonica* G със същата честота (0.019) и при *A. m. anatoliaca* – като много рядък вариант с честота на срещане 0.007.

Алелните варианти 104 и 106 бяха с висока честота на срещане във всички *A. m. macedonica* популации (Фигура 38), като 106 бе по-честият от двата алела. Алелът 108 се срещаше с ниска честота (0.021 и 0.019) освен в българските популации (неконтролирана и контролирана), но още и в генофонда на *A. m. macedonica* Mac (с произход Република Македония) – с честота 0.011, и в генофонда на *A. m. anatoliaca* – с честота 0.036.

Таблица 74. Полиморфизъм по A24 локуса: алели и алелни честоти

Локус A24	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.	96	0.000	0.000	0.000	0.048	0.162	0.731	0.021	0.019	0.019	0.000
2.	101	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	102	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.019	0.019	0.000
4.	104	0.417	0.409	0.420	0.452	0.203	0.163	0.336	0.404	0.404	0.500
5.	106	0.563	0.545	0.568	0.500	0.635	0.106	0.600	0.538	0.558	0.500
6.	108	0.021	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.036	0.019	0.000	0.000

Най-голямо бе алелното разнообразие (5 от шест алела) в селекционно контролираната българска популация на местната пчела *A. m. macedonica* В – Таблица 74 и Фигура 38 – Приложение.

Микросателитният локус A24 е проучван и по-рано от Николова (2011), която установява за генофонда на проучваните от нея български популации присъствието на други 5 алела – 90, 92, 94, 98 и 100, без да описва представените в настоящото проучване 106 и 108 варианти. Тук получените резултати допълват по-рано публикуваните от Николова (2011) данни и допринасят за по-детайлно характеризиране на генетичния полиморфизъм сред популациите на българската медоносна пчела по този локус.

Локусът A29 се оказа най-полиморфният сред анализирания в това проучване микросателитни локуси. В генофонда на включените в изследването пчелни популации с различен произход и различна подвидова принадлежност този локус бе представен от общо 31 алела, общо 15 от които налични в неконтролираната и селекционно контролираната българска популация – Таблица 75.

Таблица 75. Полиморфизъм по **A29** локуса: алели и алелни честоти

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

По отношение на този локус бяха открити и частни алели, характеризиращи *A. m. anatoliaca* (129), *A. m. mellifera* (133, 136, 140, 168), *A. m. carnica* (181) и *A. m. macedonica* Mac (142, 144). По отношение на неконтролираната и контролираната българска популация не бяха констатирани частни алели по този локус, но като маркери за сравнение с другите *A. m. macedonica* популации могат да се използват алелите 137 и 175, първият от които се среща освен при *A. m. mellifera* (0.021), в генофонда само на българските *A. m. macedonica* популации с честота 0.023 и 0.063, а вторият, с честота 0.031 – в генофонда на селекционно контролираната *A. m. macedonica* В популация и при *A. m. carnica* (0.056) и

A. m. ligustica (0.014). Алелът с най-висока честота на срещане (0.205) в проучваната неконтролирана българска популация бе 159. С най-висока честота на срещане в генофонда на подложената на селекционен контрол *A. m. macedonica* В бяха алелите 151 и 171 (0.156). Най-голямо алелно разнообразие с присъствие на 20 алелни варианта бе констатирано в генофонда на общата *A. m. macedonica* Мас популация с произход Република Македония (Фигура 39 – Приложение).

Таблица 76. 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>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.	115	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	118	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	122	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4.	123	0.167	0.200	0.102	0.167	0.068	0.000	0.043	0.300	0.060	0.250
5.	124	0.000	0.000	0.011	0.095	0.257	0.779	0.000	0.000	0.060	0.000
6.	128	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000
7.	130	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.020	0.000
8.	134	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9.	136	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000
10.	137	0.813	0.750	0.830	0.643	0.608	0.077	0.786	0.680	0.820	0.750
11.	139	0.021	0.000	0.057	0.071	0.014	0.000	0.114	0.000	0.040	0.000
12.	141	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000
13.	143	0.000	0.000	0.000	0.024	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000

Микросателитният локус A43 бе полиморфен с общо 13 изявиени алелни варианта (Таблица 76). В генофонда на неконтролираната българска популация бе констатирано присъствието на алелите 123, 137 и 139, а в генофонда на селекционно контролираната *A. m. macedonica* В – на алелите 123, 128 и 137, вторият от които (128) – частен, с честота 0.020. Най-често срещаният алел за българските популации бе 137 (0.813 и 0.680) – Фигура 40 (Приложение). Алелите 124 и 141 присъстваха само в генофонда на *A. m. macedonica* популациите от Р. Македония и Гърция съответно.

Сред установените алелни варианти общо пет се оказаха частни: 115, 122, 134 – за *A. m. ligustica*, 118 – за *A. m. mellifera*, и 128 – за *A. m. macedonica* В. Най-голямо алелно разнообразие по този локус (7 алела) бе отчетено за генофонда на *A. m. ligustica*.

Полиморфният локус A79 се характеризираше с изявата на общо 14 алелни варианта, от които в генофонда на българските популации присъстваха общо 12 – 9 в неконтролираната популация и 10 в подложената на селекционен контрол (Таблица 77, Фигура 41 – Приложение).

Таблица 77. 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>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.	91	0.000	0.000	0.011	0.190	0.081	0.673	0.000	0.019	0.019	0.000
2.	97	0.188	0.167	0.091	0.024	0.000	0.010	0.379	0.019	0.111	0.083
3.	99	0.000	0.000	0.034	0.048	0.000	0.010	0.000	0.019	0.000	0.000
4.	101	0.104	0.208	0.159	0.048	0.068	0.010	0.229	0.074	0.315	0.083
5.	103	0.250	0.500	0.295	0.143	0.324	0.077	0.271	0.352	0.296	0.500
6.	105	0.188	0.042	0.091	0.357	0.203	0.019	0.057	0.278	0.148	0.083
7.	107	0.104	0.042	0.159	0.143	0.149	0.048	0.050	0.148	0.019	0.250
8.	109	0.083	0.042	0.114	0.024	0.054	0.038	0.007	0.056	0.037	0.000
9.	111	0.021	0.000	0.023	0.024	0.054	0.058	0.000	0.019	0.019	0.000
10.	113	0.000	0.000	0.011	0.000	0.027	0.000	0.007	0.000	0.037	0.000
11.	115	0.042	0.000	0.011	0.000	0.014	0.038	0.000	0.000	0.000	0.000
12.	117	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
13.	119	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.019	0.000	0.000
14.	121	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Най-често срещаният алел в българските популации бе 103 (0.250 и 0.352). Важно е да се отбележи, че от групата на сравняваните *A. m. macedonica* популации с различен произход алелът 105 се срещаше с най-висока честота в генофонда на българските популации (0.188 и 0.278) – Фигура 41 (Приложение). Най-голямо алелно разнообразие по този локус бе констатирано в генофонда на *A. m. mellifera* и общо при *A. m. macedonica* с произход България – 12 варианта.

Николова (2011) съобщава за полиморфизъм по този локус с наличието на общо 7 алела, шест от които не бяха открити в генофонда на анализирания в настоящото изследване популации на българската медоносна пчела – 120, 122, 126, 130, 134 и 136. Алелът 128, тук открит като частен за българската селекционно контролирана популация и с честота 0.020, в проучването на Николова (2011) е с честота на срещане от порядъка на 0.239 – 0.439. Алелите 123, 137 и 139, описани в нашето проучване, не са докладвани в проучването на Николова (2011).

Микросателитният локус A88 се характеризираше с общо 8 алелни варианта, четири от които налични в генофонда на анализирания популации на българската пчела (неконтролирана и подложена на селекционен контрол) – 137, 141, 147 и 149 (Таблица 78). Най-често срещан от посочените алели бе 149. Съществено е да се отбележи, че за

алелите 137 и 141 бе установена по-висока честота на срещане в генофонда на популациите *A. m. macedonica* с произход България в сравнение с другите два произхода на *A. m. macedonica* (Гърция и Р. Македония). Освен това алелът 147, макар и често срещащ се в българските популации (0.217 и 0.130), бе със значително по-ниска честота в сравнение с честотата му в генофонда на популациите *A. m. macedonica* с произход Гърция и Р. Македония – Фигура 42 – Приложение, Таблица 78.

По отношение на този локус най-голямо бе алелното разнообразие в генофонда на *A. m. anatoliaca*, за която бе констатиран и един частен алел – 143.

Таблица 78. Полиморфизъм по А88 локуса: алели и алелни честоти

Локус А88	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.	133	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.000	0.037	0.000
2.	137	0.196	0.091	0.068	0.000	0.014	0.000	0.304	0.222	0.111	0.083
3.	141	0.087	0.045	0.034	0.048	0.028	0.843	0.435	0.167	0.019	0.000
4.	143	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
5.	144	0.000	0.000	0.000	0.024	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6.	147	0.217	0.409	0.330	0.119	0.083	0.010	0.051	0.130	0.259	0.333
7.	149	0.500	0.409	0.568	0.762	0.722	0.147	0.152	0.481	0.556	0.583
8.	151	0.000	0.000	0.000	0.048	0.139	0.000	0.022	0.000	0.019	0.000

При анализ на полиморфизма по А88 локуса Николова (2011) установява наличието на общо 14 алела в изследваните от нея пчелни популации на местната за България медоносна пчела. Само един от тях съвпада с описаните в настоящото изследване – 147. Останалите описани от нея алели по този локус са 120, 122, 126, 130, 132, 133, 134, 136, 139, 140, 142, 145 и 150. В проучването ѝ не са съобщени тук описаните алели 137, 141 и 149.

Локусът А113 бе представен в генофонда на анализирания популации от общо 16 алела, 9 от които налични в неконтролираната българска популация (214, 216, 220, 222, 226, 228, 230, 232 и 234) и 8 – в селекционно контролираната (горепосочените алели с изключение на 230) – Таблица 79. Алелът 214 бе най-често срещаният се от 9-те по-горе описани в генофонда на българските популации. Алелът 222, характерен за *A. m. macedonica* с произход от България (честота 0.043 и 0.096), не бе открит в генофонда на другите *A. m. macedonica* популации, въпреки че присъстваше с ниска честота в генофонда на *A. m. ligustica* (0.017), *A. m. mellifera* (0.042) и *A. m. anatoliaca* (0.05). Алелният вариант 236 (0.057) се оказа частен за генофонда на *A. m. anatoliaca* – подвид, характеризирани

ращ се и с най-голямо алелно разнообразие по този локус (14 алела) – Фигура 43 (Приложение), Таблица 79.

Таблица 79. 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.	204	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	208	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	212	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
4.	214	0.630	0.833	0.750	0.857	0.400	0.083	0.193	0.654	0.778	0.500
5.	216	0.043	0.000	0.011	0.024	0.000	0.010	0.014	0.058	0.000	0.000
6.	218	0.000	0.042	0.000	0.000	0.017	0.010	0.007	0.000	0.000	0.000
7.	220	0.022	0.042	0.057	0.071	0.567	0.771	0.043	0.019	0.074	0.200
8.	222	0.043	0.000	0.000	0.000	0.017	0.042	0.050	0.096	0.000	0.000
9.	224	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.043	0.000	0.000	0.000
10.	226	0.065	0.083	0.080	0.000	0.000	0.000	0.143	0.096	0.093	0.200
11.	228	0.109	0.000	0.000	0.048	0.000	0.010	0.214	0.038	0.019	0.000
12.	230	0.022	0.000	0.068	0.000	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000	0.100
13.	232	0.022	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.071	0.019	0.000	0.000
14.	234	0.043	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.064	0.019	0.037	0.000
15.	236	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.000
16.	239	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.014	0.000	0.000	0.000

Общо 12 алелни варианта по *As11* микросателитния локус бяха установени в генофонда на изследваните популации с различен произход и различна подвидова принадлежност – Таблица 80. За неконтролираната българска популация бе констатирано присъствието на 7 (111, 113, 115, 117, 119, 123 и 127), а за селекционно контролираната – на 5 (по-горе посочените с изключение на 123 и 127) алелни варианта. Алелите 123 и 127, присъстващи и в генофонда на *A. m. anatoliaca* (0.216 и 0.069), се оказаха характерни и за българската *A. m. macedonica* и по това тя може да се отличи от останалите популации на този подвид с произход Гърция и Р. Македония. Сред седемте алела в генофонда на неконтролираната българска популация най-често срещан се оказа алелът 111 (0.304), а сред четирите алела, констатирани в генофонда на селекционно контролираната *A. m. macedonica* B, най-често срещан бе алелът 115 (Таблица 80, Фигура 44 – Приложение). Алелът 111 е със сравнително висока честота на срещане (0.135 – 0.304) във всички анализирани популации на *A. m. macedonica*, отсъства в генофонда на анализирани популации от подвидовете *A.*

m. carnica, *A. m. ligustica* и *A. m. mellifera* и присъства в генофонда на *A. m. anatoliaca*, но със значително по-висока честота (0.729). Тези му особености го определят като подходящ междупопулационен маркер за сравнение в рамките на анализирания подвидове. Най-голямо алелно разнообразие (8 алела) по този локус бе констатирано в генофонда на *A. m. mellifera*.

Микросателитният локус Ac11 е проучван също от Николова (2011) и за генофонда на анализирания от нея популации на българската медоносна пчела са докладвани общо 7 алела, четири от които са описани и тук (115, 117, 119 и 123). Освен тези алели Николова (2011) отчита присъствието още на 110, 112 и 114, но не споменава за описаните в настоящото изследване 111, 113 и 127.

Таблица 80. 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>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.	105	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
2.	109	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	111	0.304	0.273	0.136	0.000	0.000	0.000	0.729	0.196	0.259	0.167
4.	113	0.087	0.045	0.114	0.238	0.122	0.000	0.043	0.089	0.111	0.000
5.	115	0.283	0.273	0.307	0.357	0.635	0.010	0.057	0.446	0.296	0.250
6.	117	0.261	0.409	0.398	0.262	0.176	0.069	0.136	0.250	0.333	0.583
7.	119	0.022	0.000	0.034	0.095	0.014	0.206	0.014	0.018	0.000	0.000
8.	121	0.000	0.000	0.011	0.048	0.041	0.216	0.007	0.000	0.000	0.000
9.	123	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.216	0.000	0.000	0.000	0.000
10.	125	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.206	0.000	0.000	0.000	0.000
11.	127	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.069	0.000	0.000	0.000	0.000
12.	129	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000

Микросателитният локус Ac88 бе полиморфен с наличие на общо 8 алелни варианта в проучваните подвидове и произходи (Таблица 81), два от които присъстващи в генофонда на българските популации – 214 и 220. Алелът 214 бе с по-висока честота (0.813 и 0.776) от 220 (0.188 и 0.224). Сравнителният анализ обаче показва, че 214 е с по-висока честота, а 220 – с по-ниска при останалите популации от *A. m. macedonica* групата (Фигура 45 – Приложение). Освен това алелното разнообразие по този локус е по-голямо в генофонда на *A. m. macedonica* с произход Гърция и Република Македония (4 алела) в сравнение с българския произход. Най-голямо алелно разнообразие по този локус бе констатирано за генофонда на *A. m. anatoliaca* – 5 алела.

Таблица 81. 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>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.	210	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000
2.	214	0.813	0.917	0.852	0.929	0.932	0.063	0.350	0.776	0.852	0.833
3.	216	0.000	0.042	0.011	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000
4.	220	0.188	0.042	0.125	0.024	0.014	0.000	0.621	0.224	0.130	0.167
5.	222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000
6.	224	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027	0.229	0.000	0.000	0.000	0.000
7.	226	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.115	0.000	0.000	0.000	0.000
8.	230	0.000	0.000	0.011	0.048	0.027	0.594	0.000	0.000	0.019	0.000

Локусът Ac139 бе полиморфен с наличие на общо 13 алела – Таблица 82. В генофонда на неконтролираната българска популация бяха констатирани вариантите 327, 329 и 331, а при селекционно контролираната *A. m. macedonica* B се откри присъствието и на четвърти алел – 333. Наличието на този алел, макар и с ниска честота на срещане (0.031), отличава подложената на селекционен контрол българска *A. m. macedonica* популация от останалите, чийто произход е Гърция и Р. Македония. Интересен е фактът, че въпросният алел се среща и в генофонда на *A. m. anatoliaca* (0.05) и неговото присъствие не е открито в популациите на нито един от останалите подвидове и произходи. За генофонда на популациите от българската медоносна пчела по-често срещаните алели бяха 327 – при *A. m. macedonica* B, и 329 – при неконтролираната българска популация (Фигура 46 – Приложение). Общо пет частни алела бяха констатирани по отношение на Ac139 микросателитния локус: 321 и 343 – за *A. m. mellifera*, 325, 335 и 336 – за *A. m. ligustica*. Най-голямо бе алелното разнообразие по този локус (8 алела) в генофонда на *A. m. mellifera* и *A. m. ligustica*.

Микросателитният локус Ap15 бе полиморфен с наличие на общо 10 алелни варианта (Таблица 83), четири от които – характерни за генофонда на неконтролираната българска популация (202, 208, 212 и 220), 3 – за подложената на селекционен контрол (горепосочените без 220). Установено бе наличието на четири частни алела: 203 – за *A. m. ligustica*, 216, 219 и 222 – за *A. m. mellifera*. Алелът 202 бе най-често срещаният в генофонда на всички анализирани популации (честота 0.925 и 0.870 в българските популации) – Фигура 47. Останалите по-редки алели, характерни за *A. m. macedonica* с произход България, бяха с честота от порядъка на 0.025 и 0.087. Най-голямо бе алелното разнообразие по този локус (7 алелни варианта) в генофонда на *A. m. mellifera*.

Таблица 82. 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.	321	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000
2.	325	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3.	327	0.400	0.500	0.580	0.775	0.647	0.089	0.043	0.656	0.600	0.750
4.	328	0.000	0.000	0.057	0.000	0.000	0.000	0.129	0.000	0.000	0.000
5.	329	0.467	0.400	0.330	0.125	0.088	0.011	0.600	0.250	0.300	0.250
6.	331	0.133	0.100	0.034	0.050	0.000	0.011	0.171	0.063	0.025	0.000
7.	333	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.031	0.000	0.000
8.	335	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9.	336	0.000	0.000	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
10.	337	0.000	0.000	0.000	0.025	0.059	0.244	0.000	0.000	0.000	0.000
11.	339	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.167	0.007	0.000	0.000	0.000
12.	341	0.000	0.000	0.000	0.025	0.132	0.433	0.000	0.000	0.075	0.000
13.	343	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000

Таблица 83. Полиморфизъм по **Ap15** локуса: алели и алелни честоти

Ло- кус 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

Общо 8 алела бяха установени в генофонда на проучваните популации по Ap68 локуса – Таблица 84. Седем от тях се срещаха в генофонда на неконтролираната българска популация (152, 154, 156, 158, 160, 162 и 164), а 6 – в подложената на селекционен контрол (вече посочените без 162). За *A. m. macedonica* популациите с произход България най-висока бе честотата на срещане на алела 158 (Фигура 48 – Приложение). Алелният вариант 160 бе характерен и за другите популации от групата на *A. m. macedonica*, както и за *A. m. anatoliaca*, но не присъстваше в генофонда на европейските подвидове *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. mellifera*. Алелът 166 се срещаше само в генофонда на две популации – *A. m. ligustica* и *A. m. mellifera*, и то с твърде

различна честота – 0.014 и 0.245 съответно. Най-голямо бе алелното разнообразие (7 алелни варианта) в неконтролираната популация на *A. m. macedonica* с произход България, при популацията на същия подвид от Р. Македония и в популацията на *A. m. anatoliaca*.

Таблица 84. Полиморфизъм по **Ar68** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ar68	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

Дванадесет алелни варианта бяха отчетени по Ar85 локуса (Таблица 85), от които два частни: 206 – за *A. m. macedonica* М (0.1), и 208 (0.007) – за *A. m. anatoliaca*. Като популационен генетичен маркер може да се разглежда и 192 вариантът, срещащ се само в генофонда на популациите от подвидовете *A. m. carnica* и *A. m. mellifera*, но със значително различна честота – 0.024 и 0.250 съответно.

По отношение на българската *A. m. macedonica* бе установено наличието на 7 алелни варианта в генофонда на неконтролираната популация (186, 188, 190, 194, 200, 202 и 204) и 5 – в подложената на селекционен контрол (вече посочените без 190 и 200). Най-често срещаният алел в българските популации беше 186 (Фигура 49 – Приложение). Алелът 188 бе с по-ниска честота на срещане в генофонда на *A. m. macedonica* от България, за разлика от произходите на Гърция и Р. Македония. Алелът 190, макар и рядко срещащ се (0.024) в групата на *A. m. macedonica*, бе открит в генофонда само на българския произход. Същият алел присъстваше още в генофонда на *A. m. ligustica* и *A. m. mellifera* с честота 0.014 и 0.058 съответно. Най-голямо бе алелното разнообразие в генофонда на *A. m. mellifera* (10 алела).

Микросателитният локус Ar90 бе полиморфен с общо 16 алелни варианта, пет от които срещащи се в генофонда на неконтролираната българска популация (129, 131, 133, 135 и 151) и 5 – в селекционно контролираната (129, 131, 133, 135, 155) – Таблица 86.

Алелът 131 бе най-честият вариант в българските популации (0.5 и 0.6). Сред групата сравнявани популации с различен произход на

A. m. macedonica алелът 133 бе с по-висока честота в генофонда на българските популации – Фигура 50 (Приложение). Алелът 151 бе наличен в генофонда само на две популации – общата българска популация на *A. m. macedonica* и популацията на подвида *A. m. mellifera* (0.021 и 0.076). Макар и с ниска честота, този алел би могъл да се използва при междупопулационни сравнения. Три частни алела бяха установени в генофонда на популацията *A. m. mellifera* (147, 149 и 153), за която бе отчетено и най-голямо алелно разнообразие (12 алела) по *Ap90* локуса.

Таблица 85. Полиморфизъм по *Ap85* локуса: алели и алелни честоти

Локус <i>Ap85</i>	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 86. Полиморфизъм по *Ap90* локуса: алели и алелни честоти

Локус <i>Ap90</i>	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

Локусът Ar223 бе представен в генофонда на проучваните популации от общо 12 варианта – Таблица 87.

Три от тях присъстваха в популациите на българската медоносна пчела – 173, 183 и 187, като с най-висока честота на срещане бе 183 – Фигура 51 (Приложение). Този алел може да се използва за междупопулационни сравнения, защото се среща в генофонда на популациите от групата на *A. m. macedonica* със сравнително висока честота от порядъка на 0.583 – 0.750, в генофонда на *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* – с най-висока честота (0.905 и 0.944 съответно), в генофонда на *A. m. mellifera* – със сравнително ниска честота (0.096), и в генофонда на *A. m. anatoliaca* – с междинна честота (0.307). По отношение на честотата на срещане потенциал на популационен маркер би могъл да се коментира и относно алела 187, наличен в генофонда на популациите от групата на *A. m. macedonica*, с честота от 0.167 до 0.375, в генофонда на *A. m. carnica* – с честота 0.048, и липсващ в генофонда на *A. m. ligustica* и *A. m. mellifera*. Този алел е с малко по-висока честота на срещане в популацията на *A. m. anatoliaca*. Общо 5 частни алела бяха установени по Ar223 локуса: 166 – за *A. m. macedonica* G, 177 – за *A. m. anatoliaca*, 178 и 181 – за *A. m. mellifera*, и 182 – за *A. m. macedonica* с произход Р. Македония. Най-много алелни варианти (7) бяха отчетени в генофонда на *A. m. macedonica* от Р. Македония.

Таблица 87. Полиморфизъм по Ar223 локуса: алели и алелни честоти

Локус Ar223	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.	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

Полиморфизмът по локуса Ar224 се характеризираше с присъствието на общо 7 алела – Таблица 88. Пет от тях присъстваха в генофонда на неконтролираната българска популация (281, 283, 287, 289 и

291) и 5 – в селекционно контролираната (279, 281, 283, 287 и 289) – общо 6 за българската медоносна пчела, от които 287 бе с най-висока честота – Фигура 52 (Приложение). Не бяха отчетени частни алели по този локус, а алелното разнообразие бе сходно в генофонда на повечето от анализирани популации (6 алела).

Таблица 88. Полиморфизъм по **Ar224** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ar224	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

От общо деветте алела по Ar226 микросателитния локус три се оказаха налични в генофонда на неконтролираната българска популация (237, 239 и 247) и четири – в селекционно контролираната *A. m. macedonica* B (горепосочените плюс алела 233) – Таблица 89.

В българските популации с най-висока честота на срещане бе алелът 239 (0.522 и 0.615). Алелът 247 се оказа с изявен потенциал на популационен маркер предвид различията в честотата на срещането му – от 0.096 до 0.250 в генофонда на популациите от групата на *A. m. macedonica*, 0.801 – в генофонда на *A. m. anatoliaca*, и ниска честота (0.042 и 0.023) или липса – при *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* и *A. m. mellifera* (Таблица 89, Фигура 53 – Приложение).

Таблица 89. Полиморфизъм по **Ar226** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ar226	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

При анализа на полиморфизма по Ap226 локуса бе констатирано наличието на четири частни алела: 241, 243 – при *A. m. ligustica*; 249 – при *A. m. anatoliaca*, и 251 – при *A. m. mellifera*. Най-голям брой алели (5) бе установен в генофонда на *A. m. ligustica*.

Полиморфизмът по локуса Ap226 е проучван от Николова (2011) и за него са съобщени общо 9 алела, налични в генофонда на изследваните от нея популации на българската медоносна пчела. Един от деветте алела е съобщен и в настоящото изследване (233), останалите са различни – 220, 225, 230, 235, 238, 240, 245 и 260. В проучването на Николова (2011) не се съобщава за описаните тук алели 237, 239 и 247 по Ap226 локуса.

Микросателитният локус Ap249 бе полиморфен с наличие на общо 10 алела в сравняваните популации (Таблица 90) – Фигура 54 (Приложение). В неконтролираната българска популация бяха отчетени алелите 209, 211, 217, 219 и 223, а в селекционно контролираната – посочените по-горе и алелите 215 и 225. Алелът 208 присъстваше само в генофонда на *A. m. macedonica* от Р. Македония.

Таблица 90. Полиморфизъм по Ap249 локуса: алели и алелни честоти

Локус Ap249	Алел	<i>A. m. maced. Bg</i>	<i>A. m. maced. Gr</i>	<i>A. m. maced. 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. maced. B</i>	<i>A. m. maced. G</i>	<i>A. m. maced. M</i>
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

С най-висока честота на срещане в популациите на българската медоносна пчела бе алелният вариант 209. Алелът 211 се срещаше в генофонда на популациите от групата на *A. m. macedonica* и липсваше при всички анализирани популации, принадлежащи към други подвидове, което го определя като генетичен маркер с таксономичен потенциал за подвида *A. m. macedonica*. Алелът 219 предвид различията в честотата на срещането му има потенциал на популационен маркер, тъй като се срещаше с честота от порядъка приблизително на 0.1 до 0.271 в генофонда на популациите от групата на *A. m. macedonica*,

липсваше при *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* и се срещаше рядко при *A. m. mellifera* (0.010). Този алел бе с висока честота на срещане в популацията на *A. m. anatoliaca* – 0.265. Може да се приеме, че диагностични характеристики крие и алелът 225, който, макар и с ниска честота, се срещаше само в две от анализиранияте популации – *A. m. macedonica* В и *A. m. anatoliaca*. Най-голямо алелно разнообразие бе отчетено в генофонда на *A. m. macedonica* В и *A. m. macedonica* Мас.

Изследвайки полиморфизма по Ар249, Николова (2011) съобщава за наличие на общо 6 алела в проучваните от нея български популации – 210, 218, 220, 227, 260 и 280. Описаните алелни варианти са различни от отчетените в настоящото изследване.

Микросателитният локус Ар273 бе полиморфен с 4 алела, три от които присъстваха в генофонда на неконтролираната българска популация (104, 106 и 108) и два – в подложената на селекционен контрол *A. m. macedonica* В (104 и 106), при което алелът 106 бе най-често срещаният (Таблица 91, Фигура 55 – Приложение).

Този алел бе фиксиран в *A. m. macedonica* М и с ниска честота (0.048) – само в *A. m. mellifera* популацията. Не бяха отчетени частни алели. И четирите алелни варианта бяха открити в генофонда на *A. m. macedonica* с произход Р. Македония и *A. m. anatoliaca*.

Таблица 91. Полиморфизъм по Ар273 локуса: алели и алелни честоти

Локус Ар249	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

Също четири алела бяха констатирани по Ар274 микросателитния локус – Таблица 92. В генофонда на неконтролираната българска популация се установи присъствието на два алела – 120 и 122, като с по-висока честота на срещане (0.979) бе първият посочен. Този алел се оказа най-често срещаният в генофонда на популациите от групата на *A. m. macedonica*, включително фиксиран в по-голямата част от тях (Фигура 56 – Приложение). Два от установените алели са частни: 112 – за *A. m. anatoliaca*, и 121 – за *A. m. mellifera*. Три от отчетените алели се срещаха в генофонда на *A. m. mellifera*.

Таблица 92. Полиморфизъм по **Ar274** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ar274	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

Общо 8 алелни варианта бяха установени по полиморфния Ar288 локус (Таблица 93, Фигура 57 – Приложение). Три от тях (123, 124 и 131) се срещаха в контролираната българска популация и 4 – в генофонда на селекционно контролираната *A. m. macedonica* B (123, 130, 131 и 139). За българската медоносна пчела най-висока бе честотата на срещане на 123 алела. Алелният вариант 130 присъстваше с ниска честота в генофонда само на две от анализиранияте популации – *A. m. macedonica* B и *A. m. mellifera* (0.019 и 0.020 съответно).

Таблица 93. Полиморфизъм по **Ar288** локуса: алели и алелни честоти

Локус Ar288	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

Алелът 139 се срещаше в генофонда на повечето популации *A. m. macedonica* и на *A. m. anatoliaca* с ниска честота. Алелният вариант 121 бе отчетен като частен за *A. m. macedonica* с произход Р. Македония, 124 – като частен за общата популация на *A. m. macedonica* с произход България, и 127 – за популацията на подвида *A. m. anatoliaca*. Най-голямо алелно разнообразие бе отчетено в генофонда на *A. m. anatoliaca* – 5 алела.

Микросателитният локус At168 бе полиморфен с наличието на общо 8 алела (Таблица 94, Фигура 58 – Приложение), три от които (128, 134 и 136) – присъстващи в генофонда на българската медоносна пчела. И трите алела може успешно да се използват при междупопулационни сравнения.

Алелът 128 бе с честота на срещане от порядъка на 0.625 – 0.750 в групата популации на подвида *A. m. macedonica* с различен произход. Честотата му е значително по-висока при популациите на *A. m. carnica* и *A. m. ligustica* (0.929 и 0.946 съответно), сравнително ниска при *A. m. mellifera* (0.096) и междинна спрямо останалите – при *A. m. anatoliaca* (0.507). Алелът 130 бе характерен само за *A. m. macedonica* с произход Р. Македония. Алелът 134 е с честота на срещане между 0.250 и 0.365 в генофонда на *A. m. macedonica* с различен произход, с ниска честота – при *A. m. carnica* и *A. m. mellifera* (0.071 и 0.048 съответно), липсващ в генофонда на *A. m. ligustica* и с най-висока честота (0.478) – в генофонда на *A. m. anatoliaca*.

Таблица 94. 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

Алелният вариант 136 бе открит с ниска честота на срещане (0.021 и 0.020) в генофонда на българските популации и при *A. m. anatoliaca* (0.014). При анализа на полиморфизма по At168 локуса бяха отчетени три частни алела: 130 – за популацията на *A. m. macedonica* с произход Р. Македония; 140 и 144 – за *A. m. mellifera*. Най-голям брой алели на коментирувания локус (6) бяха установени в генофонда на *A. m. mellifera*.

Микросателитният локус At188 се характеризираше с наличието на общо 14 алела (Таблица 95, Фигура 59 – Приложение), общо 8 от които налични в генофонда на българската медоносна пчела – 189, 199, 205, 211, 213, 217 (в неконтролираната популация) и 189, 205, 211, 212, 213, 217, 219 (в селекционно контролираната).

Таблица 95. 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

С най-висока честота на срещане бе 189 алелът. Алелът 205 се срещаше в популациите на *A. m. macedonica* и *A. m. anatoliaca* и липсваше в генофонда на останалите. Алелите 207 и 209 бяха отчетени в генофонда на *A. m. macedonica* с произход Гърция и Р. Македония и на *A. m. anatoliaca*, но не бяха открити в българските популации. Алелът 211, срещащ се с ниска честота в генофонда на българските популации (0.022 и 0.018), не бе установен в другите популации на *A. m. macedonica*, но пък се срещаше със значително по-висока честота (0.118) в генофонда на *A. m. anatoliaca*. Тази значима разлика в честотата на срещането му в посочените популации, както и липсата му в генофонда на останалите го определя като маркерен алел за междупопулационни сравнения.

Алелът 217 бе установен с честота от порядъка на 0.018 до 0.042 в *A. m. macedonica* популациите и с честота 0.051 – в генофонда на *A. m. anatoliaca*. Освен описаните по-горе характеристики, които успешно могат да се използват за генетично характеризиране на анализирания подвидове и произходи, по At188 локуса бе отчетен и един частен алел с ниска честота на срещане (0.007) – 203 – за *A. m. anatoliaca*. Констатираното алелно разнообразие по този локус бе най-голямо за генофонда на *A. m. anatoliaca* (13 алела).

В Таблица 96 по-долу е представен пълен списък на констатиранияте частни алели по 24-те включени в изследването микросателитни локуса. От общо установените 260 алелни варианта 65 се оказаха частни. В настоящото изследване е важно да се обърне внимание на онези от тях, които биха допринесли за по-детайлното характеризиране на български-

те медоносни пчели и на подвида *A. m. macedonica* като цяло. Видно е, че в генофонда на неконтролираната и на подложената на селекционен контрол българска популация са налични два частни алела по два микросателитни локуса: алелът 124 – по Ap288, и алелът 128 – по A43. И двата алела са с ниска честота на срещане – 0.021 и 0.020 съответно.

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 посочените в Таблица 96 частни алели 11 са диагностични за *A. m. mellifera* и 2 – за *A. m. anatoliaca*.

Таблица 96. Частни алели в генофонда на изследваните популации от различните подвидове на *Apis mellifera*, включени в микросателитния ДНК анализ

Популация	Локус	Алел	Честота
<i>A. m. macedonica</i> България	Ap288	124	0.021
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	A24	101	0.045
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	A29	142	0.011
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	A29	144	0.091
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	Ap249	208	0.011
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	Ap288	121	0.011
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	At168	130	0.023
<i>A. m. carnica</i>	A29	181	0.028
<i>A. m. carnica</i>	Ap249	210	0.024
<i>A. m. ligustica</i>	A8	176	0.014
<i>A. m. ligustica</i>	A43	115	0.027
<i>A. m. ligustica</i>	A43	122	0.014
<i>A. m. ligustica</i>	A43	134	0.014
<i>A. m. ligustica</i>	A79	121	0.027
<i>A. m. ligustica</i>	Ac11	109	0.014
<i>A. m. ligustica</i>	Ac139	325	0.015
<i>A. m. ligustica</i>	Ac139	335	0.015
<i>A. m. ligustica</i>	Ac139	336	0.015
<i>A. m. ligustica</i>	Ap15	203	0.014
<i>A. m. ligustica</i>	Ap226	241	0.019

<i>A. m. ligustica</i>	Ap226	243	0.019
<i>A. m. ligustica</i>	Ap249	218	0.014
<i>A. m. mellifera</i>	A8	162	0.019
<i>A. m. mellifera</i>	A14	108	0.011
<i>A. m. mellifera</i>	A29	133	0.010
<i>A. m. mellifera</i>	A29	136	0.031
<i>A. m. mellifera</i>	A29	140	0.010
<i>A. m. mellifera</i>	A29	168	0.021
<i>A. m. mellifera</i>	A43	118	0.010
<i>A. m. mellifera</i>	A43	136	0.125
<i>A. m. mellifera</i>	A113	204	0.021
<i>A. m. mellifera</i>	A113	208	0.010
<i>A. m. mellifera</i>	Ac11	125	0.206
<i>A. m. mellifera</i>	Ac11	129	0.010
<i>A. m. mellifera</i>	Ac88	226	0.115
<i>A. m. mellifera</i>	Ac139	321	0.011
<i>A. m. mellifera</i>	Ac139	343	0.033
<i>A. m. mellifera</i>	Ap15	216	0.020
<i>A. m. mellifera</i>	Ap15	219	0.059
<i>A. m. mellifera</i>	Ap15	222	0.069
<i>A. m. mellifera</i>	Ap90	147	0.109
<i>A. m. mellifera</i>	Ap90	149	0.239
<i>A. m. mellifera</i>	Ap90	153	0.076
<i>A. m. mellifera</i>	Ap223	178	0.010
<i>A. m. mellifera</i>	Ap223	181	0.067
<i>A. m. mellifera</i>	Ap226	251	0.012
<i>A. m. mellifera</i>	Ap274	121	0.019
<i>A. m. mellifera</i>	At168	140	0.375
<i>A. m. mellifera</i>	At168	144	0.317
<i>A. m. anatoliaca</i>	A29	129	0.044
<i>A. m. anatoliaca</i>	A88	143	0.014
<i>A. m. anatoliaca</i>	A113	212	0.014
<i>A. m. anatoliaca</i>	A113	236	0.057
<i>A. m. anatoliaca</i>	Ac11	105	0.014
<i>A. m. anatoliaca</i>	Ac88	210	0.014
<i>A. m. anatoliaca</i>	Ac88	222	0.007
<i>A. m. anatoliaca</i>	Ap85	208	0.007
<i>A. m. anatoliaca</i>	Ap223	177	0.007
<i>A. m. anatoliaca</i>	Ap226	249	0.037
<i>A. m. anatoliaca</i>	Ap274	112	0.007
<i>A. m. anatoliaca</i>	Ap288	127	0.050
<i>A. m. anatoliaca</i>	At188	203	0.007
<i>A. m. macedonica</i> B	A43	128	0.020
<i>A. m. macedonica</i> G	Ap223	166	0.019
<i>A. m. macedonica</i> M	Ap85	206	0.100

По-ранни проучвания на Николова (2011), Nikolova (2011), Nikolova and Ivanova (2012) съобщават за наличие на общо 22 диагностични частни алела по 9 анализирани микросателитни локуса, които могат да се използват за дискриминиране на популации на българската медоносна пчела. Твърде вероятно е големината на изследваната извадка да е причина за установеното различие, както и фактът, че в двете изследвания са сравнявани различен брой пчелни популации (подвидове, произходи). Освен това в проучването на Николова (2011) са характеризирани голям брой български популации, всяка от които – формираща извадка от по 30 до 50 индивида (общо около 1500 индивида), а в настоящото проучване са анализирани по-малки извадки, съставляващи т. нар. в популационната генетика „генерални“ (тотални) популации (с общ брой анализирани индивиди за всички популации – 460). В големината на извадката би могла да се търси и причината за установяването на различен брой и различни алелни варианти по 6 от анализираните локуси в настоящото проучване и в това на Николова (2011).

Получените в настоящото изследване резултати демонстрират високо ниво на полиморфизъм (Таблица 97) 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 подвидово ниво (полиморфизъм от порядъка на 66.7% до 100% при $P = 0.95$), за сравняваните балкански популации (50% до 100% $P = 0.95$) и за включените в европейския GEI експеримент (66.7% до 100% при $P = 0.95$) подвидове и произходи.

Таблица 97. Процент полиморфни локуси

Популация	$P = 1$ (без критерий)	$P = 0.99$	$P = 0.95$
<i>A. m. macedonica</i> България	100.00%	100.00%	91.67%
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	95.83%	95.83%	91.67%
<i>A. m. macedonica</i> Македония	95.83%	95.83%	95.83%
<i>A. m. carnica</i>	100.00%	100.00%	91.67%
<i>A. m. ligustica</i>	100.00%	100.00%	95.83%
<i>A. m. mellifera</i>	100.00%	100.00%	95.83%
<i>A. m. anatoliaca</i>	100.00%	95.83%	95.83%
<i>A. m. macedonica</i> B	95.83%	95.83%	95.83%
<i>A. m. macedonica</i> G	100.00%	100.00%	95.83%
<i>A. m. macedonica</i> M	91.67%	91.67%	91.67%
Средно	97.92%	97.5%	92.1%
SE	0.93%	0.9%	0.87%

Информация за броя изследвани индивиди, броя установени алели, ефективния брой алели, наблюдаваната и очакваната хетерозиготност и фиксационен индекс по локуси за изследваните популации от различните подвидове и произходи на *Apis mellifera*, включени в микросателитния ДНК анализ, е представена в Таблица 98, а данни за средните стойности и средната грешка по отношение на същите показатели по популации са представени в Таблица 99.

Таблица 98. Брой алели (N_a), ефективен брой алели (N_e), наблюдавана (H_o) и очаквана (H_e) хетерозиготност и фиксационен индекс (F) по локуси за изследваните популации от различните подвидове на *Apis mellifera*, включени в микросателитния ДНК анализ

Популация	Локус	N_a	N_e	H_o	H_e	F
<i>A. m. macedonica</i> България	A8	4	2.758	0.500	0.637	0.216
	A14	4	2.087	0.500	0.521	0.040
	A24	3	2.039	0.625	0.510	-0.227
	A29	14	9.308	0.864	0.893	0.032
	A43	3	1.453	0.375	0.312	-0.203
	A79	9	6.095	0.958	0.836	-0.146
	A88	4	2.915	0.652	0.657	0.007
	A113	9	2.378	0.609	0.579	-0.051
	Ac11	7	4.008	0.739	0.750	0.015
	Ac88	2	1.438	0.292	0.305	0.043
	Ac139	3	2.528	0.667	0.604	-0.103
	Ap15	4	1.166	0.150	0.143	-0.053
	Ap68	7	3.097	0.583	0.677	0.138
	Ap85	7	3.366	0.524	0.703	0.255
	Ap90	5	2.763	0.833	0.638	-0.306
	Ap223	3	2.072	0.417	0.517	0.195
	Ap224	5	3.951	0.818	0.747	-0.095
	Ap226	3	2.489	0.652	0.598	-0.090
	Ap249	5	2.462	0.500	0.594	0.158
	Ap273	3	1.088	0.083	0.081	-0.032
	Ap274	2	1.043	0.042	0.041	-0.021
	Ap288	3	1.682	0.458	0.405	-0.131
	At168	3	1.936	0.500	0.484	-0.034
	At188	6	1.769	0.478	0.435	-0.100
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	A8	5	2.504	0.583	0.601	0.029
	A14	2	1.492	0.250	0.330	0.242
	A24	3	2.142	0.545	0.533	-0.023
	A29	13	10.286	0.917	0.903	-0.015
	A43	3	1.653	0.200	0.395	0.494
	A79	6	3.064	0.833	0.674	-0.237

	A88	5	2.881	0.727	0.653	−0.114
	A113	4	1.419	0.333	0.295	−0.129
	Ac11	4	3.143	0.727	0.682	−0.067
	Ac88	3	1.185	0.167	0.156	−0.067
	Ac139	3	2.381	0.200	0.580	0.655
	Ap15	2	1.220	0.200	0.180	−0.111
	Ap68	5	3.636	0.600	0.725	0.172
	Ap85	4	2.909	0.667	0.656	−0.016
	Ap90	4	1.959	0.250	0.490	0.489
	Ap223	3	2.072	0.583	0.517	−0.128
	Ap224	4	2.642	0.750	0.622	−0.207
	Ap226	4	2.595	0.833	0.615	−0.356
	Ap249	4	2.462	0.583	0.594	0.018
	Ap273	2	1.087	0.083	0.080	−0.043
	Ap274	1	1.000	0.000	0.000	#N/A
	Ap288	3	2.072	0.833	0.517	−0.611
	At168	2	1.600	0.333	0.375	0.111
	At188	6	1.920	0.583	0.479	−0.217
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македонија	A8	7	3.569	0.614	0.720	0.147
	A14	3	1.788	0.432	0.441	0.021
	A24	3	2.001	0.432	0.500	0.137
	A29	20	14.950	0.932	0.933	0.001
	A43	4	1.425	0.250	0.298	0.161
	A79	11	5.902	0.864	0.831	−0.040
	A88	4	2.287	0.409	0.563	0.273
	A113	7	1.732	0.432	0.423	−0.022
	Ac11	6	3.507	0.750	0.715	−0.049
	Ac88	4	1.347	0.295	0.258	−0.146
	Ac139	4	2.228	0.409	0.551	0.258
	Ap15	3	1.047	0.045	0.045	−0.017
	Ap68	7	3.546	0.636	0.718	0.114
	Ap85	7	3.385	0.705	0.705	0.000
	Ap90	7	2.960	0.705	0.662	−0.064
	Ap223	7	1.946	0.545	0.486	−0.122
	Ap224	6	3.113	0.727	0.679	−0.072
	Ap226	3	2.396	0.545	0.583	0.064
	Ap249	6	1.924	0.500	0.480	−0.041
	Ap273	4	1.123	0.114	0.109	−0.040
	Ap274	1	1.000	0.000	0.000	#N/A
	Ap288	4	1.690	0.341	0.408	0.165
	At168	3	1.780	0.500	0.438	−0.141
	At188	10	1.752	0.432	0.429	−0.006
<i>A. m. carnica</i>	A8	6	2.478	0.619	0.596	−0.038
	A14	3	1.463	0.286	0.316	0.097
	A24	3	2.189	0.524	0.543	0.035

	A29	15	12.226	0.944	0.918	−0.029
	A43	5	2.194	0.524	0.544	0.037
	A79	9	4.742	0.810	0.789	−0.026
	A88	5	1.667	0.429	0.400	−0.071
	A113	4	1.347	0.286	0.257	−0.110
	Ac11	5	3.785	0.667	0.736	0.094
	Ac88	3	1.156	0.143	0.135	−0.059
	Ac139	5	1.613	0.350	0.380	0.079
	Ap15	3	1.215	0.143	0.177	0.192
	Ap68	6	3.542	0.762	0.718	−0.062
	Ap85	9	5.011	0.952	0.800	−0.190
	Ap90	8	3.528	0.810	0.717	−0.130
	Ap223	4	1.217	0.190	0.178	−0.070
	Ap224	3	2.256	0.619	0.557	−0.112
	Ap226	4	2.087	0.417	0.521	0.200
	Ap249	5	1.736	0.524	0.424	−0.235
	Ap273	3	1.156	0.143	0.135	−0.059
	Ap274	2	1.100	0.095	0.091	−0.050
	Ap288	2	1.049	0.048	0.046	−0.024
	At168	2	1.153	0.143	0.133	−0.077
	At188	3	1.213	0.190	0.176	−0.084
<i>A. m. ligustica</i>	A8	8	3.537	0.757	0.717	−0.055
	A14	5	2.099	0.444	0.524	0.151
	A24	3	2.124	0.486	0.529	0.081
	A29	18	11.361	1.000	0.912	−0.097
	A43	7	2.265	0.541	0.558	0.032
	A79	10	5.348	0.757	0.813	0.069
	A88	6	1.822	0.472	0.451	−0.047
	A113	4	2.076	0.533	0.518	−0.029
	Ac11	6	2.217	0.459	0.549	0.163
	Ac88	4	1.148	0.027	0.129	0.790
	Ac139	8	2.227	0.500	0.551	0.093
	Ap15	4	1.181	0.135	0.153	0.117
	Ap68	5	1.994	0.405	0.499	0.187
	Ap85	7	2.906	0.722	0.656	−0.101
	Ap90	8	2.505	0.568	0.601	0.055
	Ap223	2	1.117	0.111	0.105	−0.059
	Ap224	4	1.455	0.278	0.313	0.112
	Ap226	5	2.154	0.556	0.536	−0.037
	Ap249	4	1.180	0.162	0.152	−0.065
	Ap273	3	1.107	0.100	0.096	−0.039
	Ap274	2	1.443	0.324	0.307	−0.057
	Ap288	3	1.085	0.081	0.079	−0.033
	At168	3	1.116	0.108	0.104	−0.042
	At188	4	1.462	0.324	0.316	−0.027

<i>A. m. mellifera</i>	A8	5	1.537	0.327	0.349	0.064
	A14	8	3.907	0.614	0.744	0.175
	A24	3	1.748	0.385	0.428	0.102
	A29	18	9.071	0.896	0.890	−0.007
	A43	5	1.592	0.269	0.372	0.276
	A79	12	2.135	0.404	0.532	0.240
	A88	3	1.365	0.275	0.267	−0.027
	A113	10	1.654	0.396	0.395	−0.001
	Ac11	8	5.335	0.804	0.813	0.011
	Ac88	4	2.369	0.604	0.578	−0.045
	Ac139	8	3.513	0.622	0.715	0.130
	Ap15	7	3.529	0.706	0.717	0.015
	Ap68	7	2.992	0.653	0.666	0.019
	Ap85	10	5.286	0.712	0.811	0.122
	Ap90	12	6.571	0.870	0.848	−0.026
	Ap223	5	1.795	0.500	0.443	−0.129
	Ap224	6	3.298	0.673	0.697	0.034
	Ap226	4	1.099	0.093	0.090	−0.033
	Ap249	3	1.236	0.212	0.191	−0.107
	Ap273	3	1.453	0.288	0.312	0.074
	Ap274	3	1.169	0.154	0.144	−0.067
	Ap288	4	2.353	0.529	0.575	0.079
	At168	6	3.740	0.712	0.733	0.029
	At188	5	1.451	0.269	0.311	0.133
<i>A. m. anatoliaca</i>	A8	6	2.374	0.397	0.579	0.314
	A14	4	1.530	0.371	0.346	−0.072
	A24	5	2.108	0.486	0.526	0.076
	A29	18	9.360	0.794	0.893	0.111
	A43	5	1.575	0.400	0.365	−0.095
	A79	7	3.635	0.700	0.725	0.034
	A88	7	3.241	0.739	0.691	−0.069
	A113	14	7.815	0.814	0.872	0.066
	Ac11	7	1.802	0.429	0.445	0.037
	Ac88	5	1.965	0.500	0.491	−0.018
	Ac139	6	2.437	0.571	0.590	0.031
	Ap15	4	1.123	0.114	0.110	−0.042
	Ap68	7	3.107	0.606	0.678	0.106
	Ap85	7	1.623	0.371	0.384	0.033
	Ap90	6	2.789	0.600	0.641	0.065
	Ap223	6	3.312	0.771	0.698	−0.105
	Ap224	6	2.009	0.514	0.502	−0.024
	Ap226	4	1.522	0.250	0.343	0.271
	Ap249	5	2.309	0.632	0.567	−0.115
	Ap273	4	1.871	0.433	0.465	0.070
	Ap274	2	1.015	0.014	0.014	−0.007

	Ap288	5	2.077	0.514	0.519	0.008
	At168	3	2.057	0.507	0.514	0.013
	At188	13	8.438	0.838	0.881	0.049
<i>A. m. macedonica</i> B	A8	5	2.635	0.538	0.621	0.132
	A14	4	2.226	0.481	0.551	0.126
	A24	5	2.202	0.538	0.546	0.014
	A29	13	9.846	0.688	0.898	0.235
	A43	3	1.809	0.400	0.447	0.106
	A79	10	4.288	0.741	0.767	0.034
	A88	4	3.069	0.630	0.674	0.066
	A113	8	2.213	0.538	0.548	0.018
	Ac11	5	3.240	0.643	0.691	0.070
	Ac88	2	1.33	0.379	0.348	-0.091
	Ac139	4	2.008	0.438	0.502	0.128
	Ap15	3	1.306	0.261	0.234	-0.113
	Ap68	6	2.641	0.714	0.621	-0.150
	Ap85	5	2.792	0.739	0.642	-0.152
	Ap90	5	2.390	0.640	0.582	-0.100
	Ap223	3	2.056	0.444	0.514	0.135
	Ap224	5	2.588	0.586	0.614	0.045
	Ap226	4	2.170	0.538	0.539	0.001
	Ap249	6	3.767	0.741	0.735	-0.008
	Ap273	2	1.173	0.160	0.147	-0.087
	Ap274	1	1.000	0.000	0.000	#N/A
	Ap288	4	1.723	0.481	0.420	-0.147
	At168	3	1.809	0.400	0.447	0.106
	At188	7	1.524	0.357	0.344	-0.039
<i>A. m. macedonica</i> G	A8	6	2.661	0.500	0.624	0.199
	A14	5	2.170	0.630	0.539	-0.168
	A24	4	2.106	0.577	0.525	-0.099
	A29	16	8.113	0.875	0.877	0.002
	A43	5	1.467	0.240	0.318	0.246
	A79	9	4.445	0.926	0.775	-0.195
	A88	6	2.562	0.593	0.610	0.028
	A113	5	1.611	0.333	0.379	0.121
	Ac11	4	3.591	0.593	0.722	0.179
	Ac88	3	1.346	0.148	0.257	0.424
	Ac139	4	2.192	0.500	0.544	0.080
	Ap15	4	1.649	0.400	0.394	-0.016
	Ap68	5	2.455	0.522	0.593	0.120
	Ap85	7	3.415	0.800	0.707	-0.131
	Ap90	6	2.475	0.630	0.596	-0.056
	Ap223	6	2.056	0.630	0.514	-0.226
	Ap224	6	4.167	0.920	0.760	-0.211
	Ap226	4	2.682	0.640	0.627	-0.020
	Ap249	5	1.724	0.423	0.420	-0.007

	Ap273	3	1.340	0.286	0.254	-0.125
	Ap274	2	1.038	0.037	0.036	-0.019
	Ap288	4	2.233	0.778	0.552	-0.409
	At168	2	1.865	0.500	0.464	-0.078
	At188	8	1.519	0.346	0.342	-0.013
<i>A. m. macedonica</i> M	A8	5	4.235	0.667	0.764	0.127
	A14	2	1.800	0.667	0.444	-0.500
	A24	2	2.000	0.500	0.500	0.000
	A29	6	6.000	1.000	0.833	-0.200
	A43	2	1.600	0.500	0.375	-0.333
	A79	5	3.000	0.833	0.667	-0.250
	A88	3	2.182	0.500	0.542	0.077
	A113	4	2.941	0.800	0.660	-0.212
	Ac11	3	2.323	0.667	0.569	-0.171
	Ac88	2	1.385	0.333	0.278	-0.200
	Ac139	2	1.600	0.500	0.375	-0.333
	Ap15	2	1.280	0.250	0.219	-0.143
	Ap68	3	2.133	0.750	0.531	-0.412
	Ap85	4	2.381	0.600	0.580	-0.034
	Ap90	4	2.880	0.833	0.653	-0.277
	Ap223	3	1.674	0.333	0.403	0.172
	Ap224	4	3.130	0.833	0.681	-0.224
	Ap226	3	2.667	0.833	0.625	-0.333
	Ap249	3	2.323	0.500	0.569	0.122
	Ap273	1	1.000	0.000	0.000	#N/A
	Ap274	1	1.000	0.000	0.000	#N/A
	Ap288	2	1.800	0.667	0.444	-0.500
	At168	2	1.800	0.333	0.444	0.250
	At188	2	1.180	0.167	0.153	-0.091

В настоящото проучване общият брой алели за locus 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) – Таблица 98.

Сравнението на тези данни с посочените от Николова (2011) показва установена хетерозиготност в значително по-широк диапазон както за H_o , така и за H_e . Николова (2011) съобщава, че установената хетерозиготност при изследваните български популации за отделните локуси варира между 0.403 и 0.732, а очакваната – между 0.405 и 0.785.

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 Boduret 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.

Таблица 99. Средни стойности и средна грешка (SE) за брой отчетени алели (N_a), ефективният брой алели (N_e), наблюдавана хетерозиготност (H_o), очаквана хетерозиготност (H_e) и фиксационен индекс (F), обобщени за шестте проучвани локуса и за изследваните популации от различните подвидове на *Apis mellifera*, включени в микросателитния ДНК анализ

Популация		N_a	N_e	H_o	H_e	F
<i>A. m. macedonica</i> България	Средно	4.917	2.745	0.534	0.528	-0.021
	SE	0.571	0.366	0.048	0.046	0.029
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	Средно	3.958	2.472	0.491	0.485	-0.006
	SE	0.472	0.370	0.056	0.045	0.057
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	Средно	5.875	2.850	0.484	0.499	0.025
	SE	0.781	0.572	0.049	0.048	0.024
<i>A. m. carnica</i>	Средно	4.875	2.547	0.442	0.429	-0.029
	SE	0.603	0.483	0.058	0.054	0.022
<i>A. m. ligustica</i>	Средно	5.542	2.372	0.410	0.424	0.048
	SE	0.692	0.437	0.052	0.050	0.037
<i>A. m. mellifera</i>	Средно	6.625	2.925	0.499	0.526	0.044
	SE	0.754	0.404	0.047	0.049	0.021
<i>A. m. anatoliaca</i>	Средно	6.500	2.962	0.515	0.535	0.031
	SE	0.740	0.462	0.043	0.044	0.021
<i>A. m. macedonica</i> В	Средно	4.875	2.584	0.503	0.518	0.014
	SE	0.536	0.354	0.038	0.041	0.022
<i>A. m. macedonica</i> G	Средно	5.375	2.537	0.534	0.518	-0.016
	SE	0.577	0.301	0.048	0.040	0.036
<i>A. m. macedonica</i> М	Средно	2.917	2.263	0.544	0.471	-0.158
	SE	0.262	0.226	0.055	0.045	0.044
Обобщени средни стойности за всички локуси и всички популации		N_a	N_e	H_o	H_e	F
	Средно	5.146	2.626	0.496	0.493	-0.005
	SE	0.203	0.128	0.016	0.015	0.011

Средният ефективен брой алели бе в диапазона от 2.263 – при *A. m. macedonica* М, до 2.962 – при *A. m. anatoliaca* (Таблица 99). Средните стойности на получената и очакваната хетерозиготност бяха в граници-

те от 0.410 – при *A. m. ligustica*, до 0.544 – при *A. m. macedonica* M, 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 Jiand Cohong, 2011). В нашето изследване всичките 24 микросателитни локуса демонстрираха сравнително висока степен на изменчивост, показвайки обща средна стойност на наблюдаваната и очакваната хетерозиготност за всички изследвани популации от порядъка на 0.496 и 0.493 съответно. Bodur 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 Bodur 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 подвита *A. m. macedonica*.

Сходни на установените в настоящото проучване резултати относно стойности на очаквана и наблюдавана хетерозиготност (0.108 – 0.816 и 0.067 – 0.867 съответно) са отчетени от De la Rúa et al. (2002) – за популации медоносни пчели от югоизточна Испания, и от De la Rúa et al. (2003) – за балеарски популации на *A. mellifera*. Високи стойности на очаквана и наблюдавана хетерозиготност (средна стойност – 0.869) са отчетени и за популации на *Apis cerana* (Ting Jiand Cohong, 2011). Трябва да се има предвид, че високите нива на генетична изменчивост се свързват с относително висок селекционен потенциал.

Още детайли относно получената и очакваната хетерозиготност са представени в Таблица 100, от която е видно, че най-ниска стойност на получена и очаквана хетерозиготност бе отчетена по Ar274, а най-висока – по A29 локуса.

Доскоро чрез микросателитен ДНК анализ са изследвани основно западноевропейски и африкански популации *Apis mellifera* (Franck et al., 1998; Franck et al., 2001), както и на по-късен етап – островни

популации на северносредиземноморските медоносни пчели (Franck et al., 2001; Dall'olio et al., 2007; Bodur et al., 2007). Популации от Близкия и Средния изток са проучвани чрез използването на 8 микросателитни локуса, при което е установена стойност на генетично разнообразие 0.65 (Franck et al., 2000a). В изследванията на Bodur et al. (2007) са представени стойности на генетично разнообразие в границите от 0.54 до 0.68, много близки до установените за популациите от Близкия и Средния изток. По данни на Franck et al., 2000b, генетичното разнообразие при северносредиземноморските медоносни пчели варира между 0.39 и 0.68. Средното ниво на генетично разнообразие, установено в нашето проучване, е близко по стойности до по-горе посочените, като не се пропуска от внимание фактът, че за анализите са използвани различни микросателитни локуси.

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 невисоки 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 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 100).

Според Hartl and Clark (2007) ниво на хетерозиготност, изразено чрез F_{ST} за двойки популации в границите от 0 до 0.05, е показател за ниски генетични разлики, от 0.05 до 0.15 – за средни, от 0.15 до 0.25 – за високи, и над 0.25 – за значителни генетични разлики. Предвид това данните от Таблица 101 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 популациите 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).

Таблица 100. Средни стойности на очакваната (H_e) и наблюдаваната (H_o) 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 H_e	Средна H_o	F_{is}	F_{it}	F_{st}	Nm
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

Nm стойностите предоставят информация за близостта или различията между изследваните популации в резултат на потока от гени (Таблицы 100 и 101). Ако Nm е по-малко от 2, това е показател за значителни разлики между популациите.

Таблица 101. F_{ST} и N_m стойности за изследваните популационни двойки от различните подвидове на *Apis mellifera*, включени в микросателитния ДНК анализ

Популация 1	Популация 2	F_{ST}	N_m
<i>A. m. macedonica</i> България	<i>A. m. macedonica</i> Гърция	0.017	14.594
<i>A. m. macedonica</i> България	<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	0.009	28.779
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	0.015	16.640
<i>A. m. macedonica</i> България	<i>A. m. carnica</i>	0.043	5.628
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	<i>A. m. carnica</i>	0.051	4.643
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	<i>A. m. carnica</i>	0.032	7.557
<i>A. m. macedonica</i> България	<i>A. m. ligustica</i>	0.071	3.294
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	<i>A. m. ligustica</i>	0.081	2.854
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	<i>A. m. ligustica</i>	0.059	3.960
<i>A. m. carnica</i>	<i>A. m. ligustica</i>	0.038	6.373
<i>A. m. macedonica</i> България	<i>A. m. mellifera</i>	0.290	0.613
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	<i>A. m. mellifera</i>	0.307	0.565
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	<i>A. m. mellifera</i>	0.303	0.574
<i>A. m. carnica</i>	<i>A. m. mellifera</i>	0.330	0.507
<i>A. m. ligustica</i>	<i>A. m. mellifera</i>	0.313	0.549
<i>A. m. macedonica</i> България	<i>A. m. anatoliaca</i>	0.087	2.629
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	<i>A. m. anatoliaca</i>	0.110	2.019
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	<i>A. m. anatoliaca</i>	0.109	2.049
<i>A. m. carnica</i>	<i>A. m. anatoliaca</i>	0.185	1.100
<i>A. m. ligustica</i>	<i>A. m. anatoliaca</i>	0.205	0.968
<i>A. m. mellifera</i>	<i>A. m. anatoliaca</i>	0.272	0.669
<i>A. m. macedonica</i> България	<i>A. m. macedonica</i> B	0.013	19.235
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	<i>A. m. macedonica</i> B	0.028	8.728
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	<i>A. m. macedonica</i> B	0.018	14.008
<i>A. m. carnica</i>	<i>A. m. macedonica</i> B	0.042	5.650
<i>A. m. ligustica</i>	<i>A. m. macedonica</i> B	0.072	3.243
<i>A. m. mellifera</i>	<i>A. m. macedonica</i> B	0.290	0.611
<i>A. m. anatoliaca</i>	<i>A. m. macedonica</i> B	0.096	2.360
<i>A. m. macedonica</i> България	<i>A. m. macedonica</i> G	0.015	16.390
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	<i>A. m. macedonica</i> G	0.017	14.422
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	<i>A. m. macedonica</i> G	0.014	17.693
<i>A. m. carnica</i>	<i>A. m. macedonica</i> G	0.046	5.212
<i>A. m. ligustica</i>	<i>A. m. macedonica</i> G	0.074	3.133
<i>A. m. mellifera</i>	<i>A. m. macedonica</i> G	0.285	0.627
<i>A. m. anatoliaca</i>	<i>A. m. macedonica</i> G	0.096	2.357
<i>A. m. macedonica</i> B	<i>A. m. macedonica</i> G	0.021	11.387
<i>A. m. macedonica</i> България	<i>A. m. macedonica</i> M	0.027	9.083
<i>A. m. macedonica</i> Гърция	<i>A. m. macedonica</i> M	0.029	8.366
<i>A. m. macedonica</i> Р. Македония	<i>A. m. macedonica</i> M	0.022	11.371
<i>A. m. carnica</i>	<i>A. m. macedonica</i> M	0.053	4.485
<i>A. m. ligustica</i>	<i>A. m. macedonica</i> M	0.083	2.752
<i>A. m. mellifera</i>	<i>A. m. macedonica</i> M	0.315	0.544
<i>A. m. anatoliaca</i>	<i>A. m. macedonica</i> M	0.116	1.906
<i>A. m. macedonica</i> B	<i>A. m. macedonica</i> M	0.028	8.753
<i>A. m. macedonica</i> G	<i>A. m. macedonica</i> M	0.029	8.406

По отношение на анализираният микросателитен локус стойността на потока от гени бе по-голяма от 2 за A29 (5.131) и за Ap90 (2.857) локусите – Таблица 100. По отношение на анализиранията популация *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). 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 неконтролираната 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 анализиранията популация. 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* – Таблица 101. В проучването на Николова (2011) е установено, че за отделните анализирани локуси *Nm* варира от 0.402 до 3.282.

Високи стойности на *Nm* по отношение на анализирани алоензимни локуси в български популации медоносни пчели са отчетени от Georgieva et al. (2016), което също демонстрира ниски нива на генетична диференциация в рамките на проучваните български пчелни популации. Георгиева (2016) сравнява строго контролирани български популации *A. m. macedonica*, тип *rodopica*, с популации на *A. m. carnica* от територията на Косово и съобщава за поток от гени между тях от порядъка на 8.28. За същите косовски популации Peševa et al. (2015) коментират ниски нива на генетична диференциация на базата на високи стойности на *Nm*.

Данните от Таблицы 102 и 103 демонстрират генетичната дистанция и генетичната близост между анализиранията популации на различните подвидове и произходи. 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*).

Както данните за генетичната дистанция, така и тези за генетичната близост по Nei (1972) показват, че популациите от групата на *A. m. macedonica* са генетично много близки. Това корелира със стойностите на всички останали обсъждани вече генетични показатели, които демонстрират по-ниски стойности на генетична диференциация сред популациите на този подвид.

Таблица 102. Генетична дистанция по Nei (1972) между анализираните пчелни популации от различните подвидове на *Apis mellifera*, включени в микросателитния ДНК анализ

	<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. anat.</i>	<i>A. m. mac. B</i>	<i>A. m. mac. G</i>	<i>A. m. mac. M</i>
<i>A. m. mac. Bg</i>	0.000									
<i>A. m. mac. Gr</i>	0.036	0.000								
<i>A. m. mac. Mac</i>	0.019	0.030	0.000							
<i>A. m. car.</i>	0.075	0.096	0.052	0.000						
<i>A. m. lig.</i>	0.136	0.149	0.106	0.068	0.000					
<i>A. m. mel.</i>	0.817	0.825	0.816	0.791	0.743	0.000				
<i>A. m. anat.</i>	0.227	0.269	0.282	0.443	0.489	0.790	0.000			
<i>A. m. mac. B</i>	0.031	0.059	0.037	0.074	0.137	0.812	0.257	0.000		
<i>A. m. mac. G</i>	0.033	0.033	0.028	0.084	0.140	0.785	0.254	0.05	0.000	
<i>A. m. mac. M</i>	0.061	0.057	0.043	0.099	0.155	0.826	0.281	0.059	0.063	0.000

Таблица 103. Генетична близост по Nei (1972) между анализираните пчелни популации от различните подвидове на *Apis mellifera*, включени в микросателитния ДНК анализ

	<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. anat.</i>	<i>A. m. mac. B</i>	<i>A. m. mac. G</i>	<i>A. m. mac. M</i>
<i>A. m. mac. Bg</i>	1.000									
<i>A. m. mac. Gr</i>	0.964	1.000								
<i>A. m. mac. Mac</i>	0.981	0.970	1.000							
<i>A. m. car.</i>	0.925	0.904	0.948	1.000						
<i>A. m. lig.</i>	0.864	0.851	0.894	0.932	1.000					
<i>A. m. mel.</i>	0.183	0.175	0.184	0.209	0.257	1.000				
<i>A. m. anat.</i>	0.773	0.731	0.718	0.557	0.511	0.210	1.000			
<i>A. m. mac. B</i>	0.969	0.941	0.963	0.926	0.863	0.188	0.743	1.000		
<i>A. m. mac. G</i>	0.967	0.967	0.972	0.916	0.860	0.215	0.746	0.948	1.000	
<i>A. m. mac. M</i>	0.939	0.943	0.957	0.901	0.845	0.174	0.719	0.941	0.937	1.000

С цел по-детайлни сравнения между включените в изследването популации от различни подвидове и произходи на *Apis mellifera* и характеризиране на диференциацията между тях бе приложен и асигнационен тест. Както се вижда от графичните данни за принадлежност на индивидите от проучваните популации, представени в Приложение на фигурите 60 – 66, *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 из-

числените генетична дистанция и генетична близост по Nei (1972) – Таблици 102 и 103.

На Фигура 60 (Приложение) е представено обобщено графично изображение на разпределението на индивидите сред анализираните пчелни популации от различните подвидове на *Apis mellifera*, включени в микросателитния ДНК анализ. Видно е, че подвидът *A. m. mellifera* е отчетливо различим от останалите. Той формира самостоятелна група без препокриване с останалите подвидове. Сравнително ясно разграничен от останалите подвидове е и *A. m. anatoliaca*. От фигурата се вижда, че той има слаби препокривания по отношение на единични изследвани индивиди от популациите с различни произходи на *A. m. macedonica*, което обаче не повлиява отделното им групиране. Всички популации от подвида *A. m. macedonica* са групирани заедно, което е и поредно доказателство за голямата им генетична близост.

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 с 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 на макар и слабо сходство с подвида *A. m. anatoliaca*, коментирано на базата на резултатите от митохондриалния ДНК анализ, се нуждае от доуточнения, които микросателитният анализ би могъл да предостави.

От представеното на Фигури 61 и 62 (Приложение) 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 63 – 66 – Приложение) 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 локуса.

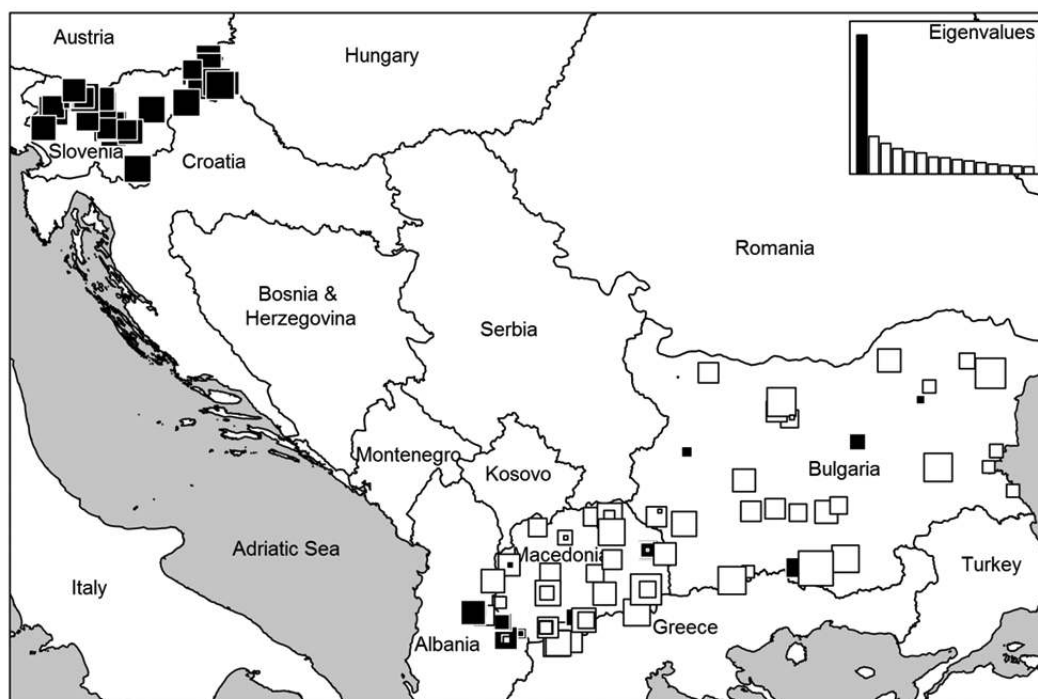
Сравнението между *A. m. macedonica* с произход България и подвида *A. m. mellifera* се вписва като допълнителен мотив в сравнителната схема на проучването предвид констатираната най-съществена генетична диференциация между тези два подвида, дължаща се както на географска изолация, така и на факта, че 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 на разпространението на този подвид на територията на Балканския полуостров и предоставянето 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 характеризиране 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 специфични генетични характеристики (вече описани в изложението по-горе), по които се отличава от другите популации на този подвид. Това в значима степен дава достатъчни основания да се коментира като различен екотип, адаптиран към конкретните условия, характерни за територията на страната ни. Фигурите 67 и 68 (Приложение), представени по-долу, подкрепят това заключение.

Информацията от Фигура 67 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; Muñoz et al., 2012. Влиянието на типа *carnica* би могло да се обясни с внос през годините на пчелни майки от този подвид предвид

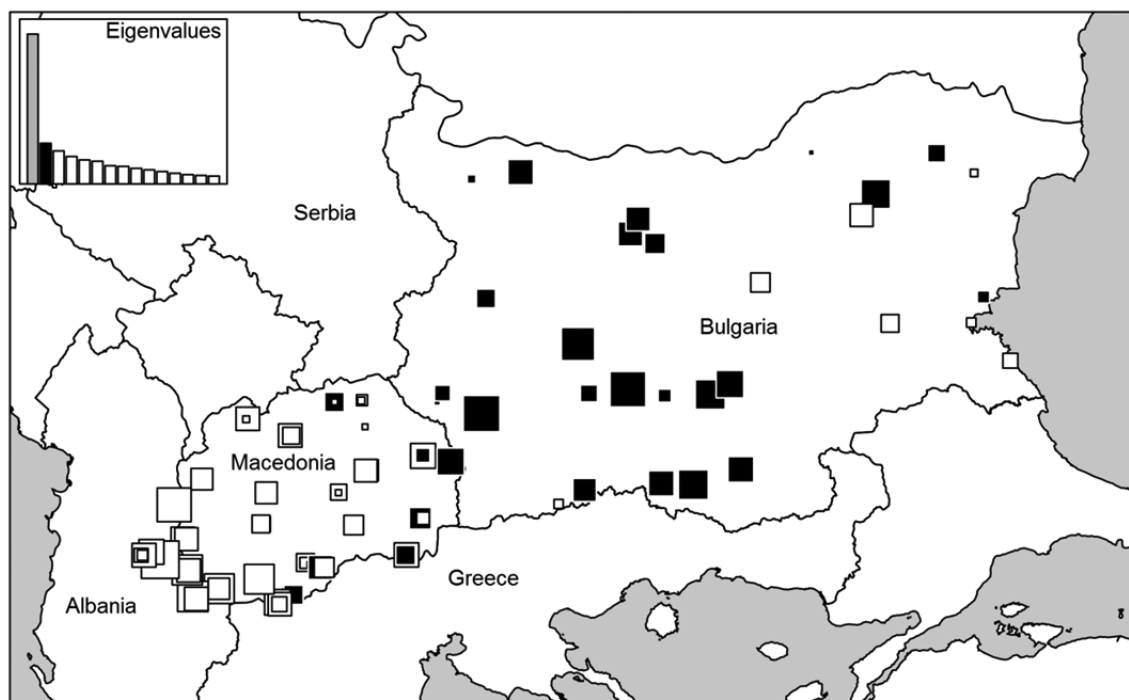
широкото му разпространение на територията на Европа по комерсиални причини.



Фигура 67. 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)

Получените резултати от пространствения анализ показват ясно подразделяне в групата на подвида *A. m. macedonica* (Фигура 68). 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.



Фигура 68. sPCA общ пространствен план, базиран на географските координати на проучваните не-*carnica* популации, групирани в два субкълъстера.

С черните квадратчета са обозначени популациите, демонстриращи специфични генетични характеристики в рамките на общата група (Uzunov et al., 2014a)

*Данните за дискриминирането на българската медоносна пчела се допълват със специфични генетични характеристики, базирани на използваните в настоящото изследване алоензимен, митохондриален и микросателитен ДНК анализ. 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 на подвида *A. m. macedonica* (екотип *rodopica*), 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). Основавайки 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 доскоро. 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 характеризираните вече алоензимни и микросателитни локуси, така и на базата на морфометрични показатели, митохондриален ДНК анализ, поведенчески, продуктивни и други качества.

На Фигура 69 (Francis et al., 2014) е представена сравнителна информация, базирана на данните от микросателитния анализ по 24-те включени в изследването локуса. 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 данни за *A. m. macedonica* са включени и резултатите от неконтролираната българска популация, описани и коментирани по-горе.

Фигура 69 (Приложение) представя барплат (Structure), показващ референтните популации (на горния ред), спрямо които е извършен сравнителният анализ, и обобщените резултати от европейския

GEI експеримент (на долния ред) при $K = 9$. K е поредица от 9 отделни референтни популации, показана като серия от 9 различни цвята. Всяка вертикална линия представя отделен индивид, а цветовете индикират принадлежността към определената популация. Референтните популации от ляво надясно са обозначени, както следва: car – (*A. m. carnica*), lig – (*A. m. ligustica*), mac – (*A. m. macedonica*), melA – (*A. m. mellifera* Austria), melL – (*A. m. mellifera* Læsø), mel – (*A. m. mellifera*), sic – (*A. m. siciliana*), ana – (*A. m. anatoliaca*), и buk – (*A. m. mellifera* X Buckfast). Произходът на референтните популации е отбелязан с двубуквен код за отделните страни (HR – Croatia, SL – Slovenia, IT – Italy, AL – Albania, BG – Bulgaria, GR – Greece, MK – Macedonia, AT – Austria, DK – Denmark, NL – Netherlands, NO – Norway, PL – Poland, CH – Switzerland, TR – Turkey). За маркиране на тестовите популации са използвани символи, отбелязващи подвида и произхода (или генетичната линия), към която принадлежат (Francis et al., 2014).

От фигурата е видно, че включената в GEI експеримента българска популация, подложена на селекционен контрол (macB = *A. m. macedonica* B), 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 появата 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 резултатите 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 подходи за контрол 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 на 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 селекционни 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 значи-**

мите селекционни качества (продуктивност и численост, зимоустойчивост, качества на пчелните майки) по отношение на европейските подвидове с различен произход – Büchler et al., 2014; Natjina et al., 2014a; Meixner et al., 2015; 3) характеризиране на популационна динамика и важни поведенчески особености (ройливост, агресивност, хигиенно поведение) на европейските медоносни пчели – Natjina 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 тестгрупа участват в сравнителен анализ, като същите са разположени на поне 3 от 21 тестлокации (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 медикаменти.

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 върху поведенческите особености на пчелите (Uzunov et al., 2014b);
- 3) сред причините за пчелни загуби в Европа са *Varroa* (38%), проблеми с пчелната майка и търтеите (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 експеримента 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 крилетите), 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 на *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, т.е. 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 CarV (стойности 47.56 и 49.15 съответно, между които няма статистически достоверна разлика) – Uzunov et al., 2014b;
- 6) по отношение на *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; Hatjina et al., 2014a;
- 7) по отношение на *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.

*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 предложи 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 Таблицы 104 – 106 са представени данни за констатираната генетична изменчивост сред контролираните и неконтролираните популации на българската медоносна пчела, които успешно биха могли да се използват при характеризирането и разграничаването ѝ.

Таблица 104. 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

Таблица 105. 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 контролираните 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 ⁸⁰ – 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 ¹⁰⁶ – разлики в честотата 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 ⁸⁸ – разлики в честотата 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 ⁸⁰ и ALP ⁹⁰ – разлики в честотата 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 ¹¹⁴ – разлики в честотата 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 ⁸⁷ – присъствие и липса в генофонда HK ¹¹⁰ – разлики в честотата на срещане

Таблица 106. Обобщени данни относно микросателитната ДНК изменчивост по 24-те изследвани локуса 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-голямо 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 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 – само 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-голямо 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 <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> В 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	128 134 136	0.625 – 0.680 0.300 – 0.354 0.020 – 0.021	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 алелно разнообразие при <i>A. m. macedonica</i> с произход България
At188	189 199 205 211 212 213 217 219	0.739 – 0.804 0.00 – 0.109 0.036 – 0.043 0.018 – 0.022 0.00 – 0.018 0.065 – 0.089 0.018 – 0.022 0.00 – 0.018	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

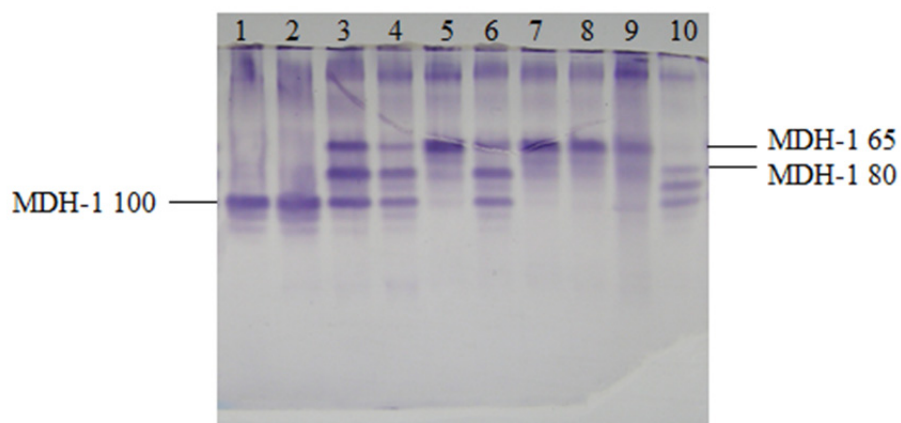
Представените обобщени резултати от европейския GEI експеримент относно ценни биологични и стопански качества на медоносните пчели, както и данните в Таблицы 104 – 106 показват, че българската медоносна пчела, която е най-адаптирана към конкретните условия на страната ни, се характеризира и с високо 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 научнообосновани мероприятия по консервацията и селекцията ѝ е необходима система от надеждни генетични критерии, характеризиращи изменчивостта ѝ на популационно ниво. В този смисъл настоящото 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 акцентира, че в Развѣдната програма за съхраняване на местната за страната българска медоносна пчела (Петров и Ганев, 2013) е отбелязано: „Основна цел на развѣдната работа е запазване на генофонда и генетичното 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“.

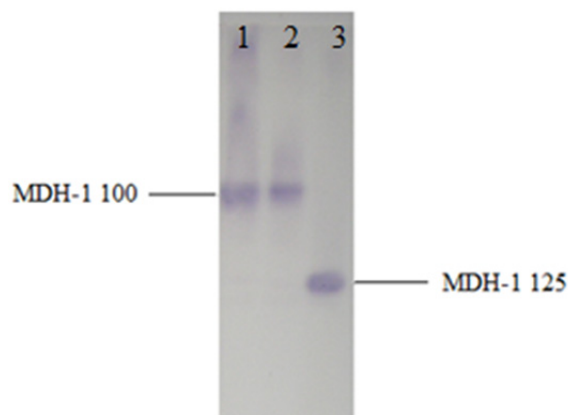
Националната програма се прилага в България вече над 15 години. В страната ни официално е забранен вносът на чужди майки от други подвидове. В глава четвърта от Закона за пчеларството (последно изм. и доп. – ДВ, бр. 61 от 25 юли 2014 г.), в чл. 18. (1) се казва:

„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 на генетичното разнообразие сред местните популации на българската медоносна пчела. Представените в Таблица 105 алоензимни показатели демонстрират високо ниво на генетично сходство сред контролираните и неконтролираните 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 подвиг, както и причина за съществуването на местен екотип – „*rodopica*“, на подвида *A. m. macedonica* на територията на България.

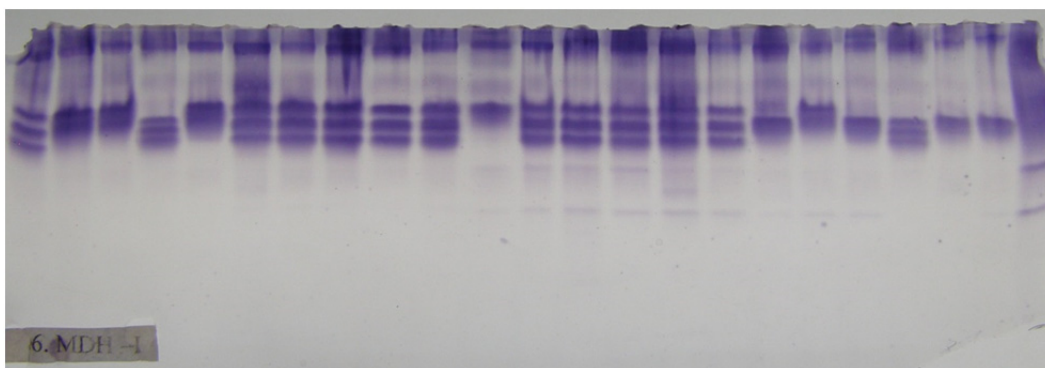
ПРИЛОЖЕНИЕ



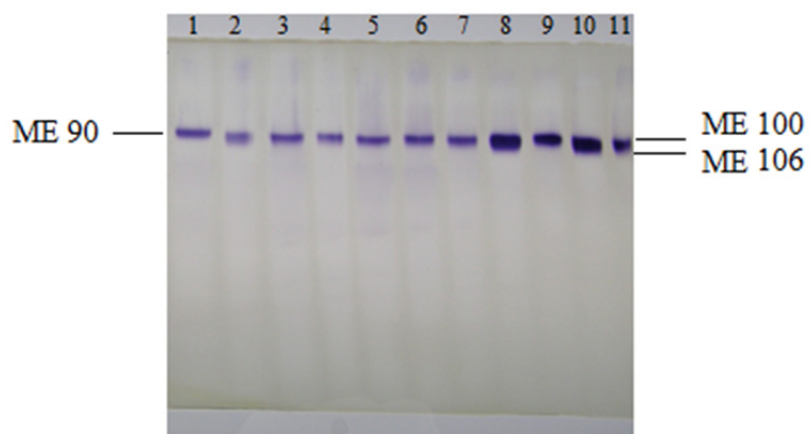
Фигура 3. Спектър на MDH в полиакриламиден гел при пчели работнички: 1, 2 – MDH-1 100/100; 3, 4, 6 – MDH-1 65/100; 5, 7, 8, 9 – MDH-1 65/65; 10 – MDH-1 80/100



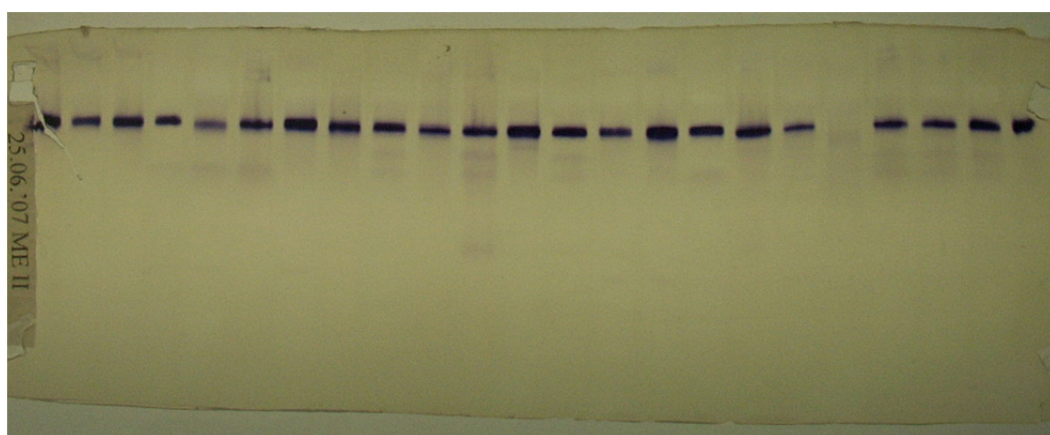
Фигура 4. Спектър на MDH в полиакриламиден гел при пчели работнички: 1, 2 – MDH-1 100/100; 3 – MDH-1 125/125



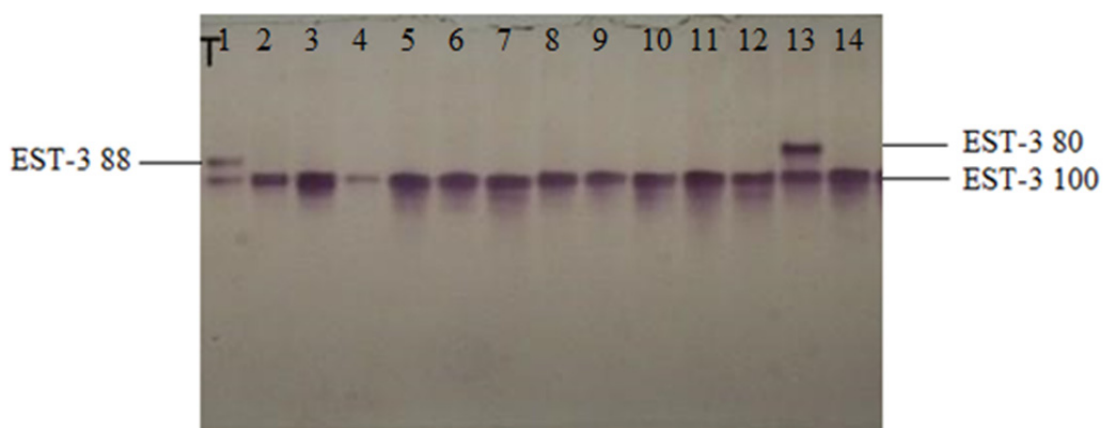
Фигура 5. Спектър на MDH в полиакриламиден гел при пчели работнички – различни генотипни комбинации



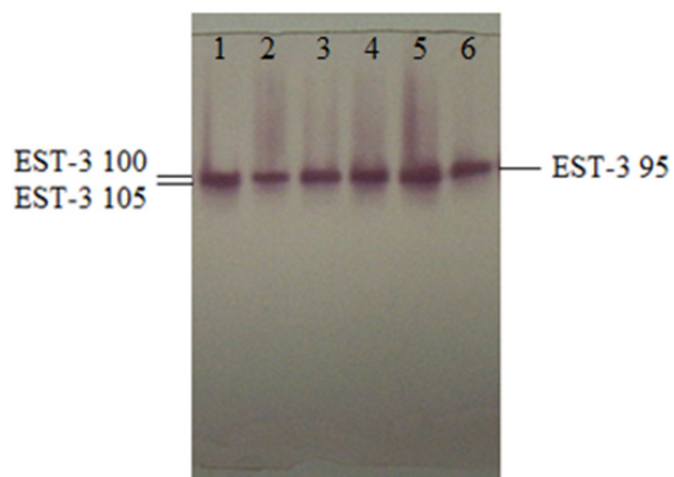
Фигура 6. Спектър на МЕ в полиакриламиден гел при пчели работнички: 1 – МЕ 90/90; 2, 3, 4, 5, 6, 7 – МЕ 100/100; 8, 10, 11 – МЕ 100/106; 9 – МЕ 90/100



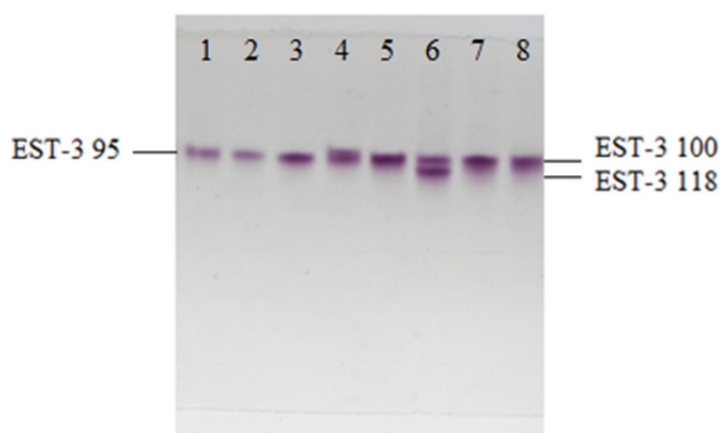
Фигура 7. Спектър на МЕ в полиакриламиден гел при пчели работнички – различни генотипни комбинации



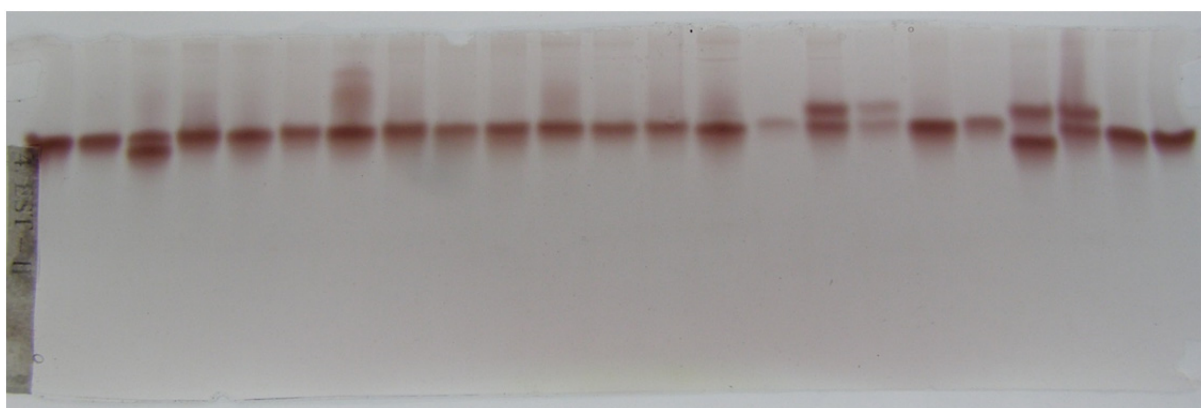
Фигура 8. Спектър на EST-3 в полиакриламиден гел при пчели работнички: 1 – EST-3 88/100; 13 – EST-3 80/100



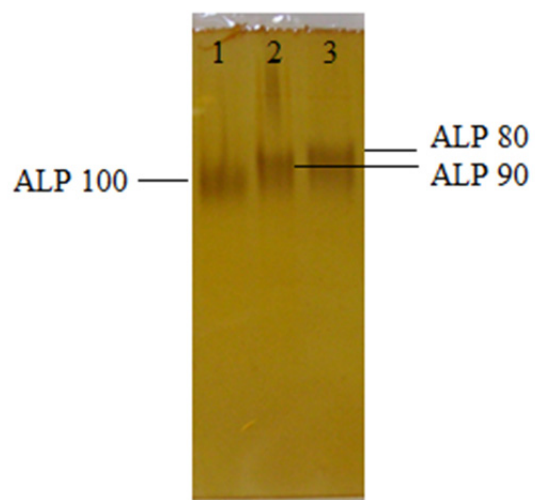
Фигура 9. Спектър на EST-3 в полиакриламиден гел при пчели работнички: 1, 5 – EST-3 100/105; 2, 3, 4 – EST-3 100/100; 6 – EST-3 95/95



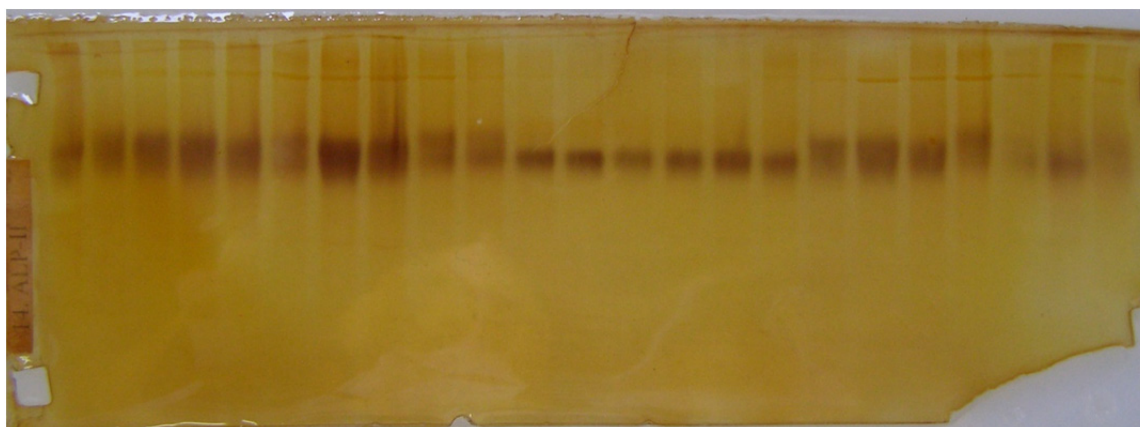
Фигура 10. Спектър на EST-3 в полиакриламиден гел при пчели работнички: 1, 2 – EST-3 95/95; 3, 5, 7, 8 – EST-3 100/100; 4 – EST-3 95/100; 6 – EST-3 100/118



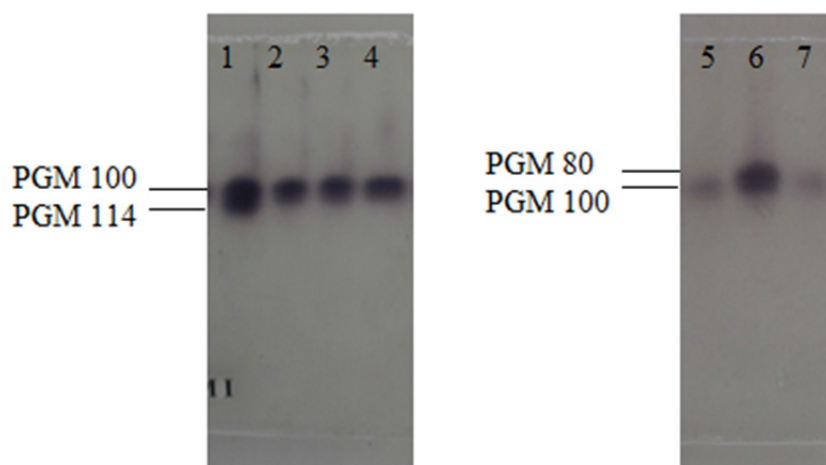
Фигура 11. Спектър на неспецифичните естерази в полиакриламиден гел при пчели работнички – различни генотипни комбинации



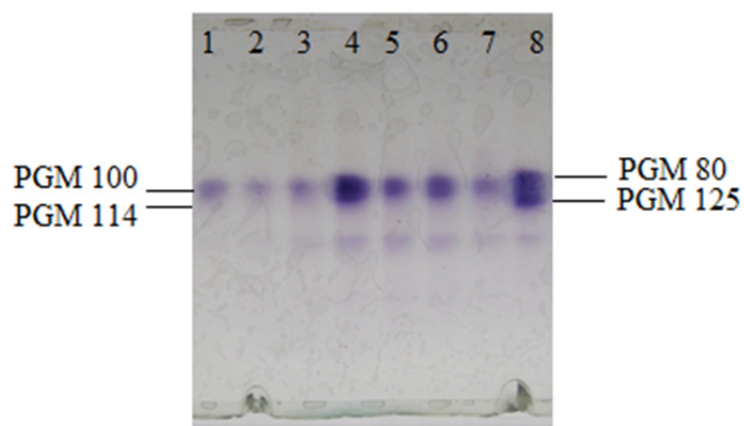
Фигура 12. Спектър на ALP в полиакриламиден гел при пчели работнички: 1 – ALP 100/100; 2 – ALP 90/90; 3 – ALP 80/80



Фигура 13. Спектър на ALP в полиакриламиден гел при пчели работнички – различни генотипни комбинации

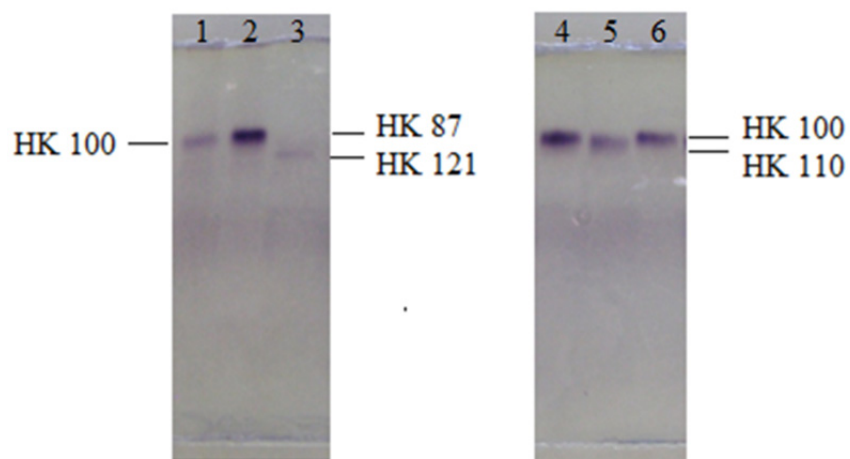


A

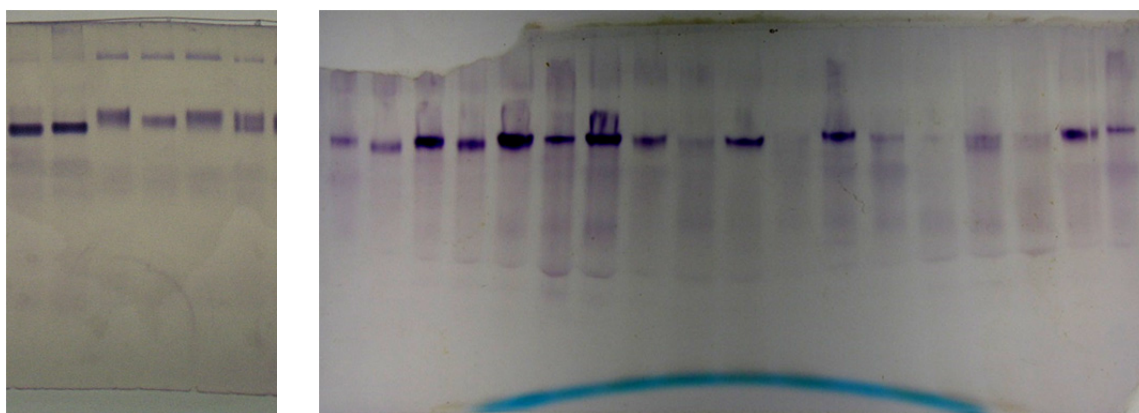


В

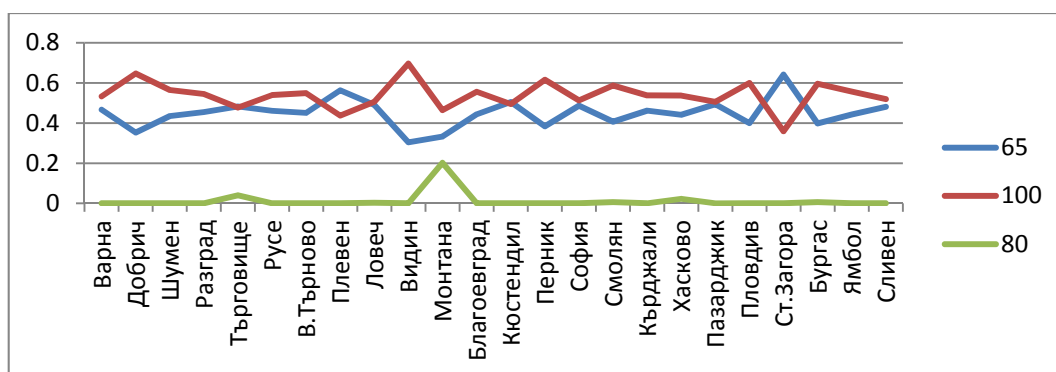
Фигура 14. Спектър на PGM в полиакриламиден гел при пчели работнички – различни генотипни комбинации. А: 1 – PGM100/114; 2, 3, 4, 5 и 7 – PGM 100/100; 6 – PGM 80/100. В: 1, 2, 3, 5, 7 – PGM 100/100; 4, 6 – PGM 100/114; 8 – PGM 80/125



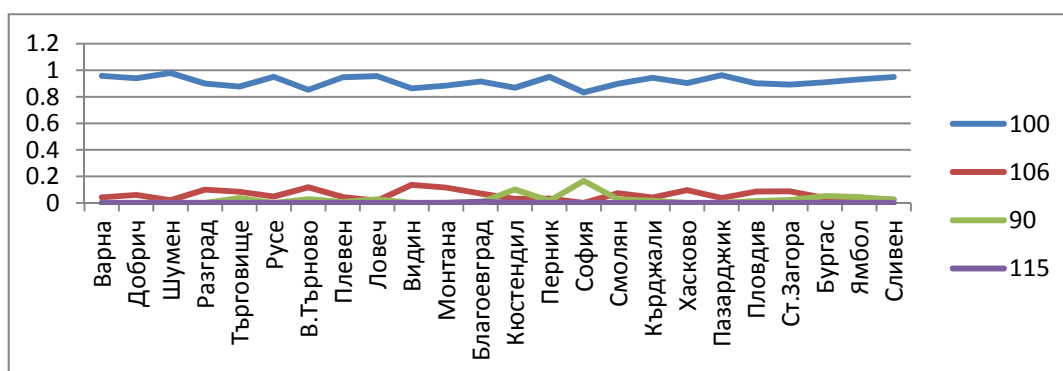
Фигура 15. Спектър на НК в полиакриламиден гел при пчели работнички: 1, 4, 6 – НК 100/100; 2 – НК 87/100; 3 – НК 121/121; 5 – НК 110/110



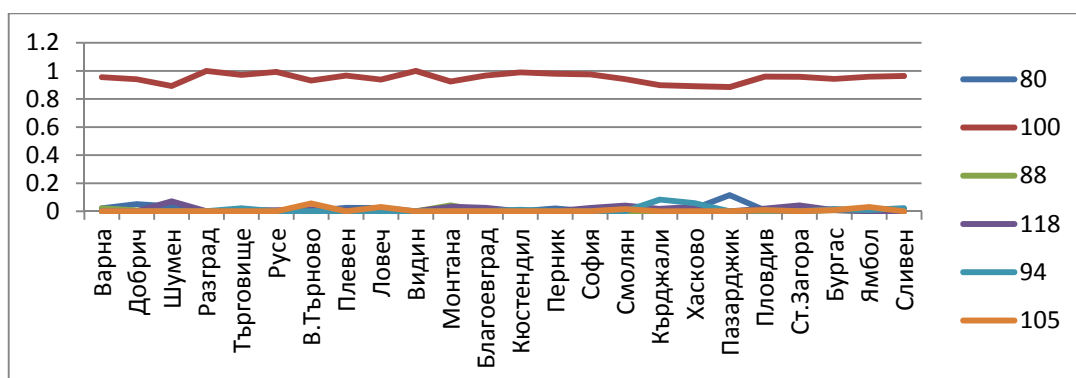
Фигура 16. Спектър на НК в полиакриламиден гел при пчели работнички – различни генотипни комбинации



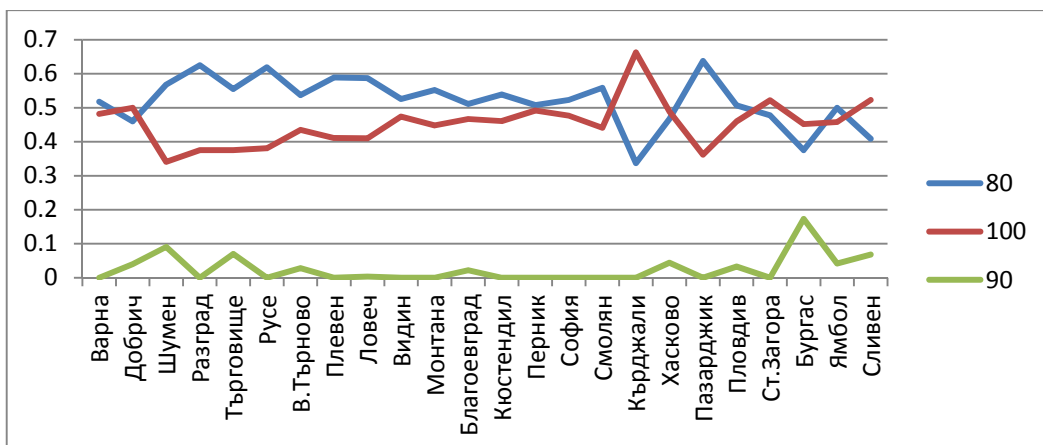
Фигура 18. Алелни честоти по MDH-1 локуса



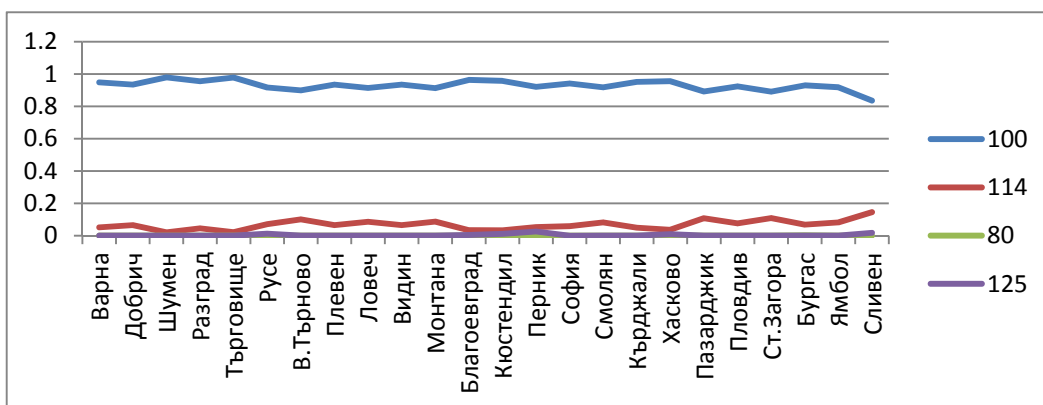
Фигура 19. Алелни честоти по ME локуса



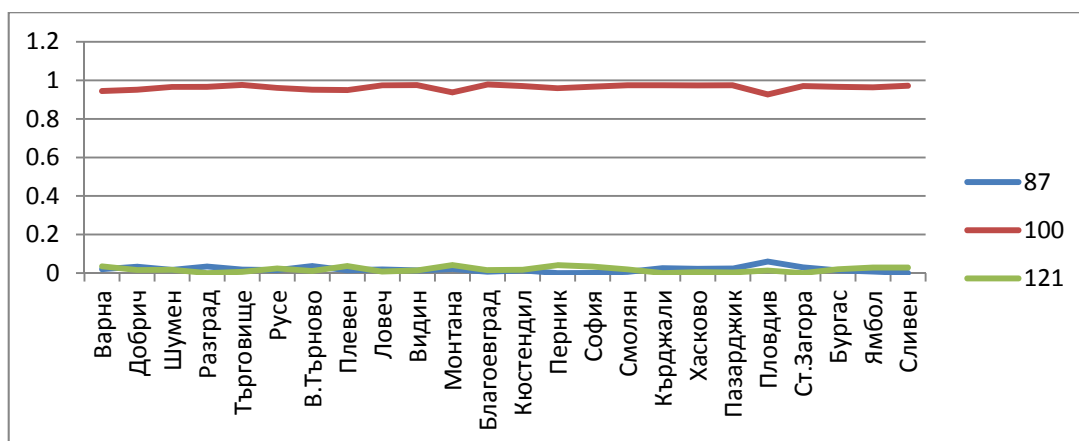
Фигура 20. Алелни честоти по EST-3 локуса



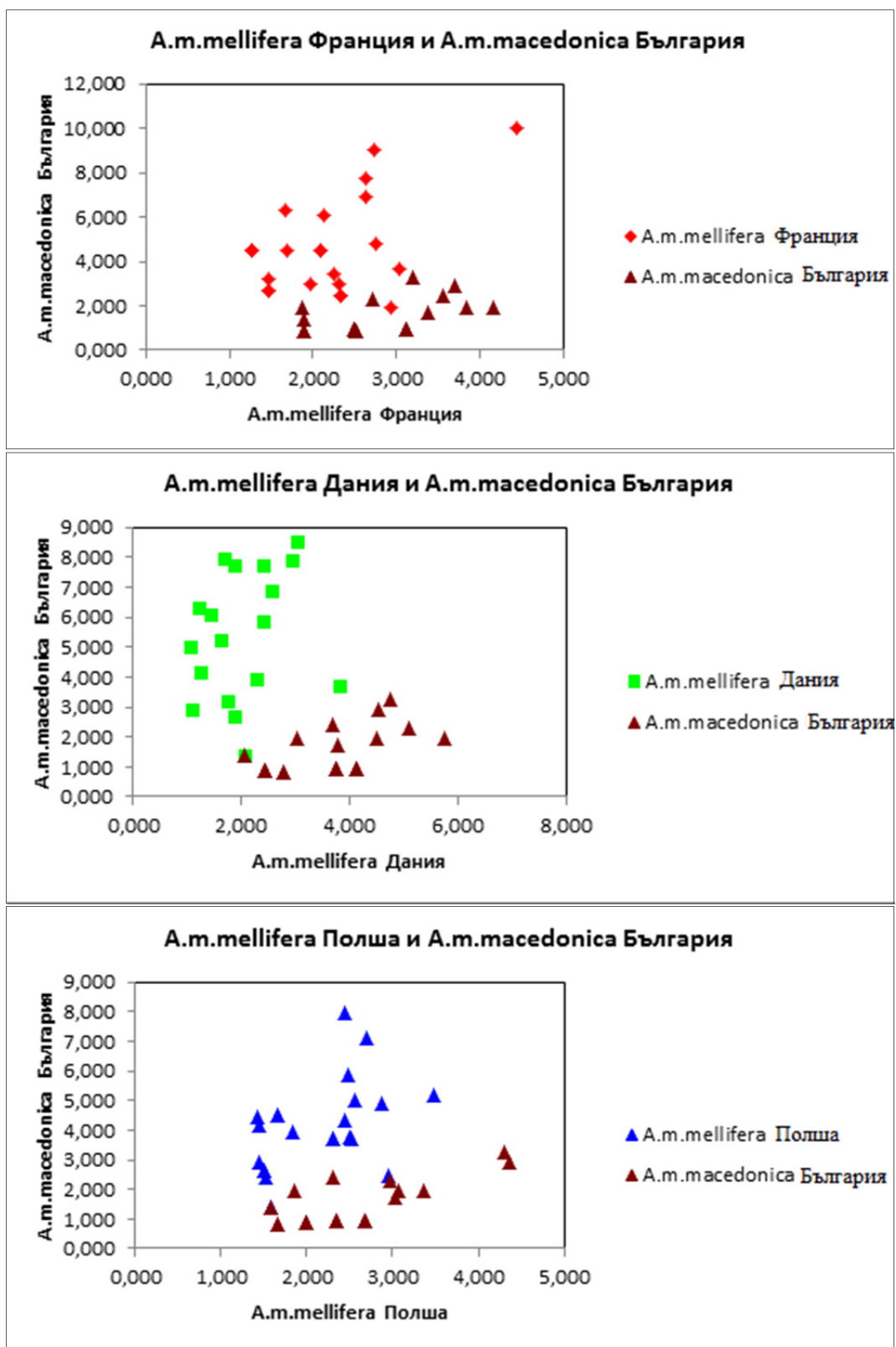
Фигура 21. Алелни честоти по ALP локуса



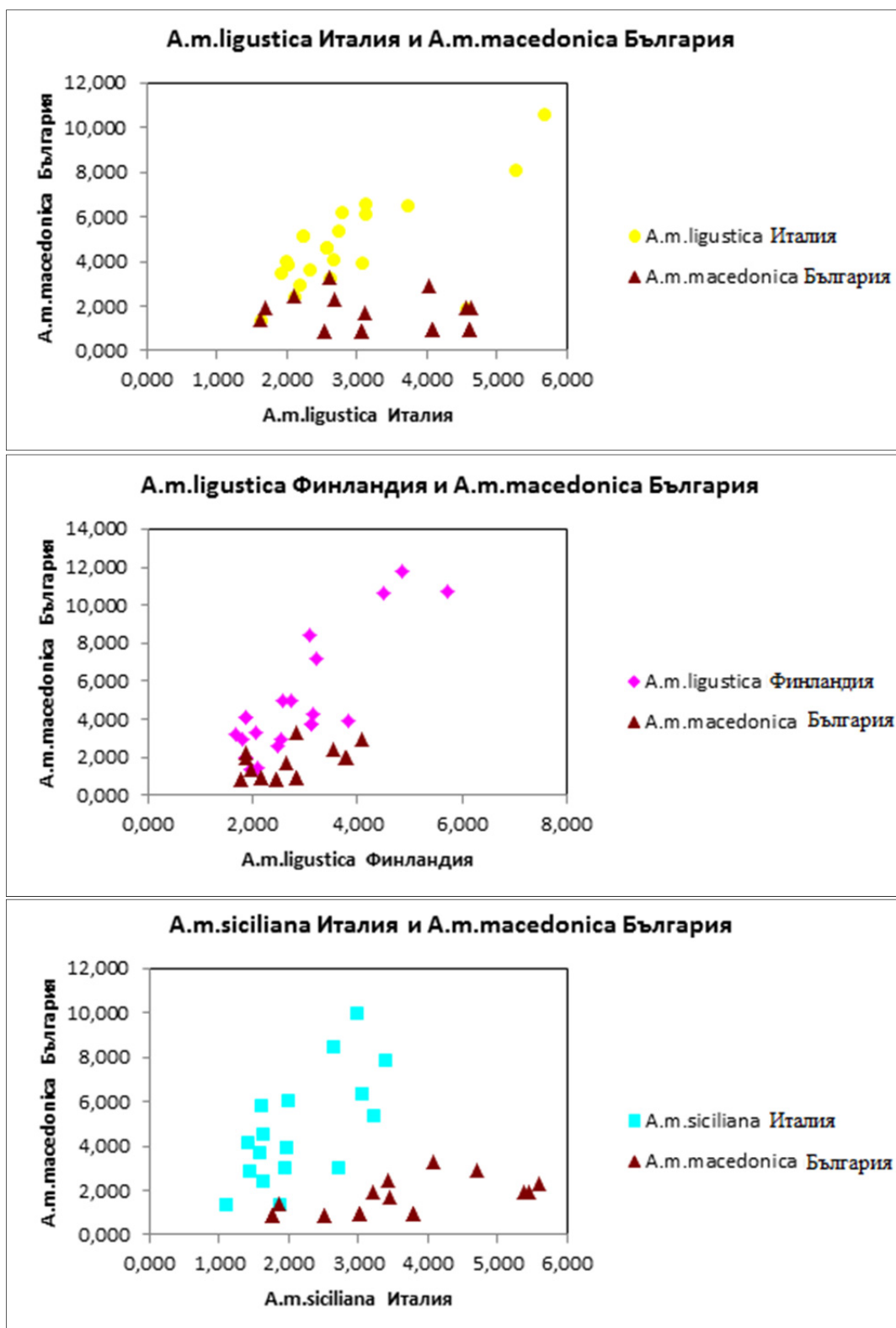
Фигура 22. Алелни честоти по PGM локуса



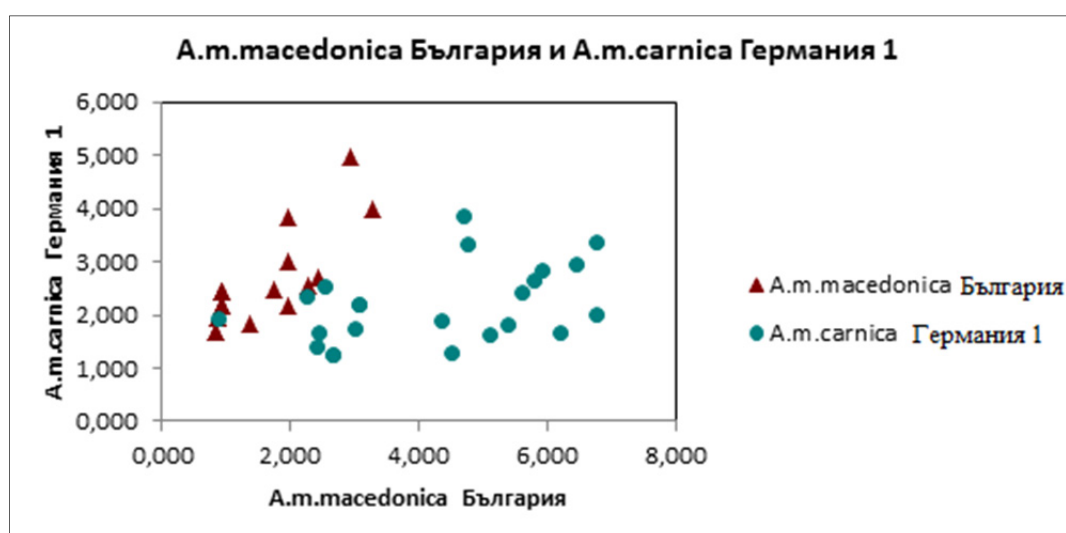
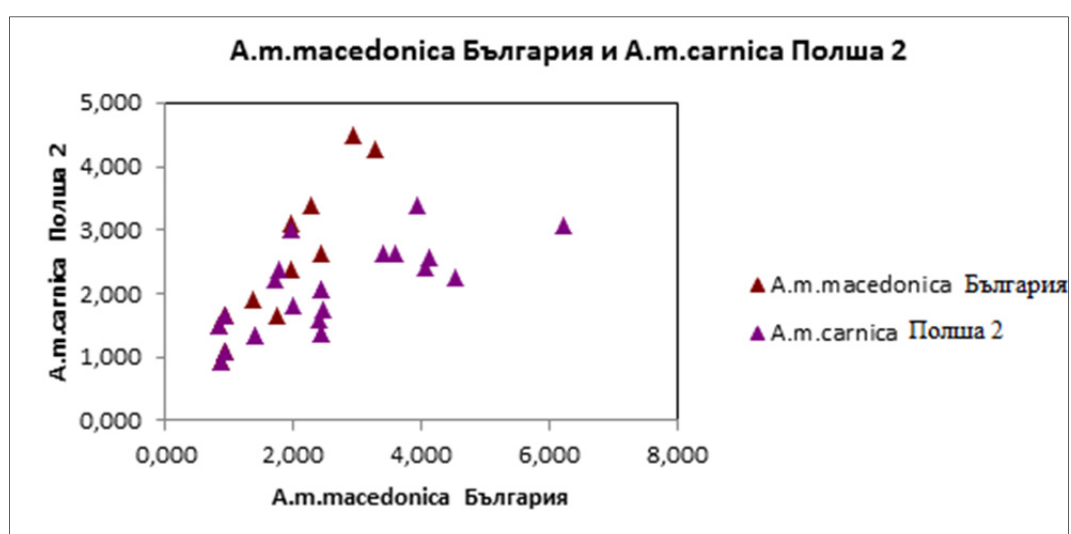
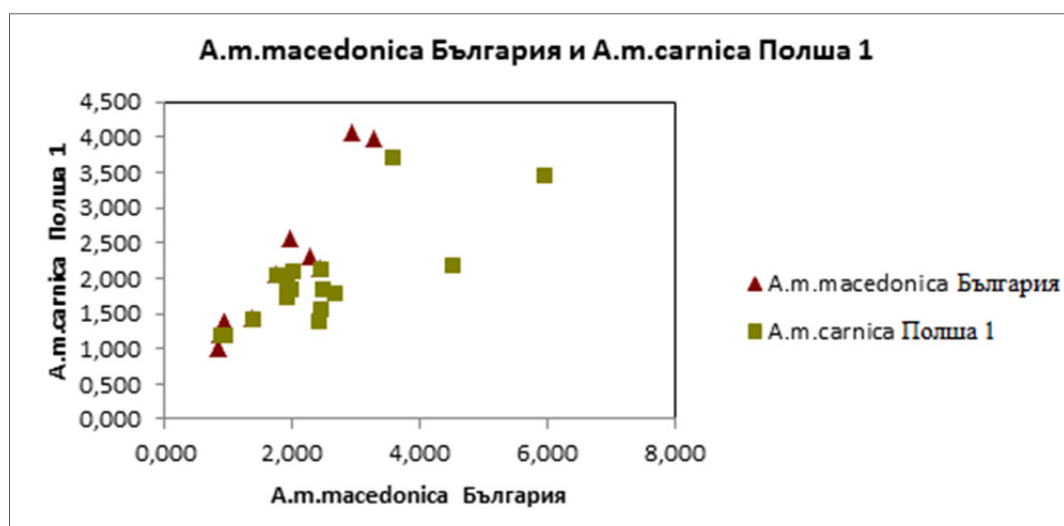
Фигура 23. Алелни честоти по HK локуса

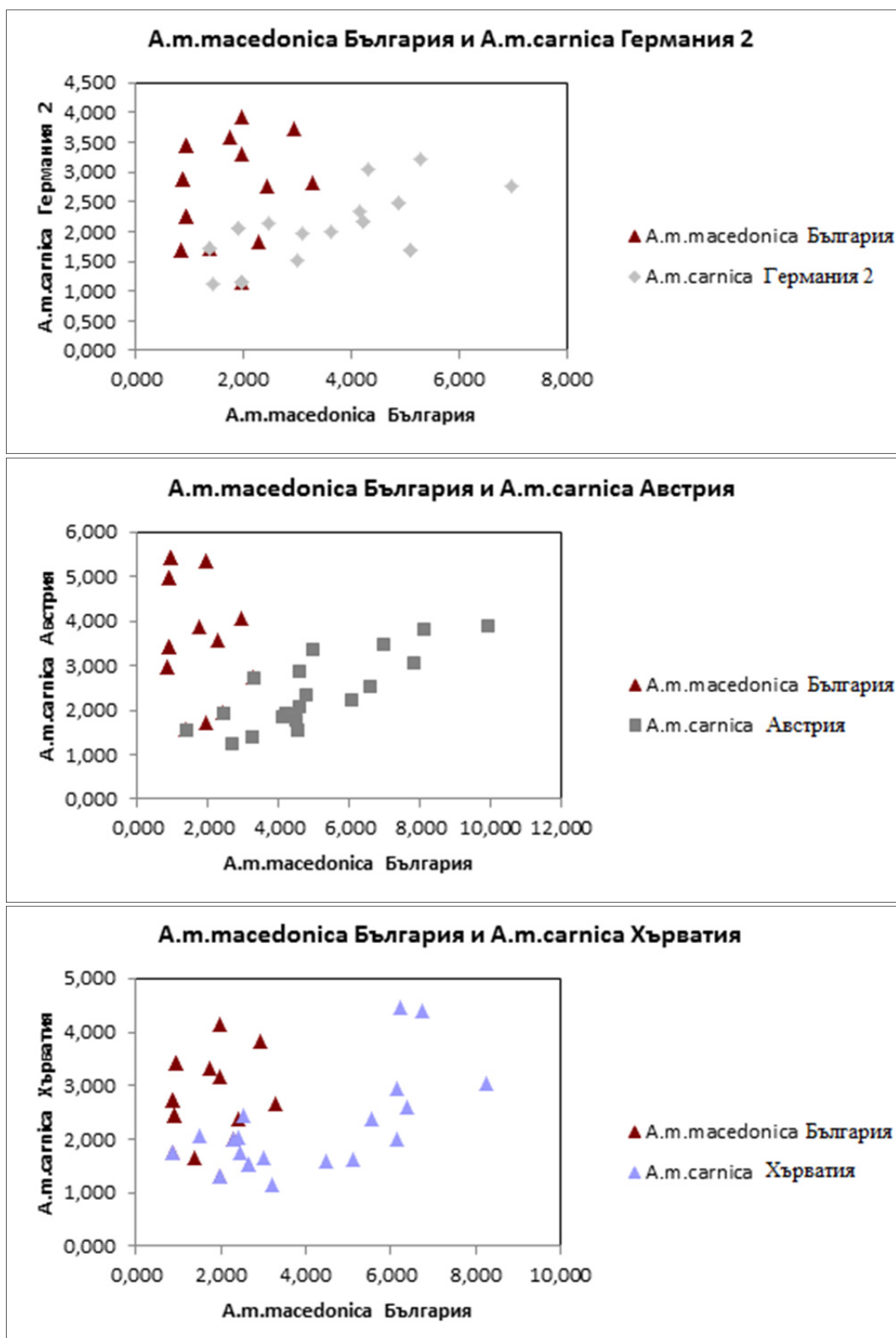


Фигура 32. Обобщено графично изображение на разпределението на индивидите от *A. m. macedonica*, произход България и, *A. m. mellifera*, произход Франция, Дания и Полша

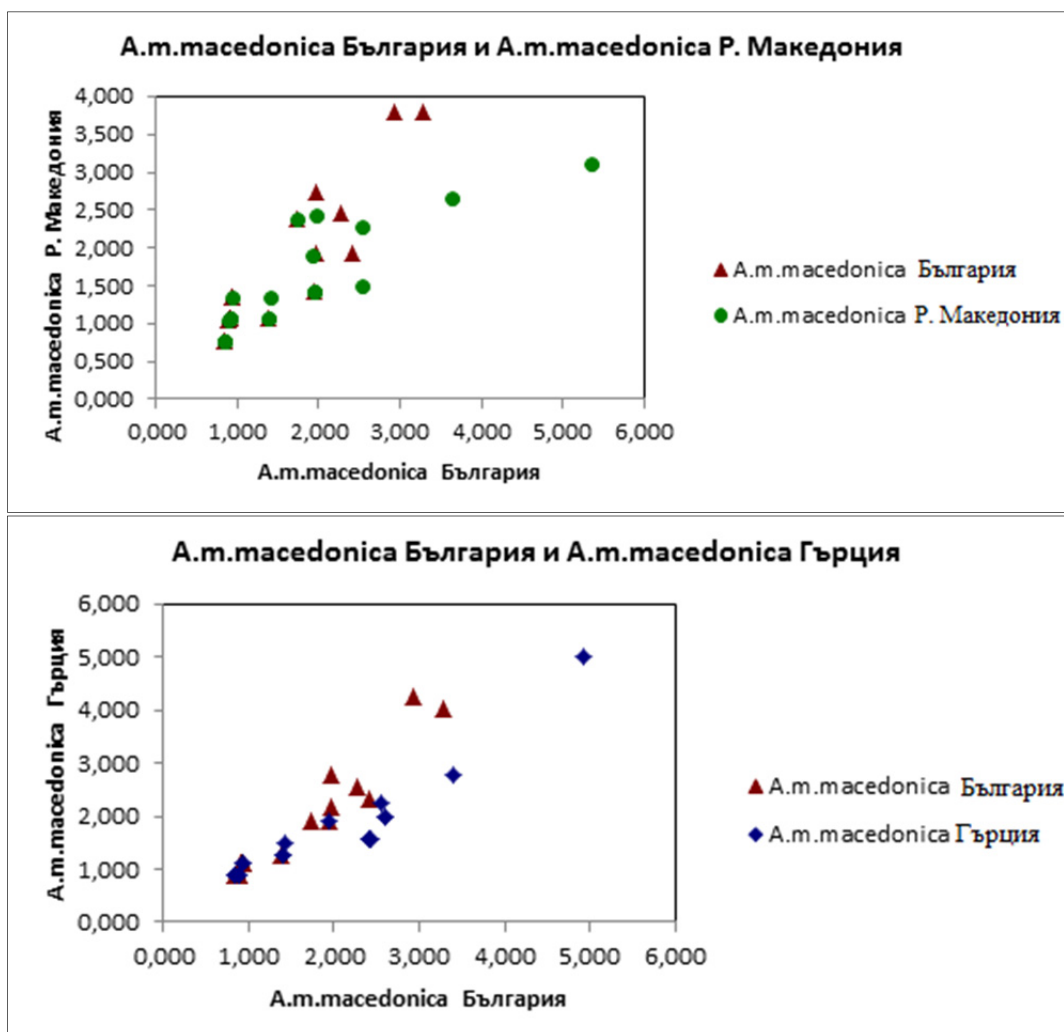


Фигура 33. Обобщено графично изображение на разпределението на индивидите от *A. m. macedonica*, произход България, *A. m. ligustica*, произход Италия и Финландия, и *A. m. siciliana*, произход Италия

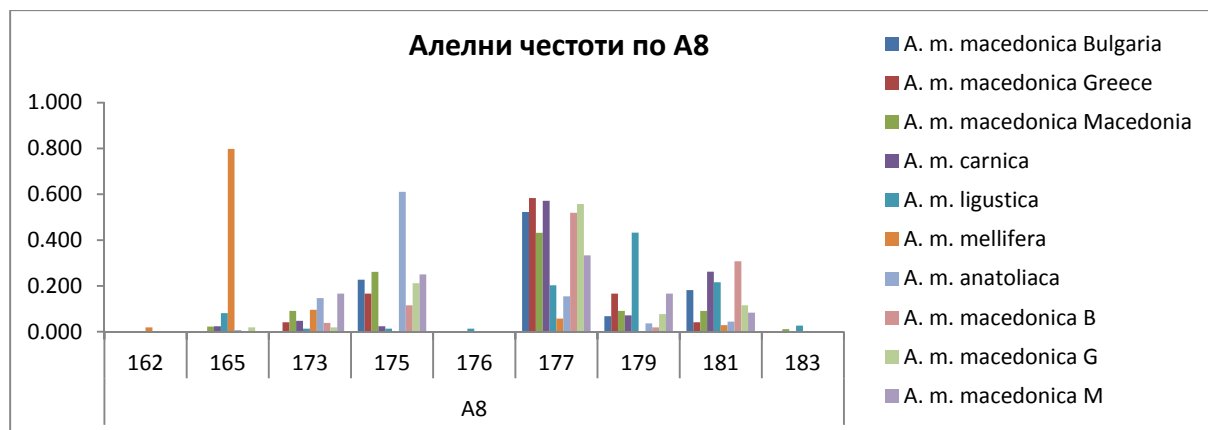




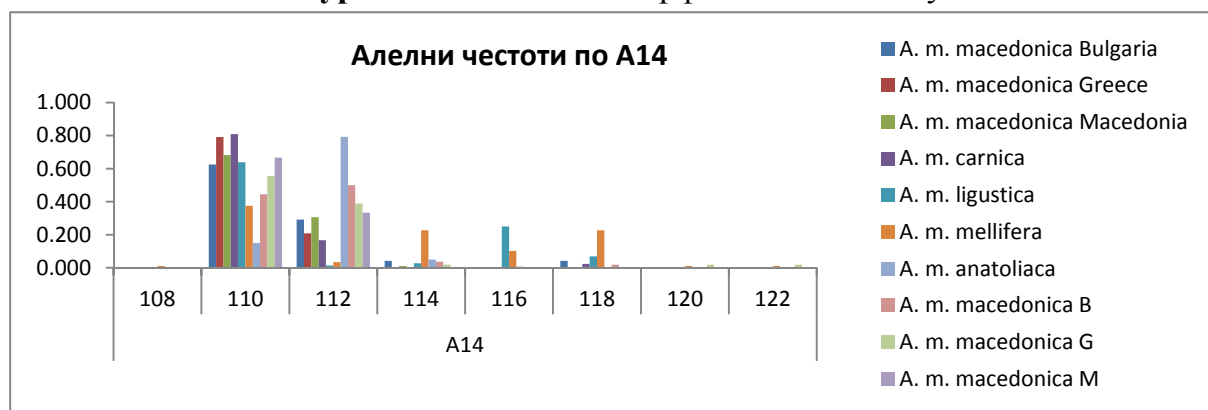
Фигура 34. Обобщено графично изображение на разпределението на индивидите от *A. m. macedonica*, произход България, и *A. m. carnica*, произход Полша, Германия, Австрия и Хърватия



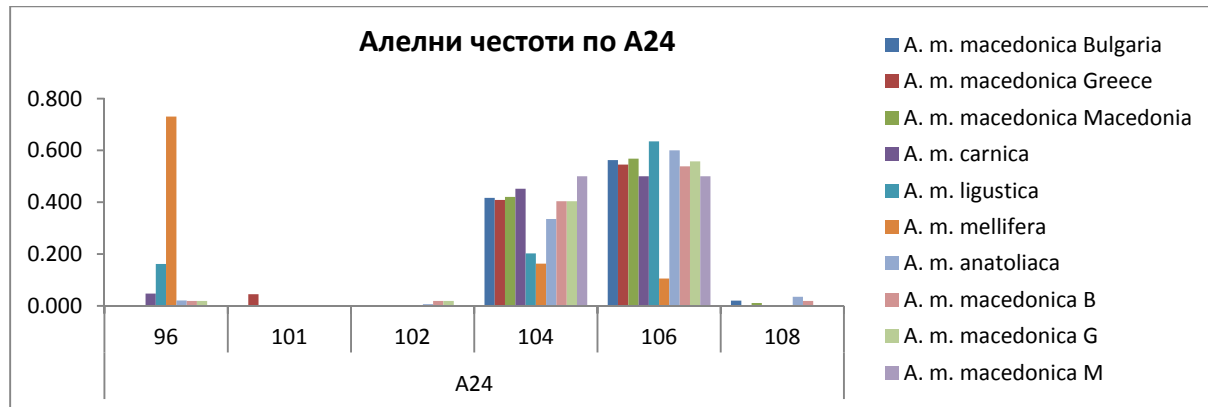
Фигура 35. Обобщено графично изображение на разпределението на индивидите от *A. t. macedonica*, произход България, Република Македония и Гърция



Фигура 36. Изявен полиморфизъм по A8 локуса



Фигура 37. Изявен полиморфизъм по A14 локуса



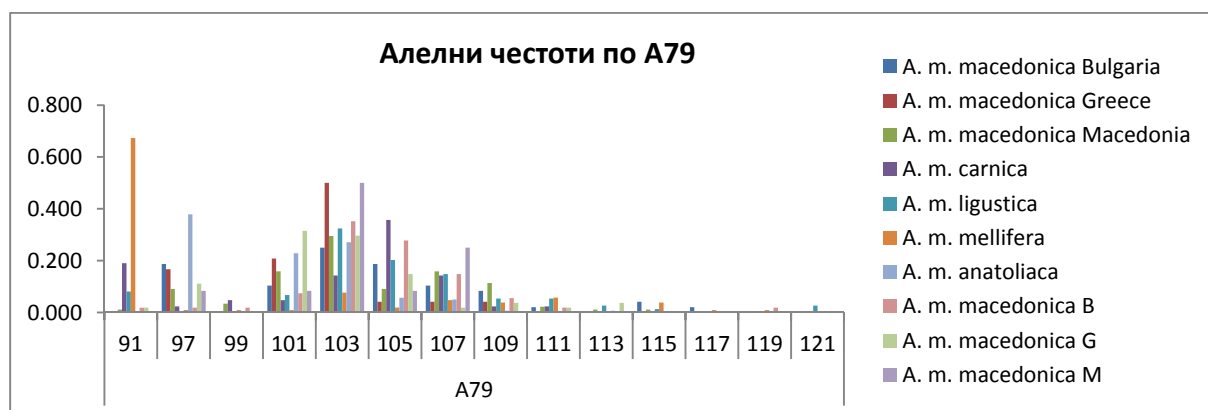
Фигура 38. Изявен полиморфизъм по A24 локуса



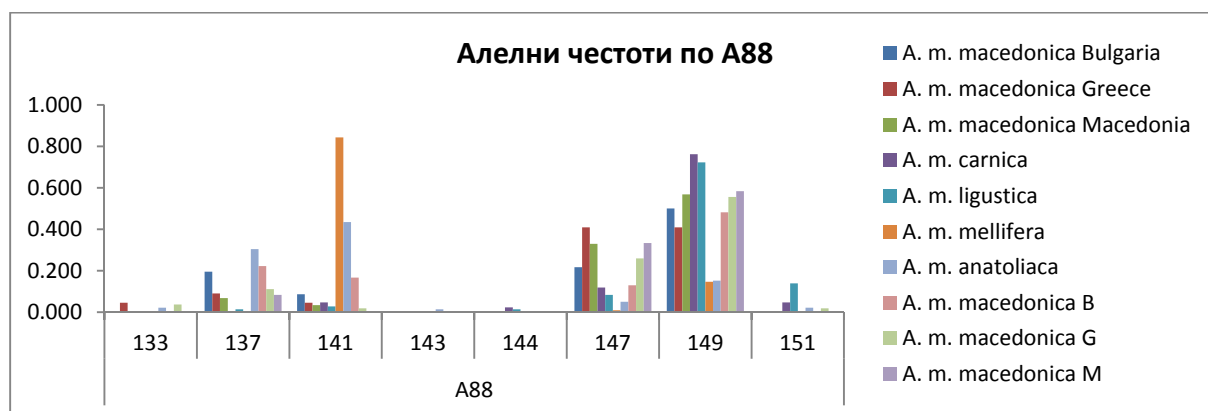
Фигура 39. Изявен полиморфизъм по A29 локуса



Фигура 40. Изявен полиморфизъм по A43 локуса



Фигура 41. Изявен полиморфизъм по A79 локуса



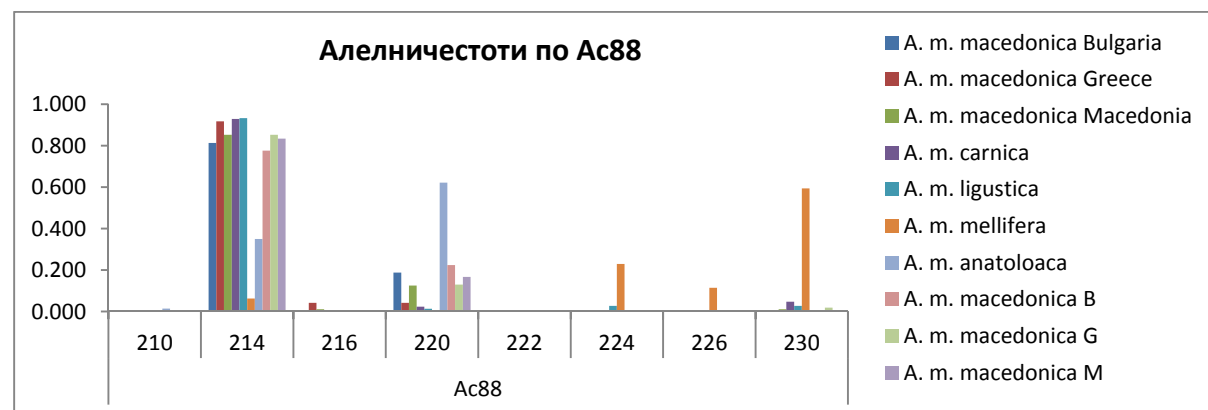
Фигура 42. Изявен полиморфизъм по A88 локуса



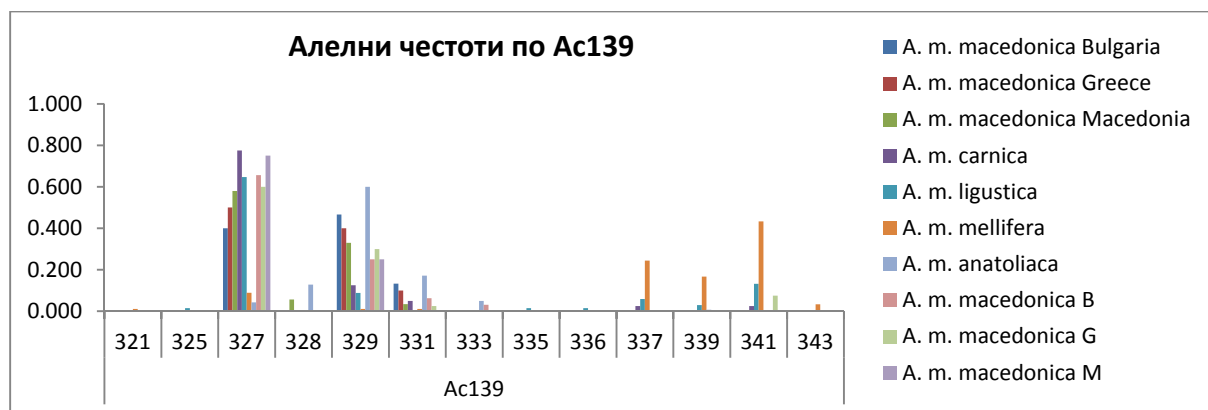
Фигура 43. Изявен полиморфизъм по A113 локуса



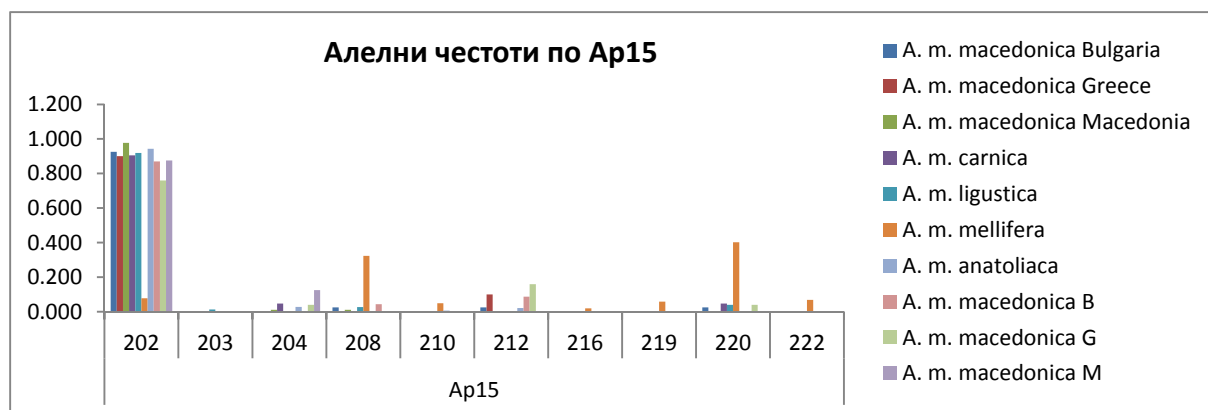
Фигура 44. Изявен полиморфизъм по Ac11 локуса



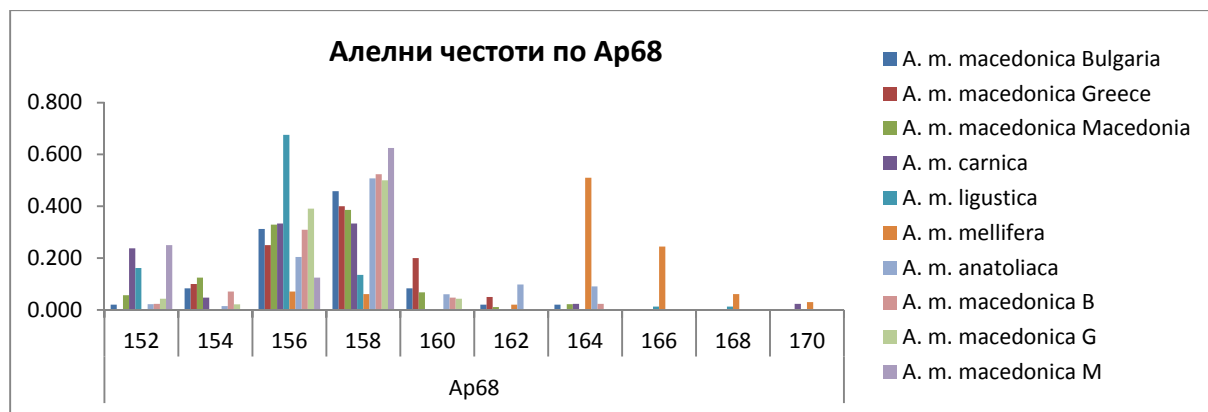
Фигура 45. Изявен полиморфизъм по Ac88 локуса



Фигура 46. Изявен полиморфизъм по Ac139 локуса



Фигура 47. Изявен полиморфизъм по Ap15 локуса



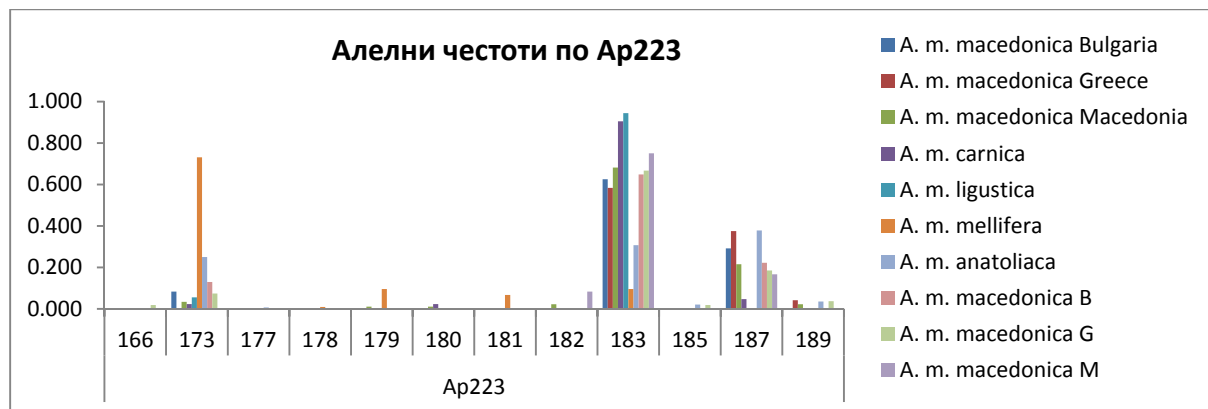
Фигура 48. Изявен полиморфизъм по Ар68 локуса



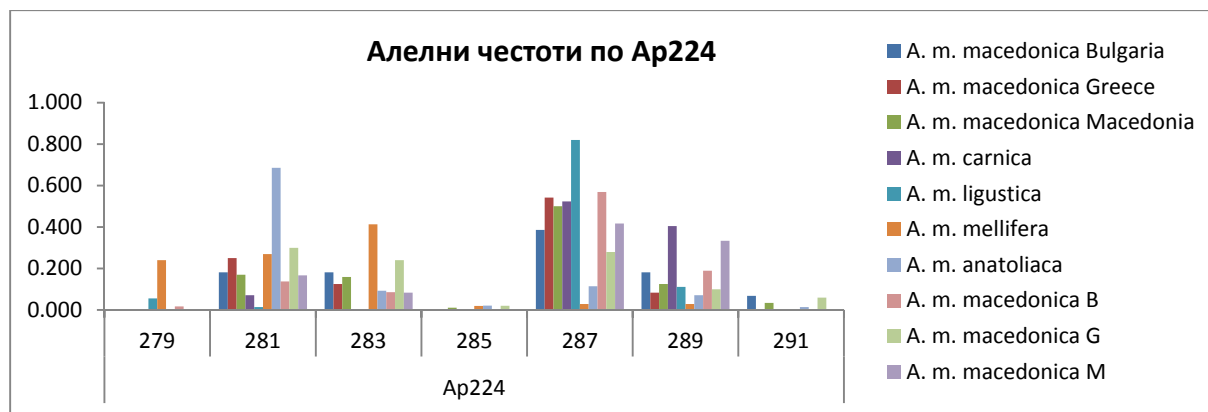
Фигура 49. Изявен полиморфизъм по Ар85 локуса



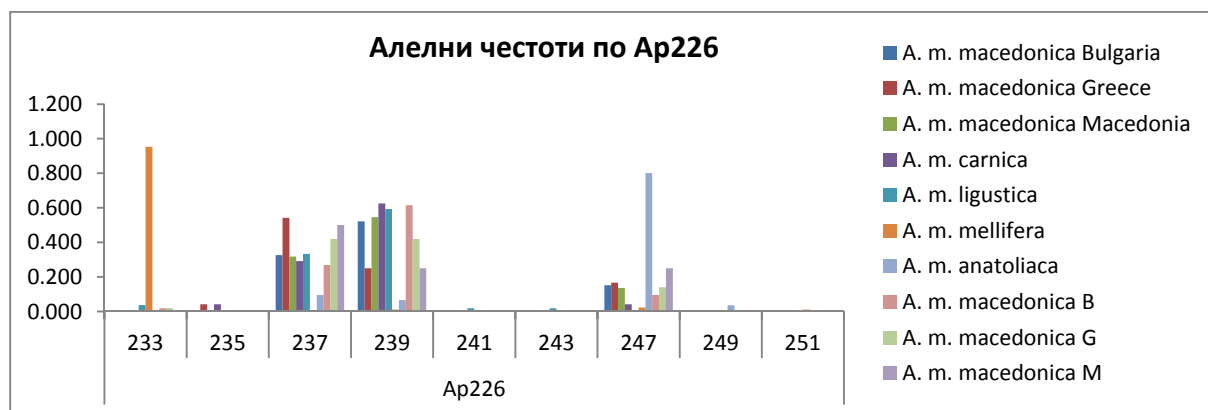
Фигура 50. Изявен полиморфизъм по Ар90 локуса



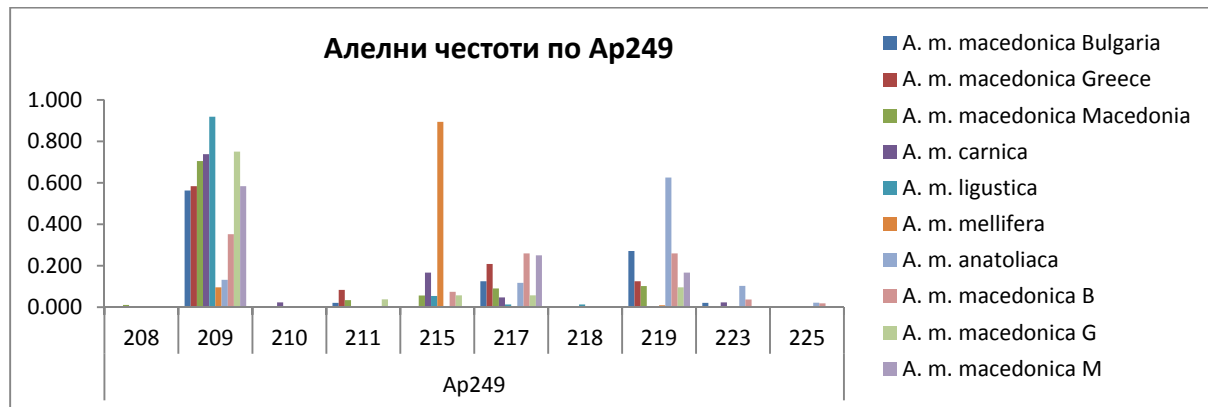
Фигура 51. Изявен полиморфизъм по Ар223 локуса



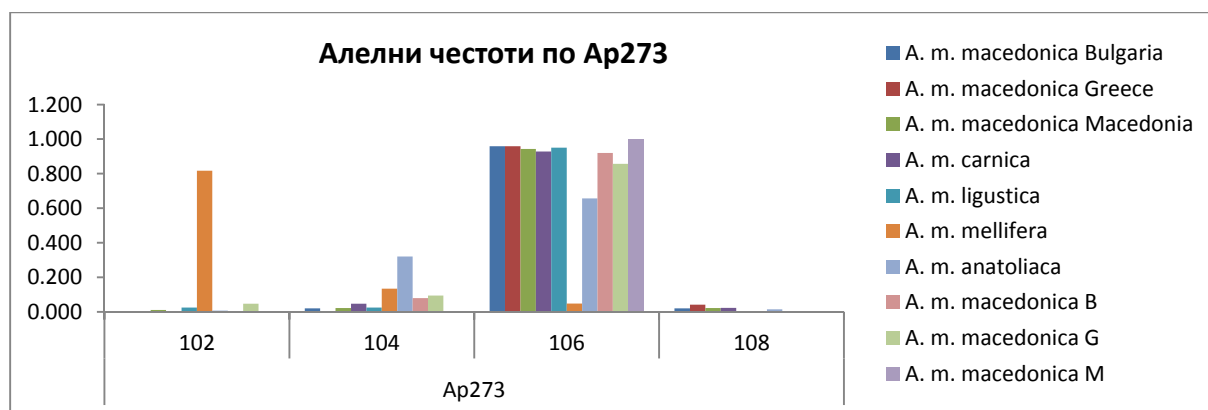
Фигура 52. Изявен полиморфизъм по Ар224 локуса



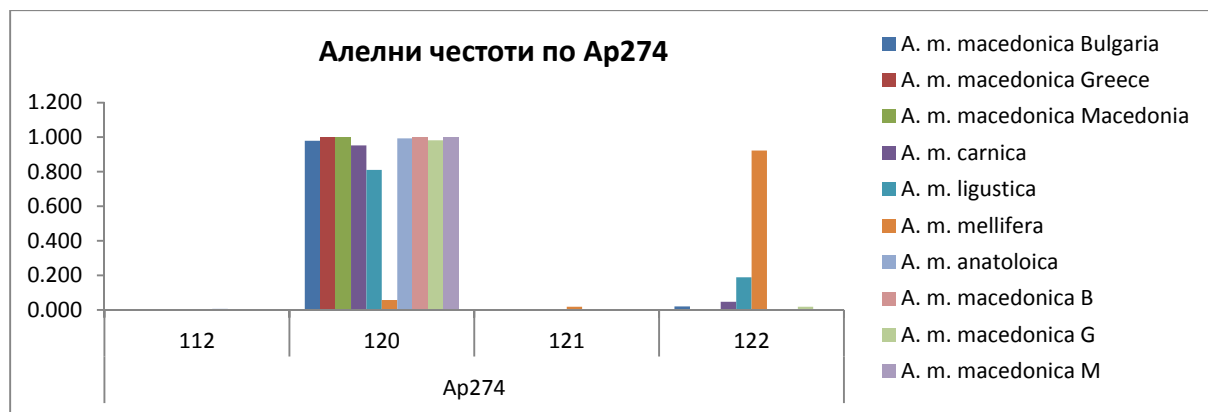
Фигура 53. Изявен полиморфизъм по Ар226 локуса



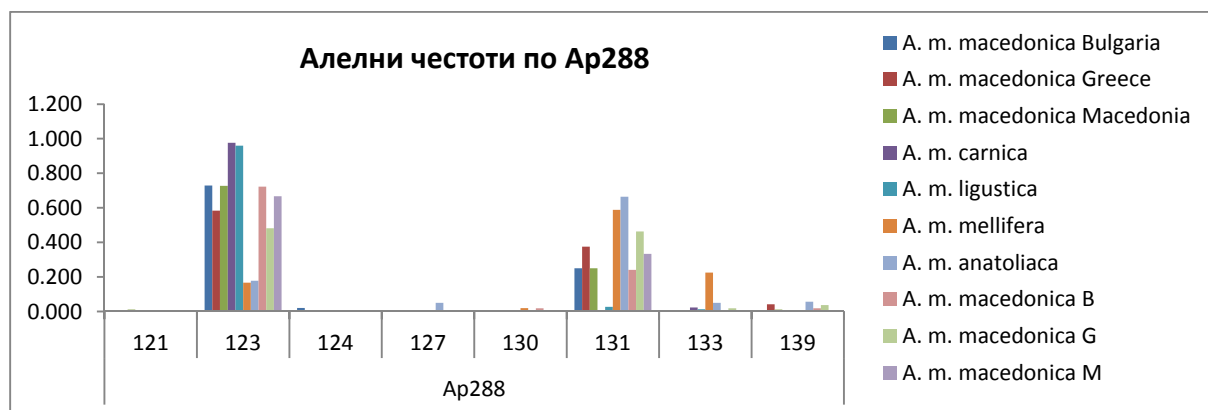
Фигура 54. Изявен полиморфизъм по Ар249 локуса



Фигура 55. Изявен полиморфизъм по Ар273 локуса



Фигура 56. Изявен полиморфизъм по Ap274 локуса



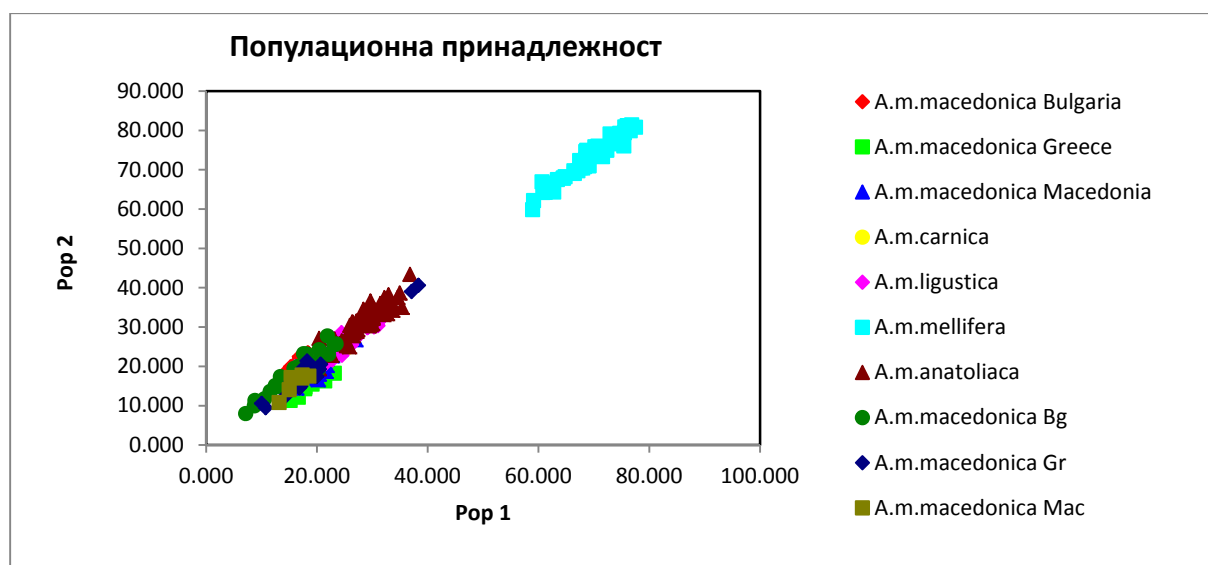
Фигура 57. Изявен полиморфизъм по Ap288 локуса



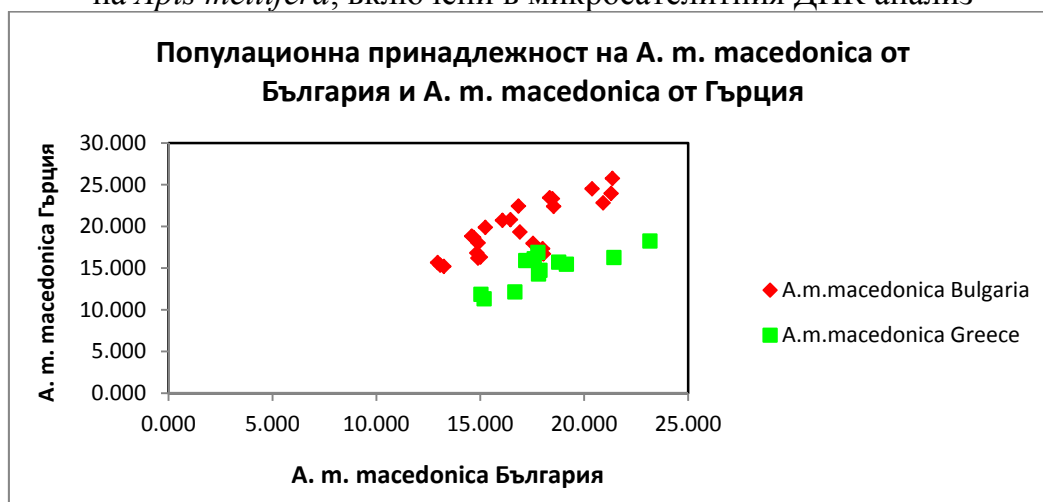
Фигура 58. Изявен полиморфизъм по At168 локуса



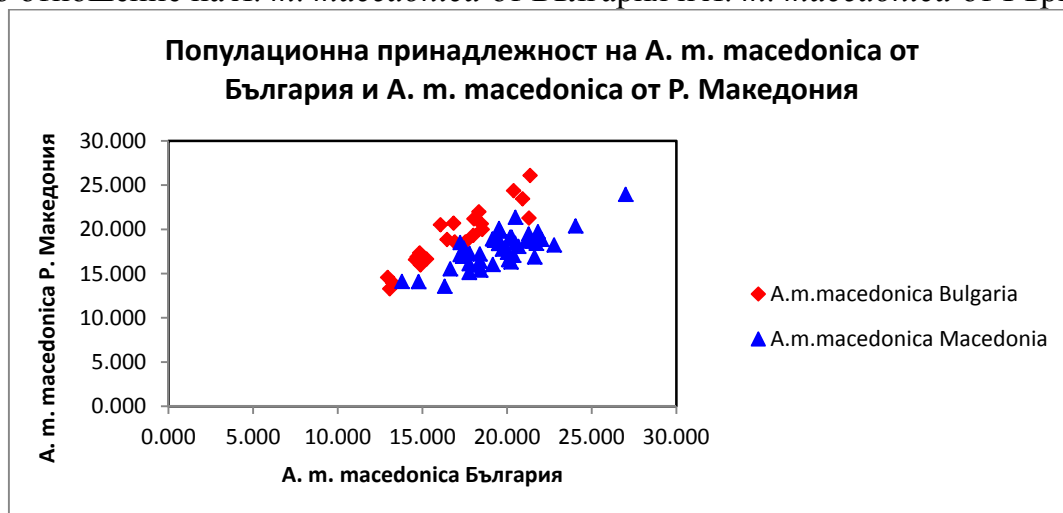
Фигура 59. Изявен полиморфизъм по At188 локуса



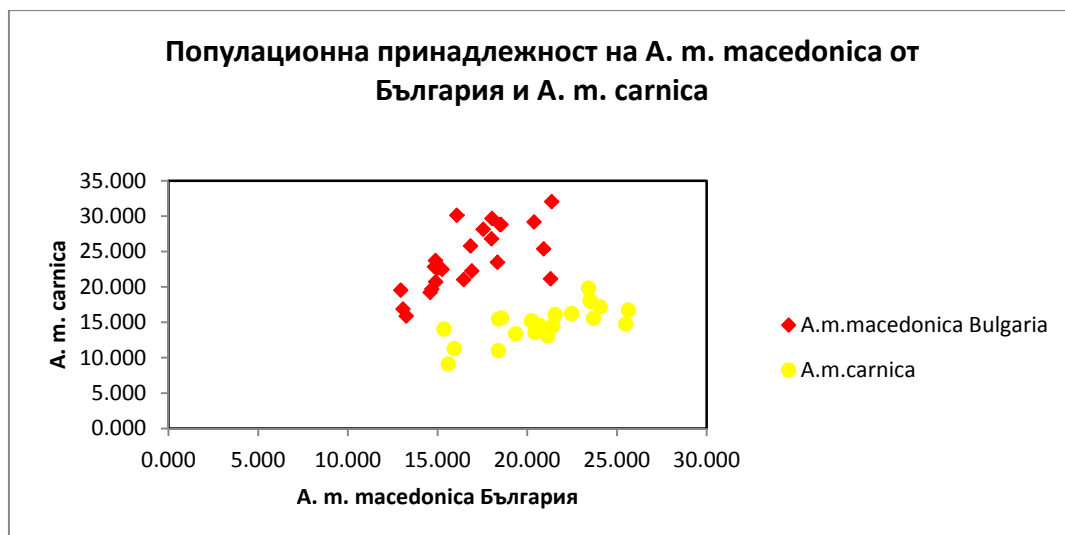
Фигура 60. Обобщено графично изображение на разпределението на индивидите сред анализираниите пчелни популации от различните подвидове на *Apis mellifera*, включени в микросателитния ДНК анализ



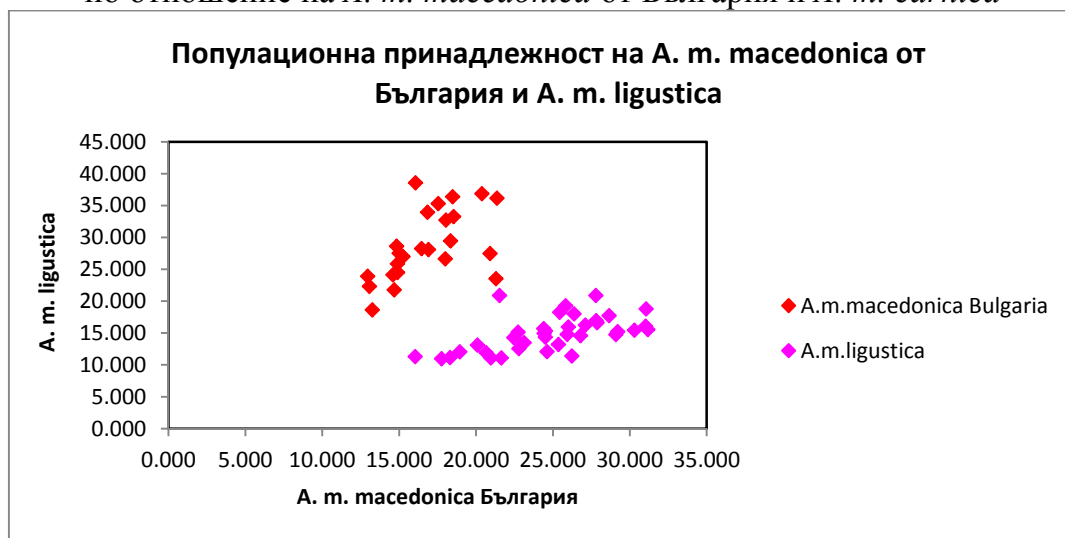
Фигура 61. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. macedonica* от Гърция



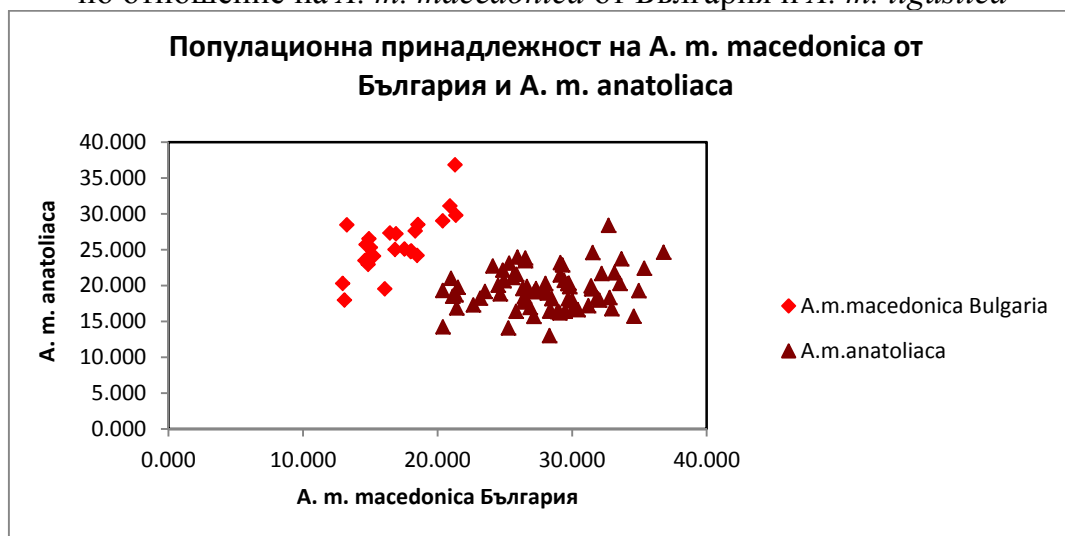
Фигура 62. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. macedonica* от Р. Македония



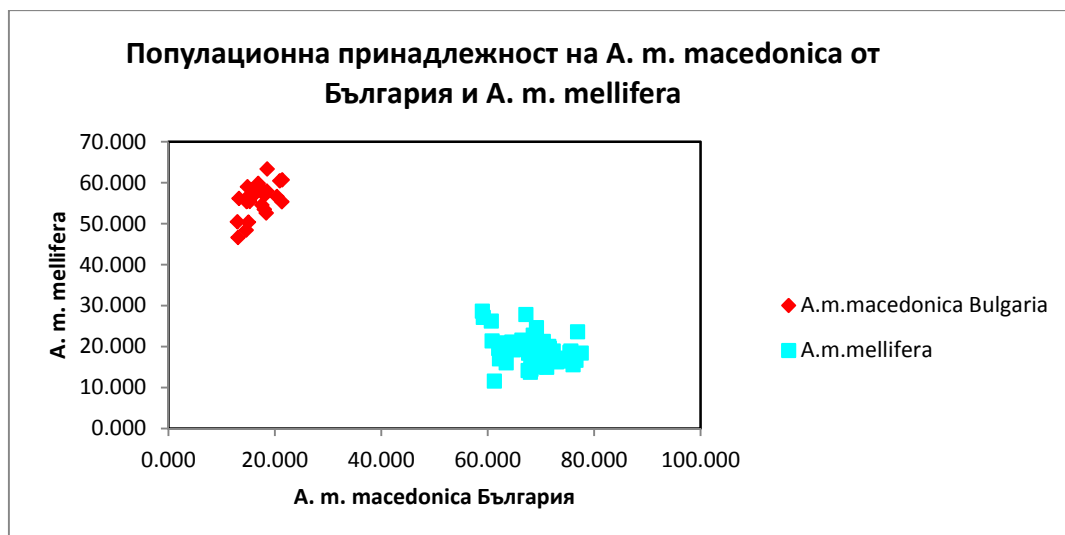
Фигура 63. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. carnica*



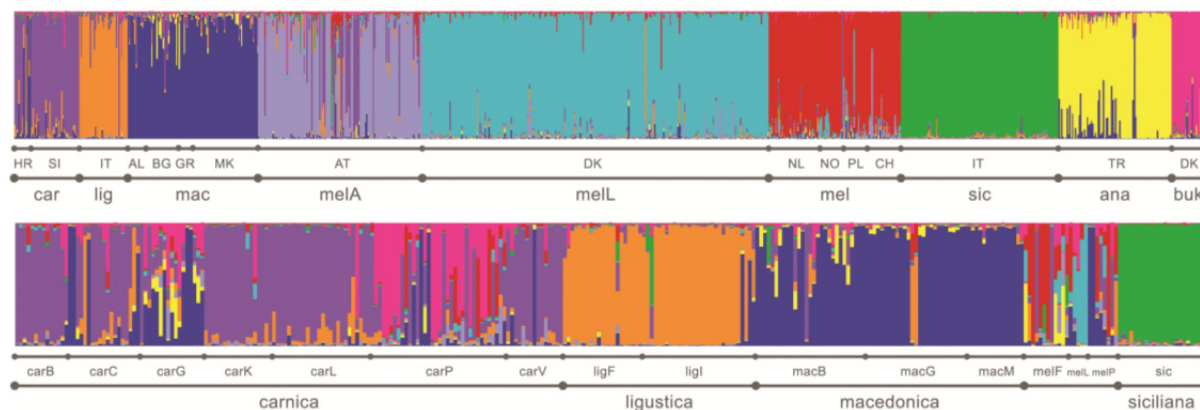
Фигура 64. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. ligustica*



Фигура 65. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. anatoliaca*



Фигура 66. Графично изображение на резултатите от теста за принадлежност по отношение на *A. m. macedonica* от България и *A. m. mellifera*



Фигура 69. 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)

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 научнообоснована 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 популациите му на 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 подкълъстер, в рамките на който е налице отчетливо допълнително субкълъстриране 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 демонстрират значимо генетично сходство между анализираниите 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 анализ стойности на фиксационния индекс F_{ST} , потокът от гени N_m 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 анализираниите популации на българската медоносна пчела на базата на проведения митохондриален ДНК анализ;
13. Обобщените данни от проведения 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 територията на България е обитавана от различен екотип на подвида *A. m. macedonica*, който 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 анализ по общо 33 локуса.
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 микросателитни локуса 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 анализ. Отчетени са общо 23 алелни варианта за 6-те ензимни локуса и 260 варианта за 24-те микросателитни локуса.
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 сравняване 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 анализ, 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 научнообоснована 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 стопански значими 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.

Списъкът на научните трудове на проф. Евгения Нешова Иванова, както и конкретните данни за участията ѝ в международни форуми с цел популяризиране на резултатите от изследването, посветени на проучвания проблем, по периоди са представени в първата част на тази книга.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Министерство на земеделието и храните (2016) Агростатистика – Пчеларството в България през 2015 г. № 298 – януари 2016.
2. Алтухов Ю.П. (1989) Генетические процессы в популяциях. Наука. Москва. 328 с.
3. Величков В. (1970) Пчелни породи у нас. Пчеларство. 10, 7 – 11.
4. Волкова Р. И., Силин Ю. В., Мельникова Е. В., Ножко Т. Н. (1985) Генетические методы оценки. Сельскохозяйственные животные. 4, 48 – 54.
5. Волкова Р. И., Силин Ю. В., Ховански А. Е., Мельникова Е. В. (1987) Множественные формы и активность эстераз у медоносных пчел с разной функциональной специализацией. Сельскохозяйственная биология. 7, 46 – 48.
6. Георгиева В. (2016) Генетично характеризиране на *Apis mellifera macedonica* (тип *rodopica*) – обект на Националната програма за развъждане на медоносните пчели в България. Дисертация за придобиване на образователна и научна степен „доктор“. Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“. Пловдив. 136 с.
7. Груев Б. (1988) Обща биогеография. Наука и изкуство. София, 395 с.
8. Закон за пчеларството. ДВ. 61 – 25.VII.2014.
9. Иванова Е. (1996) Изменчивост при *Apis mellifera* в България – онтогенетични и популационно-генетични аспекти. Дисертация за придобиване на образователна и научна степен „доктор“. Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“. Пловдив. 159 с.
10. Кадиев В. (1999) Енциклопедичен речник по екология. Блаком. Пловдив. 276 с.
11. Корочкин Л. И., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. (1977) Генетика изоферментов. Наука. Москва. 275 с.
12. Лазаров А. (1935) Дължина на хоботчето – значение и подходи при измерването му. Пчела. 6:156 – 158.
13. Лазаров А. (1936) Кратък принос към проучване на местната медоносна пчела (*Apis mellifera* L.). Трудове на Българското природоизпитателно дружество. ХУП, 127 – 134.
14. Маурер Г. (1971) Диск-электрофорез. Мир. Москва. 243 с.
15. Молодюк А. В., Беляева Е. Н., Миронова С. В. (1980) Изоферменты ЛДХ трутня. Пчеловодство. 1, 15 – 16.

16. Николова С. (2011) Изучаване на генетичната изменчивост при популации *Apis mellifera* L. в България на базата на микросателитен ДНК анализ. Дисертация за придобиване на образователна и научна степен „доктор“. Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“. Пловдив. 147 с.
17. Одум Ю. (1986) Экология. Москва. Мир. 328 с.
18. Петров П. (1990) Медоносные пчелы Болгарии, их характерные особенности и таксономическое положение. Докторска дисертация. Москва. 133 с.
19. Петров П. (1992) Разпространение и история формирования пчел рода *Apis* (*Hymenoptera*, *Apidae*). Успехи современной биологии. 112 (3), 359 – 372.
20. Петров П. (1993) За морфоетологичния породен стандарт на българските пчели (*Apis mellifica rodopica*). Животновъдни науки. 4, 84 – 88.
21. Петров П. (1995) Българската медоносна пчела *Apis mellifica rodopica* и нейния расов стандарт. Пчеларство. 5, 4 – 7.
22. Петров П. (1996) Принос към таксономията на българската медоносна пчела. Животновъдни науки. 1, 58 – 61.
23. Петров П. (1997) За произхода на българската медоносна пчела *Apis mellifica rodopica*. Животновъдни науки. 1 – 2, 88 – 93.
24. Петров П., Василева С., Ненчев П., Иванова Т., Стоилов Н., Спасов Хр., Христов П., Башлийска В. (1999). Програма за развъдно-подобрителна работа с пчелите в България и организация на майкопроизводството. Пчелар. 2, 8 – 10.
25. Петров П. (2004) „Родопика, Карника или“ ... нищо ново под слънцето! Вестник „Пчели“. 3, 1 – 3.
26. Петров П. (2004) „Родопика, Карника или“ ... нищо ново под слънцето! Вестник „Пчели“. 4, 7 – 9.
27. Петров П.и Ганев Г. (2013) Развъдна програма за съхраняване на местната за страната българска медоносна пчела. Пловдив. 54 с.
28. Archak S., Medura E., Sravana Kumar P., Nagaraju J. (2007) InSatDb: a microsatellite database of fully sequenced insect genomes. Nucleic Acids Research. 35, 36 – 39.
29. Arias M., Sheppard W. (1996) Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. Mol. Phylogenet. Evol. 5, 557 – 566.
30. Arias M. and Sheppard W. (2005) Phylogenetic relationships of honey bees Hymenoptera:Apinae:Apini) inferred from nuclear and

- mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37, 25 – 35.
31. Arias M., Rinderer E., Sheppard W. (2006) Further characterization of honey bees from the Iberian Peninsula by allozyme, morphometric and mtDNA haplotype analyses. *J. Apic. Res.* 45, 188 – 196.
 32. Badino G., Celebrano G., Manino A. (1982) Genetic variability of *Apis mellifera ligustica* sp. in a marginal area of its geographical distribution. *Experientia* 38, 540 – 541.
 33. Badino G., Celebrano G., Manino A. (1983) Population structure and Mdh-1 locus variation in *Apis mellifera ligustica*. *J. Heredity*. 74, 443 – 446.
 34. Badino G., Celebrano G., Manino A., Longo S. (1985) Enzyme polymorphism in the Sicilian honeybee. *Experientia*. 41, 752 – 754.
 35. Badino G., G. Celebrano, A. Manino, M. D. Ifantidis (1988). Allozyme variability in Greek honeybees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*. 19, 337 – 386.
 36. Beckman J. S. and Weber J. L. (1992) Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*. 12, 627 – 631.
 37. Behura S. K. (2006) Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*. 15, 3087 – 3113.
 38. Biasiolo A. and Comparini A. (1989) Electrophoretic analysis of gene-enzyme systems in *Varroa jacobsoni* Oud.: preliminary results. In: R. Cavalloro (Editor), Present status of Varroaosis in Europe and progress in the *Varroa* mite control. Proc. E.C. Experts' Group Meeting. Udine. 1988. C. E. C., Luxembourg. 207 – 211.
 39. Biasiolo A. and Comparini A. (1991) Genetics of aldehyde oxidase, a new polymorphic locus in *Apis mellifera*. *J Genet Breed.* 45, 103 – 106.
 40. Bitondi M. M. G., Mestriner M. A. (1983) Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny, and electrophoretic variability. *Biochem Genet.* 21, 985 – 1002.
 41. Bodur Ç., Kence M., Kence A. (2007) Genetic structure of honeybee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) populations of Turkey inferred from microsatellite analysis. *Journal of Apicultural Research*. 46 (1), 50 – 56.
 42. Bouga M., Harizanis P., Kiliyas G., Alahiotis S. (2005a) Genetic divergence and phylogenetic relationships of honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) populations from Greece and Cyprus using PCR – RFLP analysis of three mtDNA segments. *Apidologie*. 36, 335 – 344.

43. Bouga M., Kiliyas G., Harizanis P.C, Papasotiropoulos V., Alahiotis S. (2005b) Allozyme variability and phylogenetic relationships in honey bee (*Hymenoptera: Apidae: A. mellifera*) populations from Greece and Cyprus. *Biochem. Genet.* 43, 471 – 484.
44. 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.
45. Braaten D. C., Thomas J. R., Little R. D., Dickson K. R., Goldberg I., Schlessinger D. (1988) Locations and contexts or sequences that hybridize to poly (dG-dt) (dC-DA) in mammalian ribosomal DNAs and two X linked genes. *Nucleic Acids Research.* 16, 865 – 881.
46. Brian M.V. (1983) *Social Insects; Ecology and Behavioral Biology.* Chapman and Hall, London.
47. Brueckner D., (1974) Reduction of biochemical polymorphism in honeybee (*Apis mellifera*). *Experientia.* 30(6), 618 – 619.
48. Comparini A. and Biasiolo A. (1991) Genetic discrimination of Italian Bee, *Apis melliferaligustica* versus Carnolian bee, *Apis mellifera carnica* by allozyme variability analysis. *Biochem. Syst. Ecol.* 19, 189 – 194.
49. Cánovas F., De La Rúa P., Serrano J., Galián J. (2007) Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 46, 24 – 30.
50. Cánovas F., De La Rúa P., Serrano J., Galián J. (2008) Geographical patterns of mitochondrial DNA variation in *Apis mellifera iberiensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research.* 46 (1): 24 – 30. DOI: 10.1111/j.1439-0469.2007.00435.x .
51. Cavalli-Sforza L. and Edwards A. (1964) Analysis of human evolution. In *Proceedings of 11th International Congress of Genetics.* Pergamon, Newyork. 923 – 933.
52. Cavalli-Sforza L. and Edwards A. (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Amer. J Hum. Genet.* 19, 233 – 257.
53. Cavener D., Feng Y., Foster B., Krasney P., Murtha M., Schonbaum C., Xiao X. (1998) The YYGG box (CTGA): a conserved dipyrimidine-dipurine sequence element in *Drosophila* and other eukaryotes. *Nucleic Acids Research.* 16, 3375 – 3390.

54. Chandra B. C. S., Hunt G. J., Cobey S., Smith B. H. (2001) Quantitative trait loci associated with reversal learning and latent inhibition in honeybees (*Apis mellifera*). Behavioral Genetics. 31, 275 – 285.
55. Coelho J. R., Mitton J. B. (1988) Oxygen consumption during hovering is associated with genetic variation of enzymes in honeybees. Funct. Ecol. 2, 141 – 146.
56. Contel E. P. B., Mestriner, Martins E. (1977) Genetic control and developmental expression of malate dehydrogenase in *Apis mellifera*. Biochem. Genet. 15, 859 – 876.
57. Cornuet J. M. (1979) The MDH system in honeybees of Guadeloupe. J. Hered. 70, 223 – 224.
58. Cornuet J. M., Fresnaye J. (1979) Production de miel chez des hybrides interraciaux d'abeilles (*Apis mellifica* L.) lors de générations successives de rétrocroisement sur la race locale. Apidologie. 10, 3 – 15. DOI: 10.1051/apido:19790101.
59. Cornuet J. M. (1982) The MDH polymorphism in some west-Mediterranean honeybee populations. IUSSI Congr. Boulder, CO, USA.
60. Cornuet J. M., A. Daoudi, Chevalet C. (1986) Genetic pollution and number of matings in a black honey bee (*Apis mellifera mellifera*) population. Theor. Appl. Genet. 73, 223 – 227.
61. Cornuet J. M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M. (1999) New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. Genetics. 153, 1989 – 2000.
62. Cornuet J. M., Garnery L., Solignac M. (1991) Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. Genetics 128, 393 – 403.
63. Cornuet J. M., Oldroyd B. P., Crozier R. H. (1995) Unequal thermostability of allelic forms of malate dehydrogenase in honey bees. Journal of Apiculture Research. 34, 45 – 47.
64. Costa C., Berg S., Bienkowska M., Bouga M., Bubalo D., Büchler R., Charistos L., Le Conte Y., 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, 147 – 158. <http://dx.doi.org/10.2478/v10289-012-0015-9>.
65. Crow J. and Kimura M. (1970) An Introduction to Population Genetics Theory (eds Harper, Row). New-York. USA. 591 p.

66. Crozier RH and Crozier YC (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: Complete sequence and the genome organization. *Genetics*. 133, 97 – 117.
67. Czekanowski J. (1909) Zur differenzial diagnose der Neandertalgruppe *Korrespondenzblatt. Deutsch. Ges. An thropol. Ethnol. Urgesch.* 403, 44 – 47.
68. Daevis B. J. (1964) Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. *Annals New York Academy of Sciences*. 121, 404 – 427.
69. Daly H. V.(1991) Systematics and identification of Africanized honey bees. In: The „African“ Honey Bee., M. Spivak, D. J. C. Fletcher and M. D. Breed, eds. Westview Press: Boulder. CO. 13 – 44 p.
70. Dall’Olio R., Marino A., Lodesani M., Moritz R. F. A. (2007) Genetic characterization of Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica*, based on microsatellite DNA polymorphisms. *Apidologie*. 38, 207 – 217. DOI: 10.1051/apido:2006073.
71. Dall’Olio R., Muñoz I., De La Rúa P., Lodesani M. (2008) Estimating introgression in *Apis mellifera sicula* populations: are the conservation islands really effective? In *Proceedings of the Third European Conference of Apidology*. Belfast UK. 8-11 September 2008. 3, 23 – 24.
72. De La Rúa P., Serrano J., Galián J. (1998) Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.). *Molecular Ecology*. 7 (11), 1543 – 1547. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00468.x.
73. De La Rúa P., Simon U. E., Tide A.C., Moritz R. F. A., Fuchs S. (2000) MtDNA variation in *Apis cerana* populations from the Philippines. *Heredity*. 84, 124 – 130.
74. De La Rúa P., Galian J., Pedersen B., Serrano J. (2002a) Molecular diversity of honeybee *Apis mellifera iberica*. (Hymenoptera: Apidae) from Western Andalusia. *Arch. Zootec*. 53, 195 – 203.
75. De La Rúa P., Galian J., Serrano J., Moritz R. F. A. (2002b) Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain). *Apidologie*. 32 (5), 417 – 427.
76. De La Rúa P., Galian J., Serrano J., Moritz R. (2003) Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism. *Genetics Selection Evolution*. 35 (3), 339 – 350.
77. De La Rúa P., Galian J., Pedersen B., Serrano J. (2006) Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores. *Apidologie*. 37, 699 – 708.

78. De La Rúa P., Hernandez-Garcia R., Jimenez Y., Galian J., Serrano J. (2005) Biodiversity of *Apis mellifera iberica* (Hymenoptera: Apidae) from northeastern Spain assessed by mitochondrial analysis. *Insect Systematics and*. 36, 21 – 28.
79. De La Rúa P., Jaffè R., Dall'Olio R., Muñoz I., Serrano J. (2009) Biodiversity, conservation and current threats to European honey bees. *Apidologie*. 40(3), 263 – 284. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2009027>.
80. Dedej S., Basiolo A., Piva R. (1996) Morphometric and alloenzymatic characterisation in the Albanian honeybee population *Apis mellifera* L. *Apidologie*. 27, 121 – 131.
81. Del Lama M. A., Mestriner M. A. (1984) Starch gel electrophoretic patterns of exopeptidase phenotypes in 14 different species of bees. *Brazil. J. Genet.* 7, 9 – 20.
82. Del Lama M. A., Mestriner M. A., Pavia J. C. A. (1985) Ast-5 and Pgm-1: new polymorphism in *Apis mellifera*. *Brazilian Journal of Genetics*. 8, 17 – 27.
83. Del Lama M. A., Figueiredo R. A., Soares A. E. E., Del Lama S. N. (1988) Hexokinase polymorphism in *Apis mellifera* and its use for Africanized honeybee identification. *Rev. Brazil. Genet.* 11(2), 287 – 297.
84. Del Lama M. A., Lobo J. A., Soares A. E. E., Del Lama S. N. (1990) Genetic differentiation estimated by isozymic analysis of Africanized honeybee populations from Brazil and from Central America. *Apidologie*. 21, 271 – 280.
85. Dietz A. (1986) *Evolution. Bee genetics and Breeding*. Academic Press Inc.. Orlando Florida. 5 – 20 p.
86. Di Rienzo A., Peterson A., Garza J., Valdes A., Slatkin M., Freimer N. (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91, 3166 – 3170.
87. Dray S. and Dufour A. B. (2007). The ade 4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*. 22(4), 1 – 20.
88. Cavalli-Sforza L. L. and Edwards A.W.F. (1964). Analysis of human evolution. *Genetics Today*. 3, 923 – 933.
89. Cavalli-Sforza, L. L. and Edwards A. W. F. (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*. 19, 233 – 257.
90. Eisen J. A. (1999) Mechanistic basis for microsatellite instability, p. 34 – 48. In D. B. Goldstein and C. Schlötterer (eds.). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press. New York. 368 p.

91. Ellegren H. (2004). Microsatellites sequences with complex evolution. *Nature*. 5, 435 – 445.
92. Engel M. (1999) The taxonomy of recent and fossil honey bees (*Hymenoptera: Apidae; Apis*). *Journal of Hymenoptera Research*. 8 (2), 165 – 196.
93. Estoup A. L., Solignac M., Harry M., Cornuet J. M. (1993) Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Res.* 21, 1427 – 1431.
94. Estoup A., Garnery L., Solignac M., Cornuet J. M. (1995) Microsatellite variation in (*Apis mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*. 140, 679 – 695.
95. Estoup A., Jame P., Cornuet J. M. (2002) Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*. 11, 1591 – 1604.
96. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14(8), 2611 – 2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
97. Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2006) ARLEQUIN: a software for population genetic data analysis. 3.11. Computational and Molecular Population Genetics Lab. University of Bern, Bern.
98. Fan H. and Chu J. Y. (2007) A Brief Review of Short Tandem Repeat Mutation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 5, 7 – 14.
99. Figueiredo V. L. C., Paulino-Simões Z. L., Bitondi M. M. G. (1996) Developmental pattern of esterases in *Apis mellifera* L. honey bees. I. Stage-dependent changes of esterase isoenzymes in Africanized workers. *Apidologie*. Springer Verlag. 27 (1), 47 – 54.
100. Felsenstein J. (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5C Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington. Seattle, W.A.
101. Fondrk M. K., Page R. E., Hunt G. (1993) Paternity analysis of worker honeybees using random amplified polymorphic DNA. *Naturwissenschaften*. 80, 226 – 231.
102. Francis R. M., Kryger P., Meixner M., Bouga M., Ivanova E., Andonov S., Berg S., Bienkowska M., Büchler R., Charistos L., Costa C., Dyrba W., Hatjina F., Panasiuk B., Pechhacker H., Kezić N., Korpela S., Le Conte Y., Uzunov A., Wilde J. (2014a) The genetic origin of honey bee colonies used in the Genotype-

- Environment-Interactions experiment: a comparison of methods. *Journal of Apicultural Research*. 53(2), 188 – 204. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.02>.
103. Francis R. M., Amiri E., Meixner M. D., 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., Kezić N., Korpela S., Le Conte Y., Panasiuk B., Pechhacker H., Tsoktouridis G., Wilde J. (2014b) Effect of genotype and environment on parasite and pathogen levels in one apiary – a case study. *Journal of Apicultural Research*. 53(2), 230 – 232. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.14>.
 104. Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J. (1998) The origin of west European subspecies of honey bees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*. 52, 1119 – 1134.
 105. Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J. (2000a) Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East. *Apidologie*. 31, 167 – 180.
 106. Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J. (2000b) Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A.m. sicula*). *Molecular Ecology*. 9 (7), 907 – 921.
 107. Franck P., Garnery L., Loiseau A., Oldroyd B. P., Hepburn H. R., Solignac M. (2001) Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*. 86, 420 – 430.
 108. Freeland J. (2005) The evolution of population biology: past, present and future. *Journal of Biogeography*. 32, 2039 – 2040. doi:10.1111/j.1365-2699.2005.01363.x.
 109. Garnery L., Cornuet J., Solignac M. (1992) Evolutionary history of the honey bee (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.* 1, 145 – 154.
 110. Garnery L., Solignac M., Celenrano G., Cournuet J. (1993) A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*. 49, 1016 – 1021.
 111. Garnery L., Mosshine E. H., Oldroyd B. P., Cornuet J. M. (1995) Mitochondrial-DNA variation in Moroccan and Spanish honey bee populations. *Molecular Ecology*. 4, 465 – 471. DOI:10.1111/j.1365-294X.1995.tb00240.x
 112. Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J. M., Solignac M. (1998a) Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis*

- mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). I. Mitochondrial DNA. Genetics, Selection Evolution. 30, 31 – 47.
113. Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J. M., Solignac M. (1998b) Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A.m. iberica*). II. Microsatellite loci. Genet. Sel. Evol. 30 (Suppl. 1), 49-74.
 114. Garstide D. F. (1980) Similar allozyme polymorphism in honeybees (*Apis mellifera*) from different continents. Experientia. 36, 649 – 650.
 115. Georgieva V. H., Petrov P. P., Petkov N. G., Ivanova E. N. (2016a) Genetic analysis of *Apis mellifera macedonica* (type *rodopica*) populations selectively reared for purposive production of honey bee queens in Bulgaria. Journal of Bio Science and Biotechnology. 5 (1), 79 – 85.
 116. Georgieva V. H., Ivanova E. N., Petrov P. P., Petkov N. G. (2016b) Genetic characterization of *Apis mellifera macedonica* (type „*rodopica*“) populations selectively controlled in Bulgaria. Journal of Central European Agriculture – in press
 117. Harizanis P. C., Nielsen D. I., Bouga M. (2006) Diagnostic molecular markers discriminating Africanized honey bee from Greek and Cypriot honey bees (*Apis mellifera*, *Hymenoptera: Apidae*). Journal of Apicultural Research. 45 (4), 197 – 202. DOI:10.3896/IBRA.1.45.4.0568.
 118. Hartl D. L. and Clark A. G. (2007). Principles of population genetics. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachussettes. 642 p.
 119. Hatjina F., Bienkowska M., Charistos L., Chleno R., Costa C., Dražić M.M., Filipi J., Gregorec A., Ivanova E., Kezic N., Kopernicky J., Kryger P., Lodesani M., Lokar V., Mladenovic M., Panasiuk B., Petrov P., Rašić S., Smodis Skerl M.I., Vejsnæs F., Wilde J. (2014a) 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 <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.3.02>.
 120. Hatjina F., Costa C., Büchler R., Uzunov A., Drazic M., Filipi J., Charistos L., Ruottinen L., Andonov S., Meixner M.D., Bienkowska M., Dariusz G., Panasiuk B., Le Conte Y., Wilde J., Berg S., Bouga M., Dyrba W., Kiprijanovska H., Korpela S., Kryger P., Lodesani M., Pechhacker M., Petrov P., Kezic N. (2014b) Population dynamics of European honey bee genotypes under different environmental conditions. Journal of Apicultural Research. 53(2), 233 – 247. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.05>.

121. Huang Q., Xu F., Shen H., Deng H., Liu Y., Lui J., Li J., Recker R. (2002) Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *American Journal of Human Genetics*. 70, 625 – 634.
122. Hubby J. L. and Lewontin R. C. (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. I. The number of alleles at different loci in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*. 54, 577 – 594.
123. Hunt G. and Page R. (1992) Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theor. Appl. Gene.* 85, 15 – 20.
124. Hunt G. J. and Page R. E. (1994) Linkage analysis of sex determination in the honey bee. *Molecular Genetics and Genomics*. 244, 512 – 518.
125. Hunt G., Guzman-Novoa E., Fondrk M. K., Page J. R., Robert E. (1998) Quantitative trait loci for honeybee stinging behavior and body size. *Genetics*. 148, 1203 – 1213.
126. Hunter R. and Markert C. (1957) Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*. 126, 1294 – 1295.
127. Ihaka R. and Gentleman R. (1996) R: A language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*. 53, 299 – 314.
128. Ivanova E., Ivgin R., Kence M., Kenche A. (2004) Genetic variability in honeybee populations from Bulgaria and Turkey. First European Conference of Apidology. 19 – 23 September 2004 Udine, Italy, 45.
129. Ivanova E., Dobrovolov I., Popov P. (1991) Studies on the electrophoretic patterns of the esterase isozymes of honey bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in ontogenesis. *Universite de Plovdiv „Paissi Hilendarski“ Travaux Scientifiques*. 29(6), 243 – 245.
130. Ivanova E., Popov P., Bogkova M. (1994) Electrophoretic studies of the NAD-dependent MDH during the larvae stage from the ontogenesis of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera; Apidae). *Biologie – Animalia*. 30 (6), 57 – 60.
131. Ivanova E. and Popov P. (1996 – 1997) Electrophoretic studies of non-specific esterases during the ontogenetic course of domestic bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera; Apidae) in Bulgaria. *Genetic and Breeding*. 28 (1 – 2), 13 – 16.
132. 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.

133. Ivanova E., Popov P., Dobrovolov I., Terzieva P. (1998) Dynamics in the expression of NAD-dependent MDH during ontogenesis in *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in Bulgaria. *Acta zoologica bulgarica*. 50 (2/3), 133 – 139.
134. Ivanova E. (1998) Electrophoretic studies on NAD P-dependent malate dehydrogenases (ME) during ontogenesis of honey bees *Apis mellifera* L. in Bulgaria. *Acta zoologica bulgarica*. 50 (2/3), 141 – 146.
135. Ivanova E. (2003) Genetic control of the organ specificity in expression of MDH during the *Apis mellifera* L. ontogenesis. *Microbiologia et Cytologia*. 39 (8), 45 – 51.
136. 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.
137. Ivanova E., Popov P., Dobrovolov I. (2000) Elektrophoretische Untersuchungen der wasserlöslichen Proteine bei der Honigbiene *Apis mellifera* L. im Verlauf der Ontogenese. *Apidologie*. 31, 679 – 687.
138. Ivanova E., Dobrovolov I., Tersieva P. (2001) Isoelectrophoretic Studies of Stage specificity in soluble protein expression of *Apis mellifera* L. in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 7, 73 – 76.
139. Ivanova E., Ivgin R., Kence M., Kenche A. (2004) Genetic variability in honeybee populations from Bulgaria and Turkey. First European Conference of Apidology. 19 – 23 September 2004 Udine, Italy, 45.
140. Ivanova E., Staykova T. (2005) Genetic variability in different colonies from *Apis mellifera* L. populations. Proceedings of the First Balkan Scientific Conference of Biology, Plovdiv (Bulgaria) 19 – 21 May 2005, 584 – 593.
141. 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.
142. Ivanova E., Petrov P., Ivgin R., Kence M., Bouga M., Emmanouel N. (2008) Genetic Variation of honeybee (*Apis mellifera*) populations from Bulgaria. Proceedings of the Third European Conference of Apidology, Belfast 8 – 11 September 2008, 55.
143. Ivanova E. and Bouga M. (2009) Genetic variability in honey bee population from Northern Bulgaria. Proceedings of the 41st Congress Apimondia, 15 – 20 September 2009 Montpellier – France.

144. Ivanova E. (2010) Investigation on genetic variability in honeybee populations from Bulgaria, Greece and Serbia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 24 (2), 385 – 389.
145. Ivanova E., Petrov P., Bouga M., Emmanouel N., Ivgin-Tunka R., Kence M. (2010a) Genetic variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Bulgaria. *Journal of Apicultural Science*. 54 (2), 51-62.
146. Ivanova E., Staykova T., Petrov P. (2010b) Allozyme variability in populations of local Bulgarian honey bee. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 24 (2SE), 379-384.
147. Ivanova E., Bienkowska M., Petrov P. (2011) Allozyme Polymorphism and phylogenetic relationships in *Apis mellifera* subspecies selectively reared in Poland and Bulgaria. *Folia biologica* (Kraków). 59 (3-4), doi:10.3409/fb59_3-4.09-13.
148. Ivanova E., Staykova T., Stoyanov I., Petrov P. (2012a) 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.
149. Ivanova E., Bouga M., Staykova T., Mladenovic M., Rasic S., Charistos L., Hatjina F., Petrov P. (2012b) The genetic variability of honey bees from the Southern Balkan Peninsula, based on alloenzymic data. *Journal of Apicultural Research*. 5 (4), 329-335. DOI 10.3896/IBRA.1.51.4.06.
150. Ivanova E. (2015) Additional Information on Allozyme Variability of Honey Bees, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, from Bulgaria. *Acta zoologica bulgarica*. 67 (4), 573-578.
151. Jensen A. B., Palmer K. A., Boomsma J. J., Pedersen B. V. (2005) Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* in trogression in protected populations of the black honey bee, *Apis mellifera mellifera*, in northwest Europe. *Molecular Ecology*. 14: 93–106. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2004.02399.x.
152. Jakobsson M. and Rosenberg N. A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 23 (14), 1801 – 1806. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm233
153. Jombart. T. (2008) Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 24 (11), 1403 – 1405. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn129

154. Ju-Ruai Li, Shao-Wen Li, Xiao Jink W., Jink-Wei X. (1992) The difference of MDH isozyme gene frequency in 3 subspecies of *Apis mellifera*. XIX International Congress of Entomology. Beijing, 39 p.
155. Kandemir I., Kence A. (1995) Allozyme variability in a Central Anatolian honey bee (*Apis mellifera* L.) population. *Apidologie*. 26, 503 – 510.
156. Kandemir I., Kence M., Kence A. (2000) Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey. *Apidologie*. 31 (3), 343 – 356.
157. Kandemir I., Kence M., Kence A. (2005) Morphometric and electrophoretic variation in different honeybee (*Apis mellifera* L.) population. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 885 – 890.
158. Kandemir I., Kence M., Sheppard W. S., Kence A. (2006) Mitochondrial DNA variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations from Turkey. *Journal of Apicultural Research*. 45 (1), 33 – 38. DOI:10.3896/IBRA.1.45.1.08.
159. Kekecoglu M., Bouga M., Soysal M. I., Harizanis P. (2009) Genetic Divergence and Phylogenetic relationships of Honey Bee populations from Turkey using PCR-RFLP's analysis of two mtDNA segments. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 15, 589 – 597.
160. Kence M., Farhoud H. J., Tunca R. I. (2004) Genetic comparison of Iranian honeybee (*Apis mellifera* L.) populations by RAPD analysis. *Int. Beekeeping Congress, Beekeeping For Sustainable Livelihoods and Rural Development. Abstracts*, 23.
161. Kraus B. and Hunt G. (1995) Differentiation of *Varroa jacobsoni* Oud populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Apidologie*. 26, 283 – 290.
162. Krause K. L., Hartley R., James R. and McInnis C. (2005) The first year experience in Australian universities: Findings from a decade of national studies. http://www.griffith.edu.au/__data/assets/pdf_file/0006/37491/FYEReport05.pdf
163. Krieg P. and Marek M. (1983) Protein and esterase changes in the haemolymph of the queens of honey bee, *Apis mellifera* L. *Comp Biochem Physiol*. 75 B, 513.
164. Lagercrantz U., Eellegren H., Andersson L. (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res*. 21, 1111 – 1115.
165. Lewontin R. C. and Kojima K. (1960) The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution*. 14, 450 – 472.

166. Lobo J. A., Del Lama M.A., Mestriner M.A. (1989) Population differentiation and racial admixture in the Africanized honeybee (*Apis mellifera* L). *Evolution*. 43, 794 – 802.
167. Mahalanobis P. C. (1936) On the generalised distance in statistics. *Proc. Natl. Inst. Sci. India*. 2, 49 – 55.
168. Markert C.(1968) The molecular basis for isozymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*151, 14 – 40.
169. Markert C. L. and Hunter R. L. (1959) *Histochem. and Cytochem.* 7, 42 – 49.
170. Martimianakis S., Klossa-Kilia E., Bouga M., Kiliass G. (2011) Phylogenetic relationships of Greek *Apis mellifera* subspecies based on sequencing of mtDNA segments (COI and ND5). *Journal of Apicultural Research*. 50 (1), 42-50. DOI: 10.3896/IBRA.1.50.1.05.
171. Meusel M and Moritz R. (1993) Transfer of paternal mitochondrial DNA in fertilization of honeybees (*Apis mellifera* L.) eggs. *Current Genetics*. 24 (6), 539 – 543.
172. Meixner M., Sheppard W., Poklukur J. (1993) Asymmetrical distribution of a mitochondrial DNA polymorphism between 2 introgressing honey bee subspecies. *Apidologie*. 24, 147 – 153.
173. Meixner M. D., Sheppard W. S., Dietza A., Krell R. (1994) Morphological and allozyme variability in honey bees from Kenya. *Apidologie*. 25, 188 – 202.
174. Meixner D., Arias M., Sheppard W. (2000) Mitochondrial DNA polymorphisms in honey bee subspecies from Kenya. *Apidologie*. 31, 181 – 190.
175. Meixner M., Worobik M., Wilde J., Fuchs S., Koeniger N. (2007) *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe – morphometric variation and determination of range limits. *Apidologie*. 38, 191 – 197.
176. Meixner M.D., Costa C., Kryger P., Hatjina F., Bouga M., Ivanova E., Büchler R. (2009) Conserving diversity and vitality for honey bee breeding. *J. Apicultural Res.* 49: 85 – 92, DOI 10.3896/IBRA.1.49.1.12.
177. Meixner M., Leta M. A., Koeniger N., Fuchs S. (2011) The honey bees of Ethiopia represent a new subspecies of *Apis mellifera* – *Apis mellifera simensis* n. spp. *Apidologie*. 42, 425 – 437. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-011-0007-y>.
178. Meixner M. D., Pinto M. A., Bouga M., Kryger P., Ivanova E., Fuchs S. (2013) Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds). *The COLOSS BEEBOOK*, Volume I: standard methods for

- Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research. 52(4), <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.05>.
179. Meixner M. D., Francis R. M., 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., 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. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.04>.
 180. Meixner M., Büchler R., Costa C., Andonov S., Bienkowska M., Bouga M., Filipi J., Hatjina F., Ivanova E., Kezic N., Kryger P., Le Conte Y., Panasiuk B., Petrov P., Ruottinen L., Uzunov A., 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.
 181. Mestriner M. A. (1969) Biochemical polymorphism in bees (*Apis mellifera ligustica*). Nature. 223, 188 – 189.
 182. Mestriner M. A., Contel E.P.B. (1972) The P-3 and Est-3 loci in the honeybee *Apis mellifera*. Genetics. 72(4), 733 – 738.
 183. Mikhailovsky S. S., Kulikov A. M., Potapov S. G., Lazebny O. E., Mitrofanov V. G. (2007) A RAPD Fingerprinting of Sibling Species of the *Drosophila virilis* Group. Russian Journal of Genetics. 43, 88 – 91.
 184. Meusel M. S., Moritz R. F. A. (1993) Transfer of paternal mitochondrial DNA in fertilization of honey bee (*Apis mellifera* L.) eggs. Current Genetics. 24(6), 539 – 543. DOI:10.1007/BF00351719.
 185. Moritz R. F. A., Hawkins C. F., Crozier R. H., Mackinlay A. G. (1986) A mitochondrial DNA polymorphism in honeybees (*Apis mellifera* L.). Experientia. 42, 322 – 324.
 186. Moritz R. F. A., Cornuet J. M., Kryger P., Garnery L., Hepburn H. R. (1994) Mitochondrial-DNA variability in South African honeybees (*Apis mellifera* L.). Apidologie. 25, 169 – 178. DOI: 10.1051/apido:19940205.
 187. Muñoz I., Stevanovic J., Stanimirovic Z., De La Rúa P. (2012) Genetic variation of *Apis mellifera* from Serbia inferred from mitochondrial analysis. Journal of Apicultural Science. 56, 59 – 69. DOI: 10.2478/v10289-012-0007-9.

188. Nash J. H. E. (1991) DNAfrag, program version 3.03, Institute for Biological Sciences National Research Council of Canada, Ottawa, Ontario, Canada.
189. Neel J. V., Mohrenweiser H., Meisler M. (1980) Rate of spontaneous mutation at human loci encoding protein structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77, 6037 – 6041.
190. Nei M. (1971) Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity. *The American Naturalist*. 105, 385 – 398.
191. Nei M. (1972) Genetic distances between populations. *American Naturalist*. 106, 283 – 292.
192. Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583 – 590.
193. Nielsen D., Page R. E. Jr., Crosland M. W. J. (1994) Clinal variation and selection of MDH allozymes in honey bee populations. *Experientia*. 50, 867 – 871.
194. Nielsen J. L., Gan C. A., Wright J. M., Morris D. B., Thomas K. (1995) Biogeographic distributions of mitochondrial and nuclear markers for southern steelhead. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3, 281 – 293.
195. Nikolova S. (2011) Genetic variability of local Bulgarian honey bees *Apis mellifera macedonica (rodopica)* based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Apicultural Science*. 55 (2), 117 – 129.
196. Nikolova S.N., Ivanova E.N. (2012) Genetic variability in a local Bulgarian honey bee population. *Acta Zoologica Bulgarica*. 64 (1), 199 – 204.
197. Nunamaker R. A., Wilson W. T. (1980) Some isozymes of the honeybee. *Isozyme Bulletin*. 13, 111 – 112.
198. Nunamaker R. A., Wilson W. T. and Haley B. E. (1984) Electrophoretic detection of Africanized honey bees (*Apis mellifera scutellata*) in Guatemala and Mexico based on malate dehydrogenase allozyme patterns. *J. Kans. Entomol. Soc.* 57, 622 – 631.
199. O'Donnell S. (1996) RAPD markers suggest genotypic effects on forager specialization in a eusocial wasp. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 38, 83 – 88.
200. Oliveira E. J., Padua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky Z. R., Vieira M. L. C. (2006) Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29 (2), 294 – 307.
201. Oldroyd B. P., Cornuet J. M., Rowe D., Rinderer T. E., Crozier R. H. (1995) Racial admixture of *Apis mellifera* in Tasmania, Australia:

- similarities and differences with natural hybrid zones in Europe. *Heredity*. 74, 315 – 325.
202. Ohta T. and Kimura M. (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetic Research*. 22, 201 – 204.
 203. Özdil F, Yildiz M. A., Meydan H., Gençer H. V. (2006) Genetic structure of Turkish honeybee populations based on RAPD and mtDNA RFLP markers. 2nd European Conference of Apidology. P53.
 204. Paduan K. D. S., Araujo-Junior J. P., Ribolla P. E. M. (2006) Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. *Genetics and Molecular Biology*. 29 (2), 391 – 395.
 205. Page R. E., Metcalf R. A. (1988) A population estimate of MDH allozyme frequencies for the honey bee, *Apis mellifera* L (Hymenoptera: Apidae). *Pan Pac Entomol*. 64, 285 – 289.
 206. Palmer M., Smith D., Kaftanoglu O. (2000) Turkish honeybees: genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *The Journal of Heredity*. 91, 42 – 46.
 207. Pamilo P., S. L. Varvio-Aho S. L. and Pekkarinen A. (1978) Low enzyme gene variability in *Hymenoptera* as a consequence of haplodiploidy. *Hereditas*. 88, 93 – 99.
 208. Peakall R., and Smouse P. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288 – 295.
 209. Pearson K. (1926) On the coefficient of racial likeness. *Biometrika*. 18, 105 – 117.
 210. Pedersen B. V. (1996) On the phylogenetic position of the Danish strain of the black honeybee (the Laeso bee), *Apis mellifera mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Entomol. Scand*. 27, 241 – 250.
 211. Peng-Juy Shin (1980) Activity of beta-galactosidase in the midgut of the honey bee. *Journal of Apicultural Research*. 19 (2), 105 – 111.
 212. Peševa V., Stoyanov I. Y., Andjelkovic B., Mladenovic M., Georgieva V. H., Ivanova E. N. (2015) Allozyme Analysis of Selectively Reared Populations of Honey Bee, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, in Kosovo. *Acta zoologica bulgarica*, 67 (4), 567 – 572.
 213. Petrov P., Ivanova E. (2009) Morpho-ethological and biochemical-genetic characteristics of the local Bulgarian honey bee *Apis mellifera rodopica*. In *Proceedings of the 41st International Apicultural Congress*. Montpellier, France, 15 – 20 September 2009.

214. Pichot and Pichot (1980) De polymorphisme electroforetique: Un moyend etude des population. Rev. Trav. Pech. 44 (3), 201 – 210.
215. Popov. P., Ivanova E., Dobrovolov I., Dimitrov B., Tersieva P. (2000) Population-genetic Study of *Apis mellifera* L. in Bulgaria. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 6, 433 – 438.
216. Posso C. E., Gonzalez R., Cardenas H., Gallego G., Duque M. C., Suarez M. F. (2003) Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Western and Northeastern Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz.Rio de Janeiro. 98 (4), 469 – 476.
217. Pritchard J. K., Stephens. M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. 155, 945 – 959.
218. Radloff S. E., Hepburn H. R., Hepburn C., De La Rúa P. (2001) Morphometric affinities and population structure of honeybees of the Balearic Islands in the Mediterranean Sea. Journal of Apicultural Research. 40, 97 – 103.
219. Ramshow J. A., Coyne J. A., Levontin R. C. (1979) The sensitivity of gel electrophoresis as a detector of genetic variations. Genetics (US). 93, 1019 – 1037.
220. Raymond M. and Rousset F. (1995) GENEPOP (Version-1.2) – A population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity. 86 (3), 248 – 249.
221. Rinderer T. E. (1986) Africanized Bees: An Overview.American Bee Journal. 126, 98 – 100; 128 – 129.
222. Robinson G. E. and Page R. E. J. (1988) Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. Nature. 333, 356 – 358.
223. Robinson G. E, Page R. E., Fondrk M. K. (1990) Intracolony behavioral variation in worker oviposition, oophagy, and larval care in queenless honey-bee colonies. Behav. Ecol. Sociobiol. 26, 315 – 323. doi:10.1007/BF00171096.
224. R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
225. Ruttner F. L., Tassencourt L., Louveaux J. (1978) Biometrical-statistical analysis of the geographical variability of *Apis mellifera* L. I. Material and methods. Apidologie. 9, 363/381.
226. Ruttner F. (1980) *Apis mellifera adami* (n.ssp.), die Kretische Biene. Apidologie. 11, 385 – 400. DOI: 10.1051/apido:19800407.

227. Ruttner F. (1988) Biogeography and taxonomy of honey bees. Springer-Verlag; Berlin, Germany. 284 p.
228. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi. R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988) Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239, 487 – 491.
229. Saitou N., Nei M. (1987) The Neighbour-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution. 4 (4), 406 – 425.
230. Schiff N. M., Sheppard W. S. (1995) Genetic analysis of commercial honey bees (*Hymenoptera, Apidae*) from the southeastern United States. J. Economic Entomology. 88, 1216 – 1220.
231. Sanghvi L. D. (1953) Comparison of genetical and morphological methods for a study of biological differences. Am. J. Phys. Anthropol. 11, 385 – 404.
232. Shao Wen Li, Men Yo Pin, Chang J. T, Li Ju Huai (1985) Studies on the isozymes of honey bees. Acta Entomol Sin. 8, 369 – 374. (In Chinese).
233. Shao Wen Li, Men Yo Pin, Chang J. T., Li Ju Huai (1988) Studies on the isozymes in two species of honey bees *Apis mellifera* and *Apis cerana*. Acta entomol Sin. 31, 15 – 19. (In Chinese).
234. Shaw C. (1965) Electrophoretic variations in enzymes. Science. 149, 936 – 943.
235. Sheppard W. S., Berlocher S. H. (1984) Enzyme polymorphism in *Apis mellifera* from Norway. J. Apiculture Res. 23, 64 – 69.
236. Sheppard W. S., Berlocher S. H. (1985) New allozyme variability in Italian honey bees. J. Heredity. 76, 45 – 48.
237. Sheppard W. S., McPherson B. A. (1986) Genetic variation in honey bees from an area of racial hybridization in western Czechoslovakia. Apidologie. 17(1), 21 – 32.
238. Sheppard W. S. (1988) Comparative study of enzyme polymorphism in United States and European honey bee (*Hymenoptera: Apidae*) populations. Ann. Entomological Society of America. 81, 886 – 889.
239. Sheppard W. S., Huettel M. D. (1988) Biochemical genetic markers, intraspecific variation, and population genetics of the honey bee. (In: Needham, G. R., Page Jr., R. E., Delfinado-Baker, M., and Bowman, C. E. (eds). Africanized Honey Bees and Bee Mites. Ellis-Horwood, Chichester; England, 281 – 286.

240. Sheppard W. S., Arias M. C., Greech A., Meixner M. D. (1997) *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee sub-species from Malta. *Apidologie*. 28, 287 – 293. DOI: 10.1051/apido:19970505.
241. Sinacori A., Rinderer T. E., Lancaster V., Sheppard W. S. (1998) A morphological and mitochondrial assessment of *Apis mellifera* from Palermo, Italy. *Apidologie*. 29, 481 – 490. DOI:10.1051/apido:19980601.
242. Schlötterer C. (2000) Microsatellite analysis indicates genetic differentiation of the neo-sex chromosomes in *Drosophila americana americana*. *Journal of Heredity*. 85(6), 610 – 616.
243. Schnute J. T., Boers N. M., Haigh R., Couture-Beil A. (2010) PBSmapping: Mapping Fisheries Data and Spatial Analysis Tools[Online]. Available: [http://CRAN.R-project.org/package = PBSmapping](http://CRAN.R-project.org/package=PBSmapping) [Accessed 26-10-2011].
244. Smith D., Taylor O., Brown W. (1989) Neotropical Africanized honeybees have African mitochondrial DNA. *Nature*. 339, 213 – 215.
245. Smith D. (1991) Mitochondrial DNA and honeybee biogeography. In Smith, D R(ed) *Diversity in the genus Apis*. Boulder Co. Westview. 131 – 176.
246. Smith D., Taylor O., Brown W. (1989) Neotropical Africanized honeybees have African mitochondrial DNA. *Nature*. 339, 213 – 215.
247. Smith D.R., Brown W.M. (1988) Polymorphisms in mitochondrial DNA of European and Africanized honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia*. 44, 257 – 260. DOI:10.1007/BF01941730.
248. Smith D. R., Brown W. M. (1990) Restriction endonuclease cleavage site and length polymorphisms in mitochondrial DNA of *Apis mellifera mellifera* and *A. m. carnica* (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 83, 81 – 88.
249. Smith D. R., Glenn T. (1995) Allozyme polymorphisms in Spanish honey bees. *Journal of Heredity*. 86, 12 – 16.
250. Smith D. R., Hagen R. H. (1997) The biogeography of *Apis cerana* as revealed by mitochondrial DNA sequence data. *Journal of the Kansas Entomological Society*. 69, 294 – 310.
251. Smith D., Palmer M., Otis G., Damus M. (2003) Mitochondrial DNA and AFLP markers support species status of *Apis nigrocincta*. *Insectes Society*. 50, 185 – 190.
252. Sneath P. H. A., Sokal R. R. (1973) *Numerical Taxonomy – The principle and practice of numerical classification*, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

253. Solignac M., Vautrin D., Loiseau A., Mougel F., Baudry E., Estoup A., Garnery L., Haberl M., Cornuet J. M. (2003) Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Molecular Ecology Notes*. 3 (2), 307 – 311.
254. Soland-Reckeweg G., Heckel G., Neumann P., Fluri P., Excoffier L. (2009) Gene flow in admixed populations and implications for the conservation of the Western honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Conservation*. 13, 317 – 328. DOI 10.1007/s10841-008-9175-0.
255. Strange J. P., Garnery L., Sheppard W. S. (2007) Persistence of the Landes ecotype of *Apis mellifera mellifera* in southwest France: confirmation of a locally adaptive annual brood cycle trait. *Apidologie*. 38, 259 – 267. DOI: 10.1051/apido:2007012.
256. Stevanovic J., Stanimirovic Z., Radakovic M., Kovacevic S. R. (2010) Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses. *Russian Journal of Genetics*. 46 (5), 603 – 609. DOI: 10.1134/S1022795410050145.
257. Suazo A., Mctiernan R., Hall H. G. (1998) Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera*) in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Heredity*. 89, 32-36.
258. Suazo A. and Hall H. G. (1999) Modification of the AFLP protocol applied to honeybee (*Apis mellifera* L.) DNA. *Biotechniques*. 26 (4), 704 – 709.
259. Suazo A., Hall H. G. (2002) A locus with PCR-RFLP alleles characteristic of African and European honeybee (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) groups of subspecies. *Annals of the Entomological Society of America*. 95 (1), 115 – 124.
260. Sylvester H. A. (1982) Electrophoretic identification of Africanized honeybees. *J. Apic. Res.* 21, 93 – 97.
261. Sylvester H. A. (1986) Biochemical genetics. In: Rinderer TE (ed) *Bee genetics and breeding*. Academic Press. Orlando. 177 – 203.
262. Szalanski A. L., McKern J. A. (2007) Multiplex PCRRFLP diagnostics of the Africanized honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*. 50, 939 – 945.
263. Takezaki N. and Nei M. (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. 144, 389 – 399.
264. Tavares M. G., Ribeiro E. H., Campos L. A. O., Barros E. G., Olivera M. T. V. A. (2001) Inheritance Pattern of RAPD Markers in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *The Journal of Heredity*. 92(3), 279 – 282.

265. Ting J. and Cohong C. (2011) Genetic diversity and population structure of Chinese honeybees (*Apis cerana*) under microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*. 19 (9), 1712 – 1720.
266. Tunca R. I., Bilgen G., Kence M., Turkmut L. (2004) Genetic Analysis of Honeybees of Van Region in Turkey with RAPD Method. *Proceedings of the First European Conference of Apidology*.
267. Tunca R. I., Staykoya T., Ivanova E., Kence M., Grekov D. (2007) Differentiation of silkworm, *Bombyx mori* strains measured by RAPD analyses. *Preceeding of International Conference Serial Culture challenges in the 21st Cetury & 3rd Basca Meeting*. P. 247. 18 – 21 SEPT., 2007, Vratza, Bulgaria.
268. Uzunov A. (2007) Raznovidnost na medonosnite pceli (*Apis mellifera* L.) na teritorijata na Republika Makedonija. MSc thesis. Faculty for Agricultural Sciences and Food. Skopje. Macedonia.
269. Uzunov A., Kiprijanovska H., Andonov S., Naumovski M., Gregorc A. (2009) Morphological diversity and racial determination of the honey bee (*Apis mellifera* L.) population in the Republic of Macedonia. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 48 (3), 196 – 203. DOI: 10.3896/IBRA.1.48.3.08.
270. Uzunov A., Costa C., Panasiuk B., Meixner M. D., Kryger P., Hatjina F., Bouga M., Andonov S., Bienkowska M., Le Conte Y., Wilde J., Gerula D., Kiprijanovska H., Filipi J., Petrov P., Ruottinen L., Pechhacker H., Berg S., Dyrba W., Ivanova E., Büchler R. (2014a) Swarming, defensive and hygienic behaviour in honey bee colonies of different genetic origin in a pan-European experiment. *Journal of Apicultural Research*. 53(2), 248 – 260. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.06>.
271. Uzunov A., Meixner M.D., Kiprijanovska H., Andonov S., Gregorc A., Ivanova E., Bouga M., Dobi P., Büchler R., Francis R.M., Kryger P. (2014b) Genetic structure of *Apis mellifera macedonica* in the Balkan Peninsula based on microsatellite DNA polymorphism. *Journal of Apicultural Research*. 53(2), 288 – 295. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.53.2.10>.
272. Van Belkum A. (1999) The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 306 – 311.
273. Visscher P. K. (1996) Reproductive conflict in honey bees: a stalemate of worker egg-laying and policing. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 39: 237 – 244.
274. Waldschmidt A. M., Marco-Junior P., Barros E. G., Campos L. A. O. (2002) Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep.

- (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) With RAPD markers. *Brazilian Journal of Biology*. 62 (4B), 923 – 928.
275. Weir B. and Cockerham C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38, 1358 – 1370.
 276. Welsh J. and McClelland M. (1990) Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18, 7213 – 7218.
 277. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafaski J. A., Tingey S. V. (1990) DNA Polymorphism Amplified by arbitrary primers are used as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18, 6531 – 6535.
 278. Wilson S. F. (1982) Environmental influences on the activity of captive apes. *ZooBiology*. 1 (3), 1-1-109. DOI: 10.1002/zoo.1430010304.
 279. Whitfield C., Behura S., Berlocher S., Clark E., Johnston J., Sheppard W., Smith D., Suarez A., Weaver D., Tsutsui N. (2006) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*. 314 (5799), 642 – 645.
 280. Wright S. (1978) *Evolution and the Genetics of Populations*, Volume 4 Variability within and among natural populations. University of Chicago, Press books, Chicago.

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 осъществяването му!

БЛАГОДАРЯ на колегите от сектора по генетика и на техническия екип в катедра „Биология на развитието“ за конкретната помощ в моменти на напрежение и съпричастността с това проучване!

БЛАГОДАРЯ на проф. д.ф.н. Елена Николова и на доц. д-р Русалена Пенджекова-Христева от филиала на Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ в гр. Смолян за направените технически редакции, за художествените предложения, за подкрепата и споделените откровения.

ИЗКАЗВАМ БЛАГОДАРНОСТ НА:

- Пловдивския 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 материална база, 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 своевременна помощ!

БЛАГОДАРЯ НА:

- проф. д-р Пламен Петров – за проведените дискусии и професионализма, за съпричастността и за вдъхновяващата работа в екип;
- проф. д-р Теодора Стайкова – за дългите години вълнуваща съвместна работа, за откритостта в отношенията ни и за доброто приятелство;
- моя съпруг – за обичта и подкрепата;
- майка ми и брат ми – за корените;
- цялото ми семейство – синове, снахи и внуци –
ЗА ЛЮБОВТА И ЕДИНЕНИЕТО!

Евгения Нешова Иванова

**ПОПУЛАЦИОННО-ГЕНЕТИЧНОТО БОГАТСТВО
НА БЪЛГАРСКАТА МЕДОНОСНА ПЧЕЛА
И
ИСТОРИЯТА НА ЕДНО 25-ГОДИШНО НАУЧНО ПЪТУВАНЕ**

Българска, първо издание

Коректор: Гергана Иванова

Предпечатна подготовка: Гергана Георгиева

Печат и подвързия: УИ „Паисий Хилендарски“

Пловдив, 2018

ISBN 978-619-202-393-5