

## ГЕНЕТИЧНІ КРИТЕРІЇ ЧИСТОПОРОДНОСТІ І ОСОБЛИВОСТІ ПОПУЛЯЦІЙНОЇ СТРУКТУРИ БДЖІЛ УКРАЇНСЬКОЇ ПОРОДИ

О.І. Метлицька, кандидат сільськогосподарських наук  
Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН України  
В.П. Поліщук, доктор сільськогосподарських наук  
І.І. Головецький, О.М. Лосєв кандидати сільськогосподарських наук  
Національний університет біоресурсів і природокористування України

*Застосування інформативних молекулярних маркерів за технологій RAPD, ISSR та ПДРФ мтДНК дозволило уточнити еволюційне середземноморське (гілка С) походження українських бджіл у системі класифікації виду *Apis mellifera*, встановити особливості їх популяційно-генетичної структури порівняно з бджолами інших порід. Розроблений метод ДНК-паспортизації популяцій українських бджіл на основі встановлених генетичних критеріїв чистопородності.*

**Ключові слова:** *порода, ДНК-маркер, локус, генетична схожість, гетерозиготність, генетична дистанція, генетичний поліморфізм.*

Знання про породи бджіл є одним із сучасних розділів, що розширюють уявлення про найцінніший вид комах і спонукають до глибшого усвідомлення великої ролі прямого та опосередкованого впливу їх запилювальної діяльності на відтворення ентомофільних рослин і виробництво продовольчої продукції для людини. Як і в інших галузях тваринництва, у бджільництві суттєва увага приділяється породним ресурсам бджіл, раціональне використання яких у відповідних природно-кліматичних і медозбірних умовах забезпечує приріст одержуваних продуктів і збалансовує багатогранні зв'язки в живій природі.

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 Ф.Руттнера наприкінці 90-х років минулого сторіччя було виділено 24 підвиди бджоли медоносної, яких

назвали расами. Таку назву зазвичай можна зустріти в зарубіжних літературних джерелах. Проте в колишньому Радянському Союзі, рішенням Міністерства сільського господарства термін «раса» замінений назвою «порода». За цією назвою характеристика бджіл зустрічалась у спеціальній літературі ще до офіційного затвердження плану районування порід. Поняття «порода бджіл» набуло поширення після видання однойменної монографії В.В. Алпатова (Породы медоносной пчелы, 1948), високо оціненої в міжнародній федерації бджолярів Апімондії [1].

В нашій країні районованими, широко розповсюдженими і рекомендованими до використання є дві породи бджіл – українська (*Apis mellifera sossimai Engel* або *Apis mellifera acervorum Scor*) і карпатська (*Apis mellifera carpathica*). Проте на приватні пасіки часто завозили бджіл сірої гірської кавказької породи (*Apis mellifera caucasica*) як з метою чистопородного розведення, так і отримання міжпородних помісей від схрещування названих порід. За даними багатьох авторів, характеристика морфологічних та етологічних властивостей бджіл районованих порід незначно відрізняється, що пояснюється впливом на формування їх генофонду через поширення на схід спільної предкової форми – *Apis mellifera carnica* (карніка або крайнська порода бджіл) та частковою взаємною метизацією, що інтенсивно відбувалася в післявоєнні роки.

Українські бджоли є найпоширенішою породою в нашій країні і належать до групи аборигенних порід європейського походження, займаючи Лісостепову та Степову зони [2-4].

За межами природного ареалу великий масив українських бджіл створили переселенці в Приморському краї Росії. Сільські господарі з України привезли їх туди вперше в 1890 р. Потім потік бджолиних сімей посилювався і українська порода, як зазначає Г.Д. Билаш та М.І Кривцов [1], стала основою формування далекосхідних бджіл. Науковий аналіз породного складу бджіл Примор'я в сучасний період підтвердив ідентичність їх українській породі на великих територіях. Саме там на багатих ресурсах нектару під час цвітіння липи прояви-

лась їх найбільша продуктивність на сильних взятках у сучасний період – 30 кг за день, що є чи не найвищим у світі серед усіх порід бджіл.

У себе на батьківщині українські бджоли залишались основною породою господарського використання та об'єктом різнобічних досліджень. Проте їх породна ідентичність і структурованість на сформовані історичним розвитком популяції були з часом порушені. Починаючи з 1944-1945 рр. в Україну для відновлення зруйнованої війною галузі стали завозити бджіл іншого походження, переважно порід кавказької групи. Друга хвиля змішування бджіл в ареалі української породи була зумовлена рекомендаціями наукових установ щодо доцільності розведення помісей для підвищення медової продуктивності сімей. Але при схрещуванні місцевих бджіл із запропонованими сірими гірськими кавказькими та карпатськими не дотримувались відповідних методик. На пасіках з'явилися помісі бджіл невідомих поколінь від хаотичного схрещування в місцевих умовах. Вони розводяться «в собі» упродовж десятків років донині [5, 6].

Вперше стисла за формою і широка за змістом характеристика українських бджіл була надана В.А. Нестерводським у його підручнику пасічництва [7]. Він показав їх цінні біологічні властивості та відзначив інтерес до них зарубіжних авторів. Досліджуючи бджіл у різних регіонах України, вчений доповнив їх характеристику відзначаючи добру пристосованість до місцевих умов і переваги господарської цінності порівняно з південними бджолами і виділив у породі три популяції.

В його працях зазначено, що українська бджола жвава, енергійна, працююча, мало роїться порівняно з південною, далеко літає за поживою і тому продуктивніша. Вона дуже обережно вилітає, то ж її мало втрачається й сім'ї, не знесилюються в прохолодну пору. Вошину будує гарно, мед закриває рівною, білою мов сніг покрешкою, тому стільниковий мед має чудовий вигляд. Матки дуже плодючі й розплід у них безперервний, тож сім'ї швидко стають сильними і відпускають ранні рої. На жаль, подальші дослідження популяцій українських бджіл з розгортанням постійної селекційної роботи з

[Type text]

породою систематичного характеру не набули.

Довгий час українських бджіл вважали південною гілкою середньоросійських бджіл і назвали їх степовими [6]. У відомій праці В. В. Алпатов степовою називав не українську породу бджіл, а зону, де вона була на той час розповсюджена. Він виділив їх у самостійну породу і закріпив назву українська [8]. За відсутності в той час генетичної характеристики бджіл некоректність ідентифікації української породи залишилась дотепер.

У 1975 році В.О. Губін висловив припущення, що українські бджоли є одним з найбільш змінених екотипів підвиду *Apis mellifera carnica* за деякими морфологічними ознаками і характером поведінки. Він вважав українських бджіл одним із підвидів карніки як п'яту популяцію (поряд з альпійською, карпатською, батанською та македонською) і навіть пропонував надати їй назву *Apis mellifera carnica* var. *Ucrainica* [4].

За результатами досліджень І.О. Левченка українські бджоли відрізняються від інших порід за циклами мобілізаційних танців, реагування на цукристість корму, впливу факторів, що зумовлюють активність льоту [9].

Результати досліджень багатьох авторів свідчать про те, що за чисельними господарсько-корисними, особливо біологічними ознаками, між українськими і крайнськими та карпатськими бджолами різниця вірогідна. Наведені багаточисленні дані дозволяють зробити висновок, що українські бджоли, які сформувались в конкретних природно-кліматичних умовах, є справді окремою породою бджіл [10].

На жаль, в останні десятиріччя українські бджоли зазнали сильного впливу при завезенні кавказької і карпатської порід, що значно ускладнює ведення селекційної роботи [11, 12]. На багатьох пасіках степової і лісостепової зон України розводяться помісні сім'ї невідомих поколінь. Вони менш продуктивні, частіше хворіють на нозематоз, більш схильні до роїння, гірше зимують, ніж чистопородні українські, що в кінцевому результаті негативно впливає на галузь бджільництва загалом [13].

Українські бджоли становлять цінний генофонд для селекційної роботи, тому потребують належної уваги щодо збереження в чистоті. Наслідки широкомасштабного безсистемного схрещування порід у виробничих умовах переконують у необхідності перегляду концепції методів розведення в цій галузі. Підтверджується наукове положення про те, що в основі вдосконалення порід бджіл лежить чистопородне розведення. Стихійне «поглинання» чи «прилиття крові» в наявних осередках чистопородних бджіл загрожує зникненням популяцій з унікальними генотипами, сформованими природним добром. Тому збереження чистопородних бджолиних сімей української породи, відбір і розмноження селекційного матеріалу на основі науково обґрунтованих положень є актуальною проблемою.

Визначення породної належності бджіл за особливостями екстер'єру, фізіології, етології та показниками господарської цінності сімей при наявності в ареалі особин помісного походження потребує уточнення їх показників на основі розробки нових методів досліджень, оскільки спостерігається широке варіювання ознак бджіл у межах однієї породи, популяції і навіть нащадків однієї матки. Для пасік лісостепової і степової зон України важливою проблемою є збереження чистопородного матеріалу корінної породи від впливу сірих гірських кавказьких і карпатських бджіл.

Таким чином, ареал поширення українських бджіл охоплює велику територію, яка поділяється на окремі зони з характерними для них особливостями природно-кліматичних умов. Відповідно і бджоли, які населяють цю територію, мають свої особливості, набуті в процесі тривалого пристосування до певних умов існування. Тому селекційна робота з українською породою має бути спрямована на виявлення та репродукцію нових популяцій, створення внутрішньопородних типів для селекційного поліпшення і підвищення продуктивності сімей.

Для досліджень, пов'язаних з добром і використанням чистопородних сімей українських бджіл, створенням внутрішньопородних типів, ефективними

виявляються методологічні заходи, що ґрунтуються на застосуванні ДНК-технологій.

**Методика досліджень.** Проведені дослідження спрямовані на створення інформативних систем ДНК-типування геному бджіл, що дозволяють визначити генетичний поліморфізм на міжпородному рівні для встановлення критеріїв чистопородності, характеру міжпородної диференціації та усунення негативних наслідків метизації генофонду в ареалі бджіл української породи. Для вирішення поставленого завдання було необхідно провести:

а) методичну оптимізацію процедури виділення ДНК із імаго робочих бджіл;

б) встановити нуклеотидну структуру ISSR-праймерів, придатних для дослідження генетичного поліморфізму на міжпородному рівні

в) експериментально визначити оптимальний режим ампліфікації фрагментів генетичних локусів бджіл, розташованих між інвертно орієнтованими послідовностями мікросателітних праймерів;

с) здійснити молекулярно-генетичне типування бджіл за COI-COII міжгенним локусом мітохондріальної ДНК (мтДНК) та RAPD, ISSR маркерами, придатними для оцінки генетичної мінливості *Apis mellifera*.

Для досліджень відбирали імаго робочих бджіл в кількості по 25 особин-представників різних сімей української, карпатської та сірої гірської кавказької порід. Виділення ДНК проводили сорбентним методом із застосуванням комерційного набору «ДНК-Сорб В» («Амплісенс», Росія, Москва) у власній модифікації. Для здійснення реакцій ампліфікації геномної та мтДНК бджіл використовували стандартний комерційний набір «Тапотілі» (НДІ Генетики РАН, Москва, Росія). Склад реакційної суміші та температурний режим ампліфікації геномної ДНК бджіл в технологіях полілокусного типування докладно описано в попередніх власних [11, 14, 15] та оригінальних [16, 17] публікаціях. Синтез праймерів, розроблених компанією «Оперон» для RAPD аналізу (США), ISSR зондів власного дизайну та олігонуклеотидів до ділянки COI-COII мтДНК був проведений фірмою «Fermentas» (Вільнюс, Латвія).

[Type text]

Нуклеотидний склад використаних в роботі праймерів, кодові позначення та температура випалювання наведені в табл. 1.

Електрофоретичне розділення одержаних ампліконів у фінгерпринтних технологіях здійснювали в 1,5%-вих агарозних гелях в однократному TBE буфері, ідентифікацію ДНК-фрагментів міжгенного локусу COI-COII мтДНК проводили в 8%-вих поліакриламідних гелях [18]. Забарвлення гелів виконували за допомогою розчину бромистого етидію, гелі оглядали після багаторазової відмивки бідистильованою водою під УФ-світлом на транслюмінаторі, фотодокументацію здійснювали за допомогою цифрового апарату «Canon». Контроль за розмірами продуктів ампліфікації проводили за використання маркера молекулярної маси 1 kb- Ladder plus (Fermentas, Латвія).

1. Нуклеотидна структура, температурний режим специфічної посадки та GC вміст праймерів, використаних у роботі

Праймер	Структура праймера	% GC	Температура випалювання
1.OPA-1	3'- CAG GCC CTT C -5'	70	36
2.OPA-4	3'- AAT CGG GCT G -5'	60	36
3.B15	3'- GGA GGG TGT T -5'	60	36
4.S1	3'-AGC AGC AGC AGC AGC AGC C-5'	68,42	57
5.S2	3'-AGC AGC AGC AGC AGC AGC G-5'	68,42	57
6.S4	3'-CT CT CT CT CT CT CT G-5'	52,94	57
7.S7	3'- TCG TCG TCG TCG TCG TCG T-5'	63,16	60
8.S9	3'- CA CA CA CA CA CA CA T-5'	47,06	57
9. E2 (F)	3'-GGCAGAATAAGTGCATTG-5'	44,45	57
10.H2 (R)	3'-CAATATCATTGATGACC-5'	35,29	57

Праймери 1-3: RAPD технологія, 3-8: ISSR, 9-10: прямий і зворотний до локусу COI-COII мтДНК бджоли медоносної.

Для визначення характерних ISSR чи RAPD спектрів породи або породної групи виконували три ампліфікації ДНК для кожного з праймерів. ISSR та RAPD профілі відображали на папері з нанесеною міліметровою сіткою у масштабі 1:2 згідно з відстанню в мм між смугами маркера молекулярної маси. Для визначення алельних частот і проведення генетико-популяційного аналізу на основі опрацьованих ISSR-профілів порід створювали матрицю вихідних

даних для їх розрахунку за присутності (1) або відсутності (0) смуги в певному положенні профілю в стандартній комп'ютерній програмі GELSTAT, призначеній для обробки даних полілокусного типування [19].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Генетичні маркери завдяки високому рівню інформативності, поряд із морфометричними підходами, є надійним інструментом дослідження бджоли медоносної. В Україні робота з пошуку молекулярно-генетичних критеріїв чистопородності бджіл трьох порід - *Apis mellifera acervorum*, *Apis mellifera carpathica* та *Apis mellifera caucasica* виконана вперше і заснована на визначенні поліморфізму мітохондріону бджіл методом ПЛР-ПДРФ та ядерної ДНК за використання двох технологій полілокусного типування – RAPD та ISSR.

Першим успішним методичним підходом щодо породної ідентифікації бджіл виявився поліморфізм мітохондріальної ДНК, що встановлюється шляхом рестриктного аналізу ампліфікованих фрагментів – технологія ПЛР-ПДРФ. До теперішнього часу лише обмежена кількість робіт, присвячених пошуку маркерів для популяційної генетики бджоли медоносної, ґрунтується на інших методах аналізу ДНК, а загальна кількість таких молекулярно-генетичних маркерів не перевищує одного десятка.

Основним напрямком використання названих генетичних маркерів є дослідження біогеографії підвидів *A. mellifera* та визначення ступеня інтрогресії не локальних порід у місцевій популяції з метою пошуку природних чистопородних резерватів останніх.

Для породної ідентифікації бджіл, поширених в Україні, та виявлення їх генетичних особливостей був обраний метод ПЛР-ПДРФ міжгенної ділянки цитохром оксидази мтДНК, що виявляється шляхом ампліфікації цього ДНК фрагмента з наступною рестрикцією ендонуклеазою *Dra* I [17].

Міжгенна ділянка COI-COII показує суттєвий поліморфізм, що дозволяє відрізнити породи бджіл, залежно від їх біогеографічного походження за комбінацією утворених рестриктів : *Po* (67/68 bp), *P* (54 bp), *Q* (192-196 bp), що відповідають гаплотипам *PoQ*, *PoQQ*, *PoQQQ*, *PQ*, *PQQ*, *PQQQ* і *Q*. Для

[Type text]



бджіл походження групи А характерним є наявність  $P_0$  фрагмента, групу М характеризує ДНК-фрагмент Р, для бджіл середземноморського походження С властива наявність лише однієї ділянки мтДНК Q (при відсутності Р та  $P_0$ ).

За ПЛР-ПДРФ Dra-I аналізом локусу COI-COII мтДНК бджіл трьох порід – української, карпатської та сірої гірської кавказької – встановлений гаплотип Q у всіх особин досліджуваних сімей, що підтверджує спільність еволюційного походження цих порід з середземноморського регіону (група С).

Відсутність мітохондріальних гаплотипів Р,  $P_0$  та 100% частота гаплотипу Q у бджіл різних популяцій української породи свідчить про їх генетичну гомогенність та відсутність помісних сімей із ознаками середньоросійської породи.

Материнський характер спадкування гаплотипів мтДНК та наявність в ядерному геномі їх копій, так званих генів «numts», не завжди дозволяє встановити ступінь чистопородності популяцій бджіл і тому як додаткові критерії визначення специфіки досліджуваних генофондів є поліморфізм локусів ядерної ДНК.

Перевагою застосування фінгерпринтних технологій RAPD, ISSR перед адресною локус-специфічною ампліфікацією в ПЛР (COI-COII мтДНК) є використання випадкових праймерів довільної структури без використання попередньої інформації про повногеномне секвенування досліджуваних біологічних об'єктів. Одним із недоліків цього молекулярно-генетичного підходу є скринінг значної кількості праймерів з метою визначення їх придатності для вирішення поставлених перед дослідником завдань – визначення ДНК-поліморфізму на міжвидовому, внутривидовому або індивідуальному рівнях.

Відомо, що міжмікросателітний аналіз ISSR є різновидом RAPD-методу, а саме різниця ґрунтується лише на структурі використаного праймеру та температурах випалювання. Так, у технології RAPD середній оптимум температури випалювання декануклеотидних зондів дорівнює  $36^{\circ}\text{C}$ , тоді як ISSR-праймери здійснюють більш специфічну посадку на ДНК-матрицю, що впливає із результатів власних досліджень за температури  $57^{\circ}\text{C}$  з незначними

[Type text]

відхиленнями від встановленої величини. Проведення ампліфікації ДНК в технології ISSR дозволяє одержати набір фрагментів ДНК різної молекулярної маси, які при розділенні методом електрофорезу утворюють фінгерпринтний спектр, а ДНК-фрагмент, що є специфічним для представників певної породи чи внутріпородної групи, може виступати як видоспецифічний (породоспецифічний) маркер. Тому, завдання пошуку маркерів, здатних диференціювати бджіл різних порід у техніці полілокусного типування ISSR, було зосереджене на доборі специфічних праймерів.

Внаслідок проведених нами досліджень обґрунтований методичний підхід щодо встановлення придатності певних праймерів у технології RAPD та ISSR для визначення міжпородних відмінностей бджіл, який ґрунтується на використанні еквівалентних ДНК-сумішей типових представників порід та середнього температурного оптимуму ампліфікаційного режиму.

Встановлено, що оптимальний температурно-часовий режим ампліфікації ДНК геному бджіл в технології ISSR не залежить від типу повторів мікросателітного праймера, його нуклеотидної структури та видової належності біологічного матеріалу [15].

У техніці полілокусного типування було використано три праймери системи RAPD та десять в технології ISSR за результатами їх попереднього випробування і підбору для виду *Apis mellifera*. Із використаних в лабораторних дослідженнях десяти ISSR-праймерів придатними для визначення міжпородного ДНК-поліморфізму бджіл виявилися лише п'ять. Для порівняльного аналізу отриманих даних у роботі було передбачено аналогічні дослідження бджіл контрастної генеалогії. Найбільш інформативними системами для проведення міжпородних порівнянь бджіл є ISSR-S4 із показником маркерного індексу (MI) 3,05 та RAPD-OPA-4 із значенням MI, що дорівнював 4,59. Молекулярно-генетична система, заснована на технології ISSR-ПЛР з праймером S7, незважаючи на низький рівень інформативності (значення маркерного індексу не рівні 1,98 при загальній максимальній кількості охарактеризованих локусів геному бджоли медоносної, що не

[Type text]

перевищувало 17) при визначенні характеру генетичного поліморфізму у бджіл різних порід, виявилася спроможною до ідентифікації абсолютного маркера сірої гірської кавказької породи. В результаті зафіксований мономорфний ДНК-фрагмент з молекулярною масою 800 п.н. , що дозволяє не тільки однозначно віднести особин із 100% частотою цього фрагмента до підвиду *Apis mellifera caucasica*, але й виявити бджолині сім'ї помісного походження в популяціях української та карпатської порід.

Створено методологію генетичної паспортизації порід бджіл із застосуванням фінгерпринтних RAPD, ISSR технологій, що ґрунтується на встановленні абсолютних та відносних маркерів з високою частотою розповсюдження і значущими критеріями відмінності в межах протипованих популяцій. При виборі окремих ДНК-фрагментів як генетичного (відносного, або поліморфного) маркера породи проводили порівняння характеру їх розподілу і лише вірогідне перевищення частоти певної смуги у особин однієї породи, порівняно з іншими, (при вірогідності повторювання результату на рівні  $p < 0,001$ ) слугувало критерієм належності цього ДНК-фрагмента до ідентифікаційного маркера породи.

Завдяки встановленим ідентифікаційним ДНК-маркерам трьох порід бджіл сумарно за 8 полілокусними генетичними системами (3 RAPD та 5 ISSR) були побудовані генетичні формули (табл. 2).

## 2. Генетичні формули бджіл трьох порід, виведені на основі даних молекулярно-генетичного аналізу за використання трьох праймерів RAPD та п'яти ISSR

Порода	Генетичні формули порід
Українська	A <sub>980</sub> A <sub>700</sub> B <sub>720</sub> C <sub>1000</sub> C <sub>630</sub> F <sub>810</sub> F <sub>555</sub> F <sub>430</sub> H <sub>670</sub> H <sub>585</sub>
Карпатська	A <sub>-1145</sub> A <sub>620</sub> A <sub>500</sub> B <sub>1110</sub> F <sub>1110</sub>
Сіра гірська кавказька	A <sub>740</sub> A <sub>-700</sub> A <sub>455</sub> B <sub>-970</sub> B <sub>-930</sub> B <sub>-770</sub> B <sub>-590</sub> B <sub>-485</sub> D <sub>-830</sub> D <sub>570</sub> D <sub>455</sub> D <sub>385</sub> D <sub>350</sub> D <sub>290</sub> D <sub>-240</sub> E <sub>585</sub> E <sub>545</sub> E <sub>530</sub> E <sub>400</sub> E <sub>350</sub> E <sub>300</sub> E <sub>260</sub> <b>G<sub>800</sub></b> H <sub>240</sub>

Примітка: заголовними буквами позначено праймери: А-ОРА-1; В-ОРА-4; С-В15; D-ISSR-S1, E-ISSR-S2, F-ISSR-S4, G- ISSR-S7, H-ISSR-S9, абсолютний маркер виділений жирним шрифтом.

Формула генетичного паспорту кожної породи містить шифри праймерів, позначені буквами із підстрочними індексами – розмірами ідентифікаційних ДНК-фрагментів породи.

Згідно з проведеною ідентифікацією породних маркерів, для бджіл української породи характерними є 10 ДНК-фрагментів, причому більшість з них (3 маркерних ДНК-фрагмента) було виявлено при застосуванні праймера S4 в техніці міжмікросателітного аналізу. Для бджіл карпатської породи встановлено лише п'ять унікальних ДНК маркерів, причому найінформативнішою системою для ідентифікації бджіл карпатської породи від особин української та кавказької порід виявилася технологія RAPD за використання декануклеотидного випадкового праймера OPA-1; кавказької – ISSR S1 та S2, що загалом виявляють 14 ідентифікаційних алелей. В цілому, максимум породоспецифічних маркерів (24), встановлених для бджіл кавказької породи пояснюється їх географічною ізоляцією та мінімізацією впливу на структуру їх генофонду особин української селекції.

Маркер позначений у формулі жирним шрифтом –  $G_{800}$ , встановлений в ISSR-технології з праймером S7, є надійним інструментом ідентифікації чистопородних бджіл кавказької породи та сімей української і карпатської порід помісного походження. При використанні молекулярно-генетичного маркера ISSR-S7 може бути використана обмежена вибірка особин для проведення аналізу без комплексних популяційно-генетичних розрахунків. Проте лише встановлені нами так звані частотні ДНК-маркери (тобто такі, частота яких вірогідно відрізняється в межах досліджуваних популяцій) є придатними у використанні для міжпородної ідентифікації бджіл української та карпатської порід за умов тестування репрезентативних вибірок із кількістю особин в них не менше 25.

Результати генетико-популяційного аналізу трьох порід бджіл за даними полілокусного типування показали, що най контрастнішими за більшістю генетико-популяційних показників, є бджоли української та сірої гірської кавказької породи (табл. 3). Середня кількість фінгерпринтних смуг, виявлених

[Type text]

сумарно внаслідок проведеного ДНК-типування за вісьмома полілокусними системами, у бджіл української породи становить 80,84 проти 69,50 у особин сірої кавказької ( $p < 0,001$ ), значення цього параметра у бджіл карпатської породи дорівнювало 73,71.

### 3. Генетико-популяційний аналіз трьох порід бджіл сумарно за вісьмома полілокусними системами (3 RAPD+ 5 ISSR)

Порода	Генетико-популяційні показники					
	середня кількість смуг	рівень внутрі-групової схожості	гетерозиготність	кількість локусів	відсоток поліморфних локусів	кількість алелей/локус
Українська, n=24	80,84 <sup>***</sup> ±1,4	0,621	0,465 <sup>***</sup>	55,191	0,853 <sup>***</sup>	3,298
Карпатська, n=24	73,71 ±1,7	0,628	0,461 <sup>***</sup>	50,459	0,723 <sup>***</sup>	3,250
Сіра гірська кавказька, n=24	69,50 <sup>a</sup> ±1,7	0,634	0,441 <sup>a</sup>	48,229	0,689 <sup>a</sup>	3,172

Примітка: різниця, порівняно із параметром, позначеним субскриптом, вірогідна за критерієм Фішера: \*\*\* -  $p < 0,001$ . Розрахована середня кількість локусів у межах кожної вибірки

Розрахована очікувана гетерозиготність (або середня генна різноманітність) в популяції бджіл сірої гірської кавказької породи становила 0,441 і була достовірно нижчою ( $p < 0,001$ ), ніж значення цього параметра в особин карпатської (0,461) та української степової порід (0,465), що може бути пояснене помірним інбридингом і заниженою ефективною чисельністю популяцій, використаних у дослідженні. Значення  $F_{st}$  Нея, що ґрунтується на розрахунках очікуваної гетерозиготності популяцій, виступає як характеристика рівня близькоспоріднених схрещувань за аналогією з коефіцієнтом інбридингу. Для вибірок бджіл трьох порід загальне значення цього показника дорівнювало 0,2012, що свідчить про помірний рівень інбридингу, який може бути наслідком заниженої ефективною чисельності окремих популяцій, що були використані в цьому дослідженні (наприклад, бджолині сім'ї з приватних пасік карпатської та кавказької породи, розташовані в Київській області).

[Type text]

При розрахунку індексу генетичної схожості між популяціями бджіл різних порід встановлено, що найбільш генетично подібними є представники української та карпатської порід (0,5781), між бджолами української та кавказької значення індексу становило 0,4565, а карпатські і кавказькі бджоли за коефіцієнтом подібності майже не відрізнялися – 0,4569.

Максимальне значення генетичної дистанції при проведенні аналізу бджіл різного генеалогічного походження встановлене між популяціями сірої гірської кавказької породи (на одній з пасік Київської області) та бджолами української породи хмельницького типу – 0,5840, дещо нижче значення цього параметра спостерігали для українських бджіл типу “Хмельницький” і автохтонних бджіл Кавказу – 0,5654.

Одержані значення генетичних дистанцій між популяціями бджіл різних порід були використані для побудови філогенетичних кладограм у стандартній комп’ютерній програмі MEGA 4 за використання двох алгоритмів побудови кластерів – NJ (найближчого сусіда) та UPGMA (незважений парно-груповий метод).

Дивергенція українських і кавказьких бджіл у ході цього експерименту була доведена шляхом виконання кластерного аналізу з побудовою дендрограм, оскільки досліджувані популяції сірих кавказьких бджіл утворили окремий кластер від бджіл місцевих порід. Проте спільна кластеризація українських та карпатських бджіл, може бути наочним свідченням їх спорідненої філогенії.

Значення показника генетичної диференціації ( $F_{st}$  Лінча) популяцій бджіл української, карпатської та кавказької порід було високим і дорівнювало 0,2595. Таким чином, близько 75% генетичної різноманітності популяцій залежить від внутріпопуляційної компоненти, а 25% припадає на міжпопуляційні складові, що може свідчити про проходження інтенсивних процесів міграції, відсутність повної та тривалої географічної ізоляції (генетичний дрейф) та схожий рівень мутаційних подій. Тобто, ще один популяційний показник є свідченням незначного ступеня генетичних відмінностей між бджолами трьох досліджуваних порід як представників одного виду.

[Type text]

При визначенні критеріїв чистопородності методом ДНК-маркування у встановленні еволюційних зв'язків підвидів *Apis mellifera* в нашому дослідженні одержані перші результати, що пролили світло на характерні генетичні особливості аборигенної бджоли – української породи.

Насамперед було встановлено, що районовані в Україні породи бджіл – українська та карпатська, а поряд з ними сіра гірська кавказька, що найчастіше інтродукується у популяції місцевої бджоли, згідно з встановлених гаплотипів мтДНК належать до еволюційної гілки С, тобто мають єдину предкову форму середземноморського походження. Відсутність в проаналізованих популяціях української бджоли особин з Р гаплотипом мтДНК може однозначно свідчити про відсутність помісних сімей з бджолами середньоросійської породи (*Apis mellifera mellifera*, або темна європейська бджола), а також про безпідставність наукових гіпотез щодо належності українських бджіл до середньоросійської породи як південного відгалуження.

Дійсно, неодноразове обговорення у наукових публікаціях некоректної підвидової таксономії українських степових бджіл як *Apis mellifera acervorum* Scor [20] спрямувало дискусію спочатку до перегляду такої класифікації американським дослідником M.Engel [21], що призвело до появи альтернативної назви бджіл *Apis mellifera sossimai* Engel, а пізніше, завдяки дослідженню ND2 ділянки мітохондріального геному українських бджіл шляхом секвенування, російськими дослідниками була показана генетична тотожність українських бджіл з македонськими [22]. Ильясовим та Ніколенко була запропонована для наукового обговорення інша таксономічна назва – *Apis mellifera macedonica* var. *Ukrainica*, тобто висунута робоча гіпотеза щодо українських бджіл як окремого, відносно ізольованого екотипу македонського підвиду [23]. Проте зауважимо, що для дослідження автори вищезазначеної роботи використали лише три особини робочих бджіл української породи. Безперечно, що секвенційний аналіз на цьому етапі розвитку молекулярної біології і генетики, є найточнішим та надійним, проте існують загальновизнані вимоги статистичних та популяційних методів, згідно з якими мінімально

[Type text]

репрезентативні вибірки не можуть складатися із кількості, меншої ніж 10 особин.

Для підтвердження унікальності української та карпатської породи необхідно утворення природних ізольованих резерватів за умов використання жорсткого морфометричного контролю, молекулярно-генетичних методів ідентифікації чистопородних особин, географічної ізоляції та застосування селекційних методів у напівзакритих популяціях.

Результати проведених досліджень, філогенетичний аналіз та створені генетичні формули трьох порід бджіл можуть бути використані для розробки ефективних заходів щодо раціонального використання та відновлення чисельності автохтонної української степової бджоли, а також є посильним внеском у вирішення окремих питань систематики *Apis mellifera L.*

### **Висновки**

1. У результаті проведених досліджень встановлено, що районовані в Україні породи бджіл – українська, карпатська та сіра гірська кавказька, що найчастіше інтродукується в популяції місцевої бджоли – згідно з встановленими гаплотипами мтДНК, належать до еволюційної гілки С, тобто мають єдину предкову форму середземноморського походження.

2. Відсутність в проаналізованих популяціях української породи особин з Р гаплотипом мтДНК може однозначно свідчити про відсутність помісних сімей з бджолами середньоросійської породи (*Apis mellifera mellifera*, або темна європейська бджола), а також про безпідставність наукових гіпотез щодо українських бджіл як південного відгалуження середньоросійської породи, які можуть бути окремою систематичною структурою відносно ізольованого екотипу македонського підвиду.

3. Одержані дані філогенетичного аналізу бджіл показують, що існуюча застаріла назва української степової породи *Apis mellifera acervorum* Scor потребує перегляду відповідно до нової інформації на молекулярно-генетичному рівні.



4. Розроблені концептуальні основи визначення типових особливостей порід бджоли медоносної на основі ДНК-фінгерпринтингу з використанням поліморфних, але стабільних у межах виду *Apis mellifera*, ISSR та RAPD маркерів та методології їх генетичної паспортизації, що ґрунтується на встановленні абсолютних та відносних маркерів з високою частотою розповсюдження і значущими критеріями відмінності в межах проаналізованих популяцій.

5. Найбільша кількість високоінформативних породоспецифічних маркерів для української породи бджіл виявляється за праймером ISSR-S4, карпатської – RAPD-OPA1 (по три ідентифікаційних ДНК-фрагмента), кавказької – ISSR S1 та S2, що загалом виявляють 14 ідентифікаційних алелей.

6. Абсолютний ДНК-маркер був встановлений лише для бджіл сірої гірської кавказької породи за системою ISSR-S7 з розміром ампліфікованого фрагмента 800 п.н.

7. Для посилення унікальності української степової та карпатської породи необхідне створення природних ізольованих резерватів за умов використання жорсткого морфометричного контролю, молекулярно-генетичних методів ідентифікації чистопородних особин, географічної ізоляції та застосування селекційних методів у напівзакритих популяціях.

8. Результати проведених досліджень, філогенетичний аналіз та створені генетичні формули трьох порід бджіл можуть бути використані для розробки ефективних заходів щодо раціонального використання та відновлення чисельності автохтонної української бджоли.

### **Список літератури**

1. Билаш Г.Д., Породное районирование пчел в СССР /Г.Д.Билаш, Ю.И.Макаров, А.В.Седых //Генетика селекция и репродукция пчел/Международный симпозиум. – Бухарест: Апимондия, 1977. - С. 132-142.

2. Боднарчук Л. І. Програма перспективного розвитку українського бджілітства / Л. І. Боднарчук //Український пасічник. – 2000. – № 11-12.– С. 11-12.

3. Губа П.О. Деякі особливості крайнських бджіл /П.О. Губа //Бджільництво. – К. : Урожай. – 1967. – Вип 3. – С. 26-28.
4. Губин В.А. Наши пчелы в XXI веке / В.А. Губин // Пчеловодство. – 2001. - №1. – С. 14–16.
5. Багрій І. Г. Про родичів українських бджіл / І. Г. Багрій // Науковий вісник Національного аграрного університету. 2006. – Вип. 94. – С. 90–93.
6. Боднарчук Л.І. Селекційна група “Чутівська” українських степових бджіл / Л.І. Боднарчук, Ю.В. Субота, А.Я. Маланчук // Пасіка. – 2006. – № 10.– С. 7.
7. Нестерводський В.А. Пасіка /В.А.Нестерводський/. – К.: Книгоспілка, 1926. – 306 с.
8. Алпатов В.В. Порода медоносной пчелы. /В.В. Алпатов/. – М.: Московское общество испытателей природы, 1948. – 184 с.
9. Макаров Ю.И. Оценка пчелиных семей по комплексу хозяйственно-полезных признаков /Ю.И.Макаров //Технология производства продуктов пчеловодства. – М.: Колос, 1984 – С. 130-134.
10. Багрій І.Г. Про генетичне походження українських бджіл / І. Г. Багрій // Пасіка. – 2006. - №8. – С. 2 – 3.
11. Метлицька О.І. Застосування методів морфометрії та молекулярно-генетичної оцінки при визначенні чистопородності українських бджіл / О. І. Метлицька, В. П. Поліщук, С. І. Таран // Біологія тварин (науково-теоретичний журнал): зб. наук. пр. – Львів : ІБТ НААН України, 2010. – Том 12, №1. – С. 254–259.
12. Програма розвитку галузі бджільництва в Україні до 2011 року /Л.І. Боднарчук // Український пасічник. – 2005. - №12. – С. 30 – 35.
13. Поліщук В.П. Яйценосність бджолиних маток української породи в умовах Степової зони / В.П.Поліщук, В.Д.Іванова, С.І.Таран // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України: зб. наук. пр. – К.: НУБіП України, 2010. – Вип. 145. – С. 228–235.
14. Метлицька О. І. Оптимізація методу ДНК-фінгерпринтингу геному бджіл / О.І. Метлицька // Науковий вісник Національного університету

біоресурсів і природокористування України: зб. наук. пр. – К. : НУБіП України, 2009. – Вип. 138. – С. 282-287.

15. Метлицька О.І. Методичні і прикладні особливості використання ISSR-PCR маркірування внутрішньо- та міжпородної мінливості свиней /О.І.Метлицька // Міжвідомчий тематичний науков. збірник «Розведення і генетика тварин». – 2008.- Вип.42. – С.187–197.

16. Чудинов О.С. Молекулярно-генетические методы дифференциации пород *Apis mellifera* L /О.С.Чудинов //дисс.канд.с.-х. наук: 06.02.01 /О.С. Чудинов.- Рыбное. – 2002. – 139с.

17. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J. M. // *Experientia*.-1993.-V. 49. – P. 1016–1021.

18. Маниатис Т. Молекулярное клонирование /Т.Маниатис., Э.Фрич., Д.Сэмбрук //пер. с англ. под ред. А.А.Баева. – М.: Мир, 1984. – 479 с.

19. 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.

20. Комиссар А.Д. Украинские пчелы /А.Д.Комиссар// Пчеловодство. – 2002. – №4. – С. 12–16.

21. Engel M.S. The taxonomy of recent and Fossil Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) / Engel M.S. // *J.Hym.Res.*-1999.- V.8, №2. – P. 165– 196.

22. Ильясов Р.А. Украинские пчелы *Apis melloifera sossimai* – отдельный подвид или северо-западно- причерноморский екотип *Apis mellifera macedonica*?/ Р.А.Ильясов, А.В.Поскряков, А.Г.Николенко, А.Д.Комиссар // *Апидология и пчеловодство*. – 2007. – Вып.2. – С.12–19.

23. Ильясов Р.А. Новые представления о филогенетике пчелы вида *Apis mellifera* L./ Р.А.Ильясов, А.В. Поскряков, А.Г.Николенко // *Вестник Омского Государственного университета*. – 2009. – С.315–316.

### **Генетические критерии чистопородности и особенности**

[Type text]

## **популяционной структуры пчел украинской породы**

**Метлицкая Е.И., Полищук В.П., Головецкий И.И.**

*Применение информативных молекулярных маркеров в технологиях RAPD, ISSR и ПДРФ мтДНК позволило уточнить эволюционное средиземноморское происхождение (ветка С) украинских пчел в системе классификации вида *Apis mellifera*, установить особенности их популяционно-генетической структуры по сравнению с пчелами других пород. Разработан метод ДНК-паспортизации украинских пчел на основе установленных генетических критериев чистопородности.*

**Ключевые слова:** *порода, ДНК-маркер, locus, генетическое сходство, гетерозиготность, генетическая дистанция, генетический полиморфизм.*

## **Genetical criteria purebred and features of population frame of the Ukrainian breed bees**

**Metlitskaja E.I., Polishchuk V. P., Golovetsky I.I.**

*Implementation of informative molecular-marker in technologies of RAPD, ISSR and RFLP mtDNA has allowed evolutionary Mediterranean parentage (C-branch) the Ukrainian bees in system of classification of kind *Apis mellifera*, to establish features of their population and genetic frame, in comparison with bees of other breeds. The method of DNA-certification of the Ukrainian bees on the basis of the positioned genetical criteria purebred is developed.*

**Key words:** *breed, DNA-marker, locus, genetical resemblance, heterozygosity, genetical distance, genetical polymorphism*