



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 577.21; 636.082

© 2015

О.І. Метлицька,
доктор сільсько-
господарських наук

С.І. Ковтун,
член-кореспондент НААН,
доктор сільсько-
господарських наук

М.Д. Палькіна
Інститут розведення
і генетики тварин
імені М.В. Зубця НААН

ДНК-ПАСПОРТИЗАЦІЯ ПОРІД БДЖІЛ УКРАЇНИ В СИСТЕМІ ЗБЕРЕЖЕННЯ І ВДОСКОНАЛЕННЯ ЇХ ГЕНОФОНДУ

Мета. Розробити метод ДНК-паспортизації і встановити генофондні стандарти чистопородності у вітчизняному бджільництві за молекулярно-генетичними фінгерпринтними маркерами із множинною локалізацією в геномі (RAPD, ISSR). **Методи.** Молекулярно-генетичні, статистичні, морфометричні, етологічні. **Результати.** Наведено результати молекулярно-генетичного моніторингу бджіл української, карпатської і сірої гірської кавказької порід за використання різних технологій виявлення поліморфізму генетичних локусів. Розроблено генетичні паспорти порід за виявленими ідентифікаційними алелями. Абсолютний маркер сірої гірської кавказької породи G_{800} , що був у всіх її представників, є надійним інструментом визначення сімей помісного походження бджіл українських аборигенних порід. **Висновки.** Установлення генетично детермінованих породних відмінностей, підтверджених генетико-популяційними показниками, дає змогу створити природні резервати чистопородних бджіл як обов'язкову складову в системі збереження їх генофонду та селекційного вдосконалення.

Ключові слова: ідентифікаційний маркер, генетичний паспорт, порода бджіл, критерій чистопородності, генофонд.

Однією з ключових проблем у бджільництві є міжпородна гібридизація, пошук і збереження резерватів чистопородних масивів аборигенних бджіл України. Зниження продуктивності бджолиних сімей помісного походження (зимостійкості, опірності до інфекційних захворювань, сили сім'ї, плідності маток та ін.) призводить до потреби пошуку об'єктивних критеріїв оцінки ступеня чистопородності, фенотипічної консолідованості племінних масивів бджолиних сімей з урахуванням притаманного кожній породі комплексу екстер'єрних і господарсько корисних ознак [4, 14].

Наразі проведення генетичної паспортизації є актуальним завданням сучасної селекції сільськогосподарських тварин, зокрема бджоли медоносної. Стихійна, безконтрольна міжпородна метизація, що відбувалася протягом останніх років, і добір за мультифакторіальними ознаками, переважно пов'язаними із проявом медової продуктивності, призвели до порушення унікальних генних комплексів, адаптованих до певних умов існування бджолиних сімей, що традиційно склалися протягом тривалого періоду. Це, в свою чергу, призвело до появи непередбачуваних комбінацій

генетичного матеріалу, зниження неспецифічної стійкості бджіл внаслідок розбалансування систем імунного захисту та адаптивності до динаміки еколого-географічних чинників.

Поряд із класичними морфометричними методами оцінки підвидової та екотипової належності бджіл з метою визначення ступеня їх генетичної гомогенності, консолідованості та чистопородності як інформативні маркери традиційно використовують локуси мітохондріальної ДНК [11] і мікросателітні послідовності геному [16]. Водночас ефективність застосування цих майже традиційних молекулярно-генетичних маркерів донині залишається низькою через недостатнє оснащення лабораторій генетичного контролю сучасним обладнанням, низький рівень фінансування та обмежену кількість локусів, доступних для одночасного генотипування особин. Особливо гострим це питання є у бджільництві, оскільки міжнародний проект з дослідження генофонду і картування генів бджоли медоносної триває [10]. Тому потрібно знайти нові підходи одночасного маркування багатьох генетичних локусів для визначення специфіки геному кожної досліджуваної особи для об'єктивної оцінки своєрідності генофондів популяцій. Особливої важливості набуває вирішення цього питання у зв'язку з розв'язанням головної проблеми — визначення найтипівіших представників популяцій і створення генетично обґрунтованих програм з їх збереження та раціонального використання [1, 2]. Очевидно, що створення полілокусних систем генетичних маркерів дасть змогу отримати цінну інформацію про популяційно-генетичну структуру аборигенних порід бджоли медоносної і межі ареалів їх локальних популяцій, а ефективність генетичного підходу може бути значно підвищена завдяки зіставленню і корегуванню отриманих результатів традиційними методами морфометрії.

Мета досліджень — створення інформативних систем ДНК-типування геному бджіл для визначення генетичного поліморфізму на міжпородному рівні і встановлення критеріїв чистопородності, характеру диференціації та усунення негативних наслідків метизації генофонду бджіл української породи. Для досягнення цієї мети було проведено методичну оптимізацію процедури виділення ДНК із імаго робочих бджіл, встановлено нуклеотидну структуру ISSR та RAPD праймерів, придатних для дослідження генетичного поліморфізму на міжпородному рівні, експериментально

визначено оптимальний режим ампліфікації фрагментів генетичних локусів бджіл, розташованих між інвертноорієнтованими послідовностями мікросателітних праймерів, проведено генетичний моніторинг найтипівіших чистопородних популяцій бджіл української, карпатської та сірої гірської кавказької порід, розроблено генетичні паспорти.

Методика досліджень. У роботі використано зразки імаго робочих бджіл (по 24 особи): української породи із плембджолорозплідника «Прибузькі медобори» Летичівського р-ну Хмельницької обл., приватних пасік Платавської, Миколаївської та Сумської областей; карпатської породи типу «Вучківський» із Мукачівського плембджолозаводу Закарпатської обл. та приватного підприємства (ПП) «Медові поля» Київської обл.; сірої гірської кавказької породи із бджологосподарства «Червона поляна» (Грузія) та приватного підприємства Київської обл.

Дослідження виконано на базі лабораторій генетики Інституту свинарства і АПВ НААН та Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН протягом 2011–2014 рр.

Геному ДНК виділяли із тканин імаго робочих бджіл із використанням комерційного набору «ДНК-сорб В» виробництва «Амплісінс» (Російська Федерація) згідно з рекомендаціями виробника та за використання власних модифікацій [7]. Для проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з праймерами ISSR, RAPD використовували реакційну суміш об'ємом 25 мкл: реакційний буфер (16,6 ммоль/мл $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 67 ммоль/мл Tris-HCl ; 0,01% Tween-20; 2 ммоль/мл MgCl_2 ; 2 ммоль/мл кожної dNTP) — 2,5 мкл; 100 пМ праймера (0,5–1 мкл); від 2 до 4 од. активності Taq-полімерази (0,1–0,2 мкл); 1–2 нг ДНК-зразка (1–3 мкл); вода деіонізована.

Температурний режим і кількість циклів ПЛР-ампліфікації для кожного праймеру визначали окремо. Установлено структуру праймерів і режим їх випалювання (табл. 1).

Електрофорез продуктів ампліфікації ДНК, отриманих з праймерами RAPD, ISSR проводили у 2%-му агарозному гелі з наступним фарбуванням у розчині бромистого етидію [6]. Візуалізацію патернів здійснювали на транслюмінаторі за довжини УФ-випромінювання 340 нм з наступною фотодокументацією цифровою камерою. Контроль розмірів отриманих ПЛР-продуктів проводили за допомогою маркерів молекулярної маси 1 kb-Ladder plus («Fermentas», Литва).

1. Концентрація і температурний режим ISSR, RAPD випалювання праймерів, придатних для проведення ДНК-паспортизації

Праймер	Структура праймерів	Температура випалювання, °С
S1	3'-AGC AGC AGC AGC AGC C-5'	57
S2	3'-AGC AGC AGC AGC AGC G-5'	57
S4	3'-CT CT CT CT CT CT CT G-5'	57
S7	3'-TCG TCG TCG TCG TCG T-5'	60
S9	3'-CA CA CA CA CA CA CA T-5'	57
OPA-1	3'-CAG GCC CTT C-5'	36
OPA-4	3'-AAT CGG GCT G-5'	36
B15	3'-GGA GGG TGT T-5'	36

Для аналізу генетичної структури груп тварин за полілокусними ДНК-маркерами використовували спеціалізовані математичні алгоритми за використання стандартних комп'ютерних програм GELSTATS [15], GENALEX-6 [13], TREE [13], Statistica, BIOSYS-1 [17], MEGA-4 [12]. Статистичну вірогідність отриманих результатів обчислювали за критеріями χ^2 , Ст'юдента, Фішера [5, 8, 9].

Результати досліджень та їх обговорення. Оптимізовано процедуру виділення ДНК із імаго робочих бджіл, встановлено нуклеотидну структуру ISSR-праймерів, придатних для дослідження генетичного поліморфізму на міжпородному рівні. Методичний підхід щодо визначення придатності праймерів у технологіях RAPD, ISSR для ідентифікації міжпородних відмінностей ґрунтується на використанні еквівалентних ДНК-сумішей типових представників порід і середнього температурного оптимуму ампліфікаційного режиму +58°C. Обчислення параметрів інформативності праймерів за результатами аналізу трьох порід бджіл (української, карпатської та сірої

гірської кавказької) свідчить, що найпридатнішими для проведення генетико-популяційних досліджень бджіл на міжпородному рівні виявилися праймери, які відтворювали 17–33 амплікони і характеризували 3,14–7,23 геномного локусу: генетичні системи ISSR — S1, S2, S4, S7, S9 та RAPD-маркери на основі затравок OPA-1, OPA-4 і B15.

Відповідно до розрахованих величин маркерних індексів, найбільш інформативними системами для проведення міжпородних порівнянь бджіл є ISSR-S4 із показником маркерного індексу (MI) 3,05 та RAPD-OPA-4 (MI= 4,59).

ДНК-типуванню підлягали бджоли трьох порід, попередньо охарактеризовані за морфометричними показниками, що відповідали фенотиповим критеріям чистопородності за 5-ма системами ISSR та 3-ма RAPD-маркерів. Використаний нами після проведення популяційно-генетичних досліджень метод генетичної паспортизації із застосуванням фінгерпринтних RAPD-, ISSR-технологій ґрунтувався на встановленні абсолютних і відносних маркерів з високою частотою поширення та вірогідними критеріями відмінності в межах проаналізованих популяцій. Зазначений підхід використовували для розробки генетичних паспортів. Формула генетичного паспорта містить буквенні шифри праймерів із підстроичними індексами — розмірами ідентифікаційних ДНК-фрагментів породи (табл. 2).

Найбільшу кількість високоінформативних породоспецифічних маркерів для української породи бджіл виявлено за праймером ISSR-S4, карпатської — RAPD-OPA-1 (по 3 ідентифікаційних ДНК-фрагменти), кавказької — ISSR-S1 та S2, що загалом виявляють 14 ідентифікаційних алелів. Ампліфікація з мікросателітним заякореним праймером S1 у техніці ISSR призводить до утворення фінгерпринту із загальною кількістю смуг — 32 з розмірами в діапазоні молекулярних мас — 1430–220. Ця генетична система

2. Генетичні формули бджіл трьох порід за ДНК-аналізом з 3-ма праймерами RAPD та 5-ма ISSR

Порода бджіл	Генетична формула породи
Українська, n=24	A ₉₈₀ A ₇₀₀ B ₇₂₀ C ₁₀₀₀ C ₆₃₀ F ₈₁₀ F ₅₅₅ F ₄₃₀ H ₆₇₀ H ₅₈₅
Карпатська, n=24	A ₁₁₄₅ A ₆₂₀ A ₅₀₀ B ₁₁₁₀ F ₁₁₁₀
Сіра гірська кавказька, n=24	A ₇₄₀ A ₇₀₀ A ₄₅₅ B ₉₇₀ B ₉₃₀ B ₇₇₀ B ₅₉₀ B ₄₈₅ D ₈₃₀ D ₅₇₀ D ₄₅₅ D ₃₈₅ D ₃₅₀ D ₂₉₀ D ₂₄₀ E ₅₈₅ E ₅₄₅ E ₅₃₀ E ₄₀₀ E ₃₅₀ E ₃₀₀ E ₂₆₀ G ₈₀₀ H ₂₄₀
Примітка: великими літерами позначено праймери: А — OPA-1; В — OPA-4; С — B15; D — ISSR-S1, E — ISSR-S2, F — ISSR-S4, G — ISSR-S7, H — ISSR-S9, абсолютний маркер виділено жирним шрифтом.	



Дендрограма генетичних взаємин між популяціями бджіл трьох порід, побудована за алгоритмом NJ

є придатною для встановлення специфічних характеристик бджіл кавказької породи — загалом ідентифіковано 7 ДНК-маркерів. На особливу увагу заслуговує ДНК-смуга розміром 1000 п.н., що трапляється в усіх досліджених представників кавказької породи і не знайдено взагалі у бджіл української, тому може вважатися абсолютним діагностичним маркером для цих двох порід. Незначна концентрація цього ДНК-фрагмента, виявлена у вибірці бджіл карпатської породи (25%), не дає змоги однозначно відокремити представників карпатської і кавказької порід на рівні однієї особини чи обмеженої вибірки.

Найбільшу кількість унікальних породних маркерів вдалося виявити для сірих гірських кавказьких бджіл — загалом 24, причому один із них характеризувався як абсолютний і мономорфний (з частотою в популяції 1,000), оскільки був притаманний лише особинам кавказької породи і не траплявся у популяціях інших порід бджіл, використаних у цьому досліді.

Цей маркер (позначений у формулі жирним шрифтом — G_{800}), установлений за допомогою міжмікросателітного аналізу із праймером S7, є надійним інструментом ідентифікації чистопородних бджіл кавказької породи та сімей української і карпатської порід гібридного походження. Загалом максимум породоспецифічних маркерів, установлених для бджіл кавказької породи, пояснюється їх географічною ізоляцією та мінімізацією впливу на структуру їх генофонду особин української селекції. Найконтрастнішими за більшістю генетико-популяційних показників є бджоли української та кавказької порід.

Середня кількість продуктів ампліфікації, виявлених сумарно внаслідок проведеного типування за 8-ма полілокусними системами у бджіл української породи, становила 80,84 проти 69,50 в особин сірої кавказької ($P < 0,001$), значення цього параметра у бджіл карпатської породи — 73,71.

Розрахована гетерозиготність у популяції бджіл кавказької породи — 0,441 і була достовірно нижчою ($P < 0,001$), ніж значення цього параметра в особин карпатської (0,461) та української (0,465) порід. Це може свідчити про помірний інбридинг і занижену ефективну чисельність популяцій, використаних у дослідженні.

Для встановлення характеру філогенетичних зв'язків між бджолами української, карпатської та кавказької порід наявну вибірку тварин розділили на окремі субпопуляції і на основі проведеного генетико-популяційного аналізу за 8-ма полілокусними маркерними системами розрахували генетичні дистанції за алгоритмом М. Нея [15]. Згідно з отриманими даними бджоли української і карпатської порід характеризувалися високим ступенем генетичної подібності (0,578): за результатами генетичного моніторингу із залученням до аналізу понад 50 поліморфних геномних локусів, між бджолами української та кавказької порід значення індексу становило 0,457, а для карпатських і кавказьких бджіл — 0,458. Розраховані значення генетичних дистанцій між популяціями бджіл різних порід використано для побудови дендрограми, що складалася з двох окремих кластерів (рисунком).

До структури одного з них входив підкластер у складі популяцій української породи «Хмельницького» типу та бджіл карпатської породи з пасіки Київської обл. Особини карпатської породи і української «Новоукраїнського» типу утворили окремі відгалуження в складі єдиного кластера.

В інший (окремий) кластер дендрограми увійшли популяції однієї породи — сірої гірської кавказької. Утворення спільного підкластера популяціями української породи (типу «Хмельницький» та бджолами із Київської обл.) може частково свідчити про те, що саме українських бджіл неодноразово завозили в Київську обл. Це пояснює характер групування підкластерних гілок і доводить нечистопородне походження карпатських бджіл з обраної для дослідження пасіки, незважаючи на їх морфометричну відповідність стандартам карпатської породи.

Висновки

Отримані дані кластерного аналізу популяцій бджіл трьох порід дають підстави стверджувати, що бджоли карпатської і української порід належать до одного підвиду (*Apis mellifera carnica*) та можуть бути розцінені як окремі екотипи з існуванням певного рівня генетичної диференціації і наявністю унікальних детермінант на фенотиповому та генетичному рівнях. Для посилення унікальності української та карпатської порід потрібно створити природні ізольовані резервати за умов

використання жорсткого морфометричного контролю, молекулярно-генетичних методів ідентифікації чистопородних особин, географічної ізоляції та застосування селекційних методів у напівзакритих популяціях. Результати проведених досліджень, кластерний аналіз та створені генетичні паспорти трьох порід бджіл можна використати для розробки ефективних заходів щодо раціонального використання та відновлення чисельності автохтонної української бджоли.

Бібліографія

1. Идентификация пород и популяций медоносной пчелы с использованием метода ПЦР/ Н.И. Кривцов, Н.И. Горячова, И.Г. Удина и др.// Сельскохозяйственная биология. — 2010. — № 6. — С. 26–29.
2. Ильясов Р.А. Полиморфизм *Apis mellifera mellifera* L. на Урале: автореф. дисс. на соискание уч. степ. канд. биол. наук: спец. 03.00.15. — Генетика/Р.А. Ильясов. — Уфа, 2006. — 20 с.
3. Календарь Р.Н. Компьютерная программа для построения эволюционных деревьев на основе электрофореграмм ДНК и белков/Р.Н. Календарь// Материалы конф. «Молекулярно-генетические маркеры и селекция растений». — К., 1994. — С. 25–26.
4. Кривцов Н.И. Прошлое, настоящее и будущее пчеловодства/Н.И. Кривцов//Зоотехния. — 2008. — № 1. — С. 38–40.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия/Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1990. — 352 с.
6. Маниатис Т. Молекулярное клонирование/ Т. Маниатис., Э. Фрич, Д. Сэмбрук; пер. с англ. под ред. А.А. Баева. — М.: Мир, 1984. — 479 с.
7. Методичні рекомендації з морфо-генетичної ідентифікації українських бджіл/О.І. Метлицька, В.П. Поліщук, І.І. Головецький, М.Д. Палькіна. — Полтава: Астроя, 2014. — 30 с.
8. Плохинский Н.А. Биометрия/Н.А. Плохинский. — М.: Колос, 1969. — 368 с.
9. Шебаніна О.В. Методи непараметричної статистики. Практикум з біометрії/О.В. Шебаніна, С.С. Крамаренко, В.М. Ганганов. — Миколаїв: МДАУ, 2008. — 165 с.
10. Genomic correlates of recombination rate and

- its variability across eight recombination maps in the western honey bee (*Apis mellifera* L.)/C.R. Ross, D.S. DeFelice, G.J. Hunt et al.//BMC Genomics. — 2015. — V. 107, № 16. — P. 1–11.
11. Magnus R.M. Mitochondrial DNA diversity of Honey Bees (*Apis mellifera*) from unmanaged colonies and Swarms in the United States/R.M. Magnus, D.T. Amber, A.L. Szalansky//Biochem. Genetic. — 2014. — V. 52. — P. 245–257.
12. MEGA-4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0/K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar//Molecular Biology and Evolution. — 2004. — V. 24. — P. 1596–1599.
13. Peacall R. GENALEX-6: genetic analysis in Excel Population genetic software and research/ R. Peacall, P.E. Smouse//Molecular Ecology Notes. — 2006. — № 6. — P. 288–295.
14. Reaction of individual physiological barriers in bacterial infection in different races of the honeybee *Apis mellifera*/E.S. Salytkova, G.V. Ben'kovskaya, L.R. Gaifullina et al.//J. of Evolutionary Biochemistry and Physiology. — 2005. — V. 41, № 3. — P. 318–324.
15. Rogstad S. GELSTATS: a computer program for population genetics analyses using VNTR multilocus probe data/S. Rogstad, S. Pelican//Bio Techniques. — 1996. — V. 21, № 6. — P. 187–196.
16. Shaibi T. A microsatellite DNA toolkit for studying population structure in *Apis mellifera*/T. Shaibi, H. Lattorf, R. Moritz//Mol. Ecol. Resour. — 2008. — V. 8, № 5. — P. 1034–1036.
17. Swofford D. BIOSYS-1: a Fortran programs for the comprehensive analysis of electroforetic data in population genetics and systematics/D. Swofford, R. Selander//J. Heredity. — 1981. — V. 72. — P. 281–283.

Надійшла 24.04.2015.