

**МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ БДЖІЛ
УКРАЇНСЬКОЇ ТА КАРПАТСЬКОЇ ПОРІД В ПОРІВНЯННІ
З ОЗНАКАМИ ЇХ ЕКСТЕР'ЄРУ**

О.І. Метлицька, кандидат сільськогосподарських наук НААН України.

В.П. Поліщук, доктор сільськогосподарських наук, професор НУБіП України.

А.В. Видрик, аспірантка*.

Проведено молекулярно-генетичні дослідження представників української і карпатської порід бджіл методом полілокусного ДНК-типування із застосуванням двох маркерних систем – RAPD, ISSR. Встановлено, що за використання RAPD праймера OPA-4 було виявлено мономорфний фрагмент у бджіл української породи, який відсутній у представників карпатської. Показано міжпородні відмінності сімей, відібраних для досліду, за основними породними ознаками екстер'єру, що також підтверджується методом ДНК-типування.

Ключові слова: *порода бджіл, екстер'єрні ознаки, ДНК-типування, генетичний маркер, фінгерпринтинг, локус, поліморфізм, праймер, мікросателіти.*

Бджола медоносна набула широкого розповсюдження майже в усіх країнах світу завдяки надзвичайним можливостям щодо швидкої адаптації до кліматично-географічних умов та місцевої флори. Внаслідок природного добору виникали найбільш пристосовані форми із відповідними характерними особливостями генотипу. Завдяки копіткій роботі В. Алпатова [1], Рутнера [13] та інших дослідників було виділено 24 підвиди бджоли медоносної, яких спочатку назвали в зарубіжних літературних джерелах расами. Згодом

* Науковий керівник – професор В.П. Поліщук.

термін «раса» замінили назвою «порода» з прикметою аборигенна. За цією ознакою термін відрізняє бджіл від заводських порід сільськогосподарських тварин як штучно виведених нових форм. У бджільництві не існує селекційного продукту у вигляді породи як результату багаторічної роботи з поліпшення і змін виду *Apis mellifera*.

Традиційний розподіл бджіл на породи здійснюється з обов'язковим дослідженням їх екстер'єрних ознак. Для визначення чистопородності бджіл застосовується метод, розроблений В.В. Алпатовим [1]. Автор використовував такі ознаки екстер'єру, як кубітальний індекс, проміри частин ніжок, жилкування крил, які набули визнання на міжнародному рівні. У 1964 році для ідентифікації бджіл районованих порід в Україні почали використовувати ознаку дискоїдального зміщення [12]. Пізніше метод Алпатова був удосконалений [4, 6].

В нашій країні районованими, широко розповсюдженими і рекомендованими до використання вважаються дві породи бджіл із запозиченими з латині назвами – українська (*Apis mellifera acervorum* або *Apis mellifera sossifera* Engel) і карпатська (*Apis mellifera carpatica*). За даними багатьох авторів характеристика морфологічних та етологічних властивостей бджіл названих порід незначно відрізняється. Це пояснюється впливом на формування їх генофонду, можливо, спільної предкової форми – *Apis mellifera carnica* (карніка або крайнська порода бджіл) та частковою взаємною метизацією, що історично відбувалася в післявоєнні 40-ві роки ХХ століття для поновлення чисельності знищених бджолосімей української породи, а пізніше – внаслідок безконтрольного завезення маток іншої породи на пасіки для отримання нетривалого гетерозисного ефекту нащадків [4]. Згідно з систематизованим матеріалом, викладеним у табл. 1, використання традиційних морфометричних методів при зарахуванні бджолиних сімей до певної породи ускладнюється тим, що показники деяких ознак порід є однаковими або близькими в межах їх стандартів, наприклад, довжина хоботка, колір медової печатки, дискоїдальне зміщення, тощо. Щодо визначення

певних особливостей структурних одиниць породи (внутріпородних типів, ліній, генеалогічних груп) навіть використання додаткових досліджень продуктивних ознак, ферментативної активності, особливостей поведінки не завжди допомагає у вирішенні цієї проблеми.

1. Морфометричні та етологічні характеристики бджіл української та карпатської порід [6]

Ознака	Порода бджіл		
	українська (в середньому)	«Хмельницький» тип української породи	карпатська
Довжина хоботка, мм	6,3-6,6	6,4-6,6	6,4-6,7
Кубітальний індекс	2,2-2,5	2,18-2,62	2,4-2,6
Форма заднього краю воскового дзеркальця п'ятого стерніту	Випукла у 75–90% випадків	Випукла у 64–96% випадків	Випукла 100%
Дискоїдальне зміщення	70–90 % позитивних випадків	Не менше 80 % позитивних випадків	Не менше 80 % позитивних випадків
Печатка меду	Біла	Біла	Переважно біла
Забарвлення тіла	Сіре, інколи з жовтими кільцями черевця, темно-сіре	Сіре, з білуватими кільцями черевця	Сіре, сріблясте опушення тергітів
Поведінка бджіл під час огляду гнізда	Помірно агресивні	Помірно агресивні	Спокійні
Схильність до роїння	Помірна	Помірна	Слабка (5–6 % сімей)

Мета дослідження – проведення генетичної характеристики представників української та карпатської порід методом полілокусного ДНК-типування із застосуванням двох маркерних систем – RAPD [15], ISSR [14], з паралельною оцінкою їх за ознаками екстер'єру. Ці технології дозволяють

визначати генотип біологічного об'єкту за десятками локусів одночасно лише за використання одного праймера, однак без визначення хромосомної локалізації отриманих ДНК-фрагментів [3]. Методична різниця цих маркерних систем полягає лише у відмінностях температури специфічної «посадки» праймерів на геномну ДНК і структурі самих праймерів. Після проведення реакції ПЛР-ампліфікації і електрофоретичного розділення продуктів синтезу отримують надзвичайно поліморфні спектри смуг – ДНК-фінгерпринти. Порівняння структури останніх і є основою проведення генетико-популяційної характеристики об'єктів дослідження.

Для проведення генетичної міжпородної характеристики відібрали робочих бджіл від п'яти сімей (по 25 особин) популяції бджіл Хмельницького типу української породи, завезених в Київську область із плембджолорозплідника «Прибузькі медобори» Летичівського району Хмельницької області та бджіл п'яти сімей з матками карпатської породи.

Аналітична частина досліду виконана в лабораторії генетики Інституту свинарства НААН України. Методичні аспекти визначення генотипу бджіл в техніці RAPD, ISSR та особливості проведення популяційного аналізу отриманих даних докладно описані в попередніх роботах [8].

Відбирання матеріалів для дослідження із визначення біоморфологічних показників проводили відповідно до методичних вказівок [12]. Препарували 25 бджіл від кожної з 20 сімей (10 української породи і 10 карпатської) праве переднє крило, хоботок і п'ятий стерніт черевця. Вимірювання частин екзоскелета здійснювали під бінокулярним мікроскопом МБС–10 за допомогою лінійки окуляр-мікрометра при 16-кратному збільшенні [2] в лабораторії кафедри бджільництва Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Результати досліджень чистопородності бджолиних сімей, що використовуються для отримання маточного молочка, наведені в табл. 2.

Зокрема, за норму для бджіл української породи вважали довжину хоботка 6,4–6,6 мм, яка зменшує вірогідність присутності ознак сірої гірської

2. Зведені дані комплексної оцінки сімей різних порід бджіл за ознаками екстер'єру, відібраних з пасіки ФГ „Медові поля”

Номер сім'ї	Довжина хоботка, мм		Кубітальний індекс		Дискоїдальне зміщення		Форма заднього краю воскового дзеркальця	
	M±m	порівняно з стандартом	M±m	порівняно з стандартом	кількість позитивних випадків, %	порівняно з стандартом	кількість випуклих випадків, %	порівняно з стандартом
Українська, n=10								
41	6,4±0,02	+	2,33±0,05	+	92	+	96	+
43	6,4±0,02	+	2,32±0,08	+	96	+	84	+
44	6,45±0,03	+	2,51±0,07	+	92	+	88	+
45	6,42±0,02	+	2,43±0,06	+	72	+	84	+
47	6,55±0,02	+	2,47±0,06	+	96	+	88	+
48	6,51±0,02	+	2,53±0,06	+	88	+	96	+
49	6,56±0,02	+	2,43±0,05	+	96	+	84	+
50	6,47±0,03	+	2,48±0,06	+	96	+	84	+
46	6,47±0,02	+	2,37±0,07	+	84	+	88	+
42	6,49±0,02	+	2,39±0,08	+	100	-	96	+
Карпатська, n=10								
67	6,57±0,02	+	2,63±0,03	+	96	+	100	+
73	6,49±0,04	+	2,36±0,06	+	80	+	100	+
66	6,58±0,02	+	2,62±0,06	+	76	+	100	+
70	6,55±0,04	+	2,66±0,12	+	92	+	100	+
61	6,53±0,02	+	2,57±0,04	+	92	+	96	+
63	6,49±0,03	+	2,65±0,05	+	96	+	96	+
64	6,49±0,03	+	2,55±0,11	+	96	+	100	+
65	6,50±0,05	+	2,66±0,12	+	88	+	100	+
68	6,48±0,04	+	2,59±0,10	+	96	+	96	+
69	6,54±0,02	+	2,46±0,06	+	96	+	84	+

кавказької породи (довжина хоботка не більше 6,7 мм) та небажане укорочення (менше 6,3 мм) зважаючи на їх господарську цінність. Одержані дані підтверджують, що всі досліджені сім'ї за довжиною хоботка (6,40–6,56 мм) мали чітко виражену відповідність типовим параметрам стандарту української породи, довжина хоботка у карпатських бджіл змінювалася в межах 6,48–6,58 мм (стандарт 6,4–6,7, типові показники 6,5–6,6 мм).

Середня величина кубітального індексу в піддослідних сімей української породи становила 2,33–2,53, карпатської – 2,36–2,66. Тобто з досліджених сімей (10) української породи вимогам (2,2–2,5) стандарту відповідали всі, а 30% сімей карпатської породи мали показники дещо вищі – 2,65–2,66 за стандарт (2,4–2,6).

При вимірюванні дискоїдального зміщення і форми заднього краю воскового дзеркальця п'ятого стерніта встановлено, що 70–90% українських бджіл відповідно до вимог стандарту породи характеризувалися позитивним дискоїдальним зміщенням. Це є типовим для породи у 90% досліджених сімей. Лише сім'я № 42 мала 100% позитивних випадків дискоїдального зміщення, що характерно для карпатської породи. У карпатських бджіл 80% досліджуваних сімей відповідали вимогам стандарту (не менше 80% позитивних випадків), лише в сім'ях 73 і 66 спостерігали несуттєве відхилення від нього.

За формою заднього краю воскового дзеркальця п'ятого стерніта всі бджоли сімей української породи відповідали стандарту (75–96% випуклих), а сім'ї 61, 63, 68, 69 карпатської породи мали нехарактерну форму воскового дзеркальця – (96 та 84%), лише 60% сімей відповідали стандарту – 100% випуклих випадків. Сім'ї обох груп належать до чистопородних.

У результаті проведення ДНК-типування сімей української та карпатської порід доведена їх певна своєрідність за основними популяційно-генетичними параметрами (табл. 3).

3. Популяційно-генетична характеристика порід бджіл на основі маркерів полілокусного типування RAPD, ISSR

Показник	Порода бджіл		
	українська, Хмельницький тип (контроль)	карпатська (дослід)	різниця (контроль–дослід)
Середня кількість виявлення бендів	45,4000	41,6000	– 3,8000
Середня кількість обстежених локусів	38,4293	30,9372	– 7,4921
Рівень внутрігрупової схожості	0,7641	0,7146	– 0,0493
Стандартний ступінь гетерозиготності	0,1814	0,2630*	+ 0,0816
Ефективна кількість алелей на локус	1,8476	1,9431*	+ 0,0955
% поліморфних локусів	0,2714	0,4231**	+ 0,1517

Примітка: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$

Так, за рівнем внутрігрупової схожості бджоли української породи виявилися більш гомогенними – 0,7641 проти 0,7146 у представників карпатської породи. Краща відселекціонованість і генетична консолідованість сімей Хмельницького типу української породи підтверджується значенням стандартної гетерозиготності, яка була в них вірогідно нижчою – 0,1814 ($p \leq 0,05$) проти 0,2630 у представників карпатської популяції. Наявність високого ступеня селективного тиску на бджолосім'ї Хмельницького типу підтверджується показником поліморфних локусів, виявлених ДНК-тестуванням – 27,14% проти 42,31 у бджіл карпатської породи (різниця вірогідна ($p \leq 0,01$)).

Проведення чіткої молекулярно-генетичної межі між українською і карпатською породою навіть із застосуванням високоінформативних, поліморфних, полілокусних маркерів у техніці RAPD та ISSR було дещо проблематичним, оскільки лише за використання RAPD праймера ОРА–4 виявили мономорфний фрагмент розміром 930 п.н. у бджіл української

породи, не знайдений в сімей карпатської. Проте так звані відносні маркерні смуги були виявлені за рештою використаних в експерименті праймерів (табл. 4). Так, смуга довжиною 410 п.н., що виявлялася із застосуванням RAPD праймера OPA-4 із частотою 60% була відсутня у бджіл карпатської породи. ДНК-фрагмент розміром 880 п.н. за цією ж генетичною системою зустрічався з частотою 60% в карпатській популяції при повній його відсутності в української, а смуга з молекулярною масою 700 п.н. зустрічалася у 80% карпатських бджіл за її наявності лише у 20% бджіл української породи ($p \leq 0,01$). RAPD праймер B-15 дозволив виявити по дві маркерні смуги внаслідок генотипування бджолосімей української (1000, 630 п.н.) та карпатської (1050, 450 п.н.) порід. Застосування декануклеотиду RAPD OPA-1 в полімеразній ланцюговій реакції з ДНК бджіл порівнюваних порід дозволило встановити один маркер для української популяції розміром 1160 п.н та три маркерних фрагмента для карпатських сімей (1200, 980, 320 п.н), вірогідність різниці в частотах зустрічання названих смуг в особин різних порід була здебільшого незначною ($p \leq 0,05$). Система міжмікросателітного аналізу ISSR із заякореним тринуклеотидним праймером S1 проявила себе як малоінформативна для порівняння в межах обраних двох порід, оскільки вони різнилися лише за частотою фрагмента в 520 п.н, що був відсутнім у карпатських бджіл і виявлявся лише у особин української породи з частотою 40% ($p \leq 0,05$).

Безпомилково відокремити одну породу від іншої можна лише за абсолютними генетичними маркерами, притаманними лише особинам однієї породи із 100%-вим їх розповсюдженням у межах кожної структурної одиниці породи. На жаль, тільки один праймер OPA-4, використаний в техніці RAPD дозволив виявити такий ДНК-фрагмент у бджіл української породи, що безперечно вимагає розробки інформативніших генетичних систем, проведення додаткового наукового пошуку оптимальних ПЛР-зондів (праймерів), розширення досліджуваної вибірки

4. Наявність маркерних алелів у представників української степової і карпатської порід бджіл за трьома праймерами RAPD і одним ISSR

Наявність маркерних смуг	Українська порода		Карпатська порода	
	молекулярна маса, п.н	частота зустрічання	молекулярна маса, п.н.	частота зустрічання
Абсолютні маркери, RAPD праймер OPA-4	930	1,000***	-	0,000
Відносні маркери, RAPD праймер OPA-4	880	0,000	880	0,600**
	700	0,200	700	0,800**
	410	0,600*	410	0,000
Відносні маркери, RAPD праймер B-15	1050	0,000	1050	0,600**
	1000	1,000***	1000	0,200
	630	0,600	630	0,200
	450	0,000	450	0,400*
Відносні маркери, RAPD праймер OPA-1	1200	0,000	1200	0,600**
	1160	0,400*	1160	0,000
	980	0,000	980	0,400*
	320	0,000	320	0,400*
Відносні маркери, ISSR праймер S1	520	0,400*	520	0,000

Примітка: розміри маркерних смуг для досліджуваних порід виділено жирним шрифтом: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ *** – $p < 0,001$ порівняно з контролем

бджіл із залученням до аналізу більшої кількості популяцій різних географічних зон. Незважаючи на неспроможність обраних полілокусних систем у виявленні контрастних генетичних особливостей порід, обрані ДНК-маркери показали придатність до характеристики ступеня селективного тиску в досліджуваних популяціях, дозволили визначити низку алелів, частота яких вірогідно різнилася у представників двох порід. Робота з пошуку ДНК-

маркерних систем для генетичної паспортизації порід бджіл триває, а існуючі напрацювання в цьому напрямі дозволяють скласти оптимістичний прогноз щодо вирішення цього питання (дані не опубліковані).

Висновки

Сім'ї української і карпатської порід за морфометричними показниками відповідають стандарту породи. Середні дані промірів бджіл, відібраних проб, є типовими за довжиною хоботка (6,4–6,6 мм – українська та 6,4–6,7 мм – карпатські), показником кубітального індексу (2,2–2,4 мм – українська та 2,4–2,6 мм – карпатська), рисами дискоїдального зміщення і форми заднього краю воскового дзеркальця п'ятого стерніта.

Проведення чіткої молекулярно-генетичної межі між українською і карпатською породою навіть із застосуванням високоінформативних, поліморфних, полілокусних маркерів у техніці RAPD та ISSR виявилось дещо проблематичним, оскільки лише за використання RAPD праймера OPA-4 був виявлений мономорфний фрагмент розміром 930 п.н. у бджіл української породи, якого не було у представників карпатської.

Тому, результати проведеної роботи можна вважати лише кроком до вирішення складної і нагальної проблеми визначення генетичних особливостей породи – ДНК-паспортизації. Створення генетичних паспортів і постійний моніторинг генофонду *Apis mellifera* дозволить не лише раціонально використовувати цінний племінний матеріал, але й інтенсифікувати селекційну роботу з окремими чистопородними популяціями, припинити процеси небажаної метизації з метою збереження унікальних аборигенних порід.

Список літератури:

1. Алпатов В.В. Породы медоносной пчелы / В.В. Алпатов. – М.: МОИП, 1948. – 183 с.
2. Алпатов В.В. Породы пчел и красный клевер / В.В. Алпатов // Пчеловодство. – 1946. – № 10. – С. 17–23.

3. Банникова А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих / А.А. Банникова // Журнал Общей биологии. – 2004. – Т. 65, №4. – С. 278–305.
4. Биладш Г.Д. Селекция пчел / Г.Д. Биладш, Н.И. Кривцов. – М.: Агропромиздат, 1991. – 183 с.
5. Гиниятуллин М.Г. Комплексное использование пчелиных семей / М.Г. Гиниятуллин, А.М. Ишемгулов. – Уфа: АДИ, 2001. – 120 с.
6. Давыденко И.К. Ускоренный метод оценки чистопородности медоносных пчел / И.К. Давыденко, Г.Д. Мыкитенко, С.А. Челак // Респ. межвед. тем. науч. сб.: Пчеловодство. – К.: Урожай. – 1984. – Вып. 16. – С. 12–15.
7. Кожевников Г.А. Современное состояние вопроса о породах пчел / Г.А. Кожевников // Пчелопольное хозяйство. – Москва, 1916. – Вып. 2. – С. 5–15.
8. Метлицька О.І. Оптимізація методу ДНК-фінгерпринтингу геному бджіл / О.І. Метлицька / Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – Київ, 2009. – Вип. 138. – С. 282–287.
9. Методичні рекомендації з оцінювання чистопородності бджіл та створення внутрішньопородного типу / [В.П. Поліщук, І.І. Головецький, О.І. Метлицька, В.В. Скрипник]. – К.: Астон, – 2009. – 20 с.
10. Методические указания по контролю чистопородности медоносных пчел, определению пыльцевой продуктивности и содержания воска в прополисе / [Давыденко И.К., Полищук В.П., Черкасова А.И.]. – М.: Всесоюзная академия сельскохозяйственных наук им. В.И. Ленина, 1985. – 11 с.
11. Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н.А. Плохинский. – М.: Колос, 1969. – 137 с.
12. Goetze G. Die Honigbiene in natuerlicher und kunstlicher Zuchtauslese. Teil 1 und 2 / G. Goetze. – Humburg und Berlin, 1964. – 212 s.

13. Ruttner F. Biogeography and of Honeybees / F. Ruttner. – Germany: Springer–Verlag. Berlin, – 284p.

14. Zietkiewicz E. Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reactin amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafłski, D. Labuda // Genomics. – V. 20. – 1994. – P. 176–183.

15. Williams J. DNA polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers systems / J. Williams, A. Kubelik, K. Livak, J. Rafalski, S. Tingey // Nucleic Res. – 1990. – N 18.– P.6231–6235.

Молекулярно-генетические особенности пчел украинской и карпатской пород в сравнении с признаками их экстерьера

О.І. Метлицка, кандидат сельскохозяйственных, В.П. Полищук, доктор сельскохозяйственных наук, профессор, А.В. Выдрик, аспирантка.

Проведены молекулярно-генетические исследования представителей украинской и карпатской пород пчел методом полилокусного ДНК-типирования с применением двух маркерных систем – RAPD, ISSR. Установлено, что за использование RAPD праймера OPA-4 был обнаружен мономорфный фрагмент у пчел украинской породы, который отсутствует у представителей карпатской. Показаны межпородные отличия отобранных семей, для опыта, по основным породным признакам экстерьера, который также подтверждается методом ДНК-типирования.

Ключевые слова: *порода пчел, экстерьерные признаки, ДНК-типирование, генетический маркер, фингерпринтинг, локус, полиморфизм, праймер, микросателлиты.*

Molecular-genetic features of bees of the Ukrainian and Carpathians breeds by comparison to the signs of their exterior attributes

O. Metlitska, candidate of agricultural, V. Polischuk, doctor of agricultural sciences, professor, A. Vydrik, .

Molecular genetic researches of representatives of the Ukrainian and Carpathians breeds of bees are conducted by the method of polilocusing of DNA-typing with application of two systems of markers - RAPD, ISSR. It is set that for the use of RAPD of primer of OPA-4 was found out a monomorfniy fragment for the bees of the Ukrainian breed, which is absent for the representatives of Carpathians. The differences of the selected families are shown, for experience, on the basic signs of pedigrees of exterior which is also confirmed the method of DNA-typing.

Keywords: *breed of the bees, exterior attributes, DNA-typing, a genetic marker, fingerprinting, a locus, polymorphism, primer, microsatellites.*