	<p>Zakład Pszczelnictwa w Puławach Pracownia Hodowli Pszczół</p> <p>Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych Pracownia Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin</p> <p>Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach</p>
---	--



Analiza bioróżnorodności wybranych populacji pszczoły miodnej

Opracowanie zbiorowe pod redakcją: dr Dariusz Gerula*

Pozostali autorzy: dr Bogumiła Badek, dr hab. Małgorzata Bieńkowska prof. IO,
dr Beata Panasiuk, mgr Paweł Węgrzynowicz

*autor do korespondencji dariusz.gerula@inhort.pl

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 4.2:**
„Ocena bioróżnorodności owadów zapylających i pożytków pszczelich”

Programu Wieloletniego:
„Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z
uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”
finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Puławy 2016

1. Wstęp

Na drodze ewolucji naturalnej wykształciło się wiele gatunków roślin i zwierząt, tworząc bogactwo życia określane mianem bioróżnorodności. Zasadniczo można wyróżnić trzy poziomy bioróżnorodności: ponadgatunkową, czyli bogactwo ekosystemów i siedlisk, międzygatunkową i wewnątrzgatunkową. W chwili obecnej obserwuje się utratę bioróżnorodności na każdym poziomie, a winę za to przypisuje się bezpośredniej lub pośredniej działalności człowieka. Z punktu widzenia hodowli zwierząt utrata różnorodności wewnątrzgatunkowej jest bardzo istotna, ponieważ prowadzi do uszczuplenia zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich. Bogactwo puli genowej w populacji jest źródłem zdolności adaptacyjnych i gwarantem powodzenia prac hodowlanych. W strefie klimatu umiarkowanego Europy środkowej zapylaczami roślin entomofilnych, są owady z nadrodziny pszczoł (*Apiodea*). Spośród nich gatunkiem o największym znaczeniu gospodarczym jest pszczoła miodna (*Apis mellifera* L.). Pszczoła miodna jest gatunkiem hodowlanym, utrzymywanym głównie w warunkach gospodarstw pasiecznych. Do II Wojny Światowej na większym obszarze Polski obserwowano naturalne występowanie pszczoł rasy (podgatunku) środkowoeuropejskiej *A.m mellifera* L., a na południu kraju również rasy kraińskiej *A. m. carnica* Pollm. W późniejszym okresie prowadzony na szeroką skalę import pszczoł należących do tych samych podgatunków, ale o innych cechach użytkowych jak również innych ras (np. *Apis mellifera caucasica* Gorb.) spowodował stopniowe wypieranie populacji rodzimych. Pszczoły, pierwotnie występujące w Polsce, zostały włączone do programów ochrony zasobów genowych, a ich ochrona jest jednym z priorytetów Krajowego Programu Hodowli Pszczoł. Różne populacje pszczoł różnią się pod względem genetycznym, jak i morfologicznym. Posiadają też różne cechy użytkowe, których przydatność ujawnia się w odpowiednich warunkach klimatyczno-pożytkowych. Ich odrębność można oznaczyć wykonując badania morfometryczne niektórych części ich ciała, oraz wykorzystując bardzo czułe metody molekularne.

2. Cel zadania

Celem badań jest ocena bioróżnorodności hodowlanych populacji pszczoły miodnej poprzez analizę zróżnicowania genetycznego i morfometrycznego.

3. Materiał i metody

a) Analizy molekularne. W 2016 roku do badań zebrano 141 prób pszczoł z rodzin pszczelich rasy kraińskiej, należących do 8 linii hodowlanych. Następnie wyizolowano DNA pszczoł (zestaw EXTRACTME DNA Tissue Kit, DNA-Gdańsk). Jedną rodzinę pszczelą reprezentowały próby uzyskane z pięciu osobników. Do oceny zróżnicowania genetycznego linii hodowlanych na poziomie molekularnym zastosowano metodę SSR- PCR, z użyciem sześciu par starterów mikrosatelitarnych (Solignac i inni 2007): A007, A088, Ap043, Ap103, Ap226, Ap249. Dane przeanalizowano za pomocą programu GenAIEx, w celu wyznaczenia parametrów statystycznych opisujących stopień zróżnicowania lub/i pokrewieństwa genetycznego pomiędzy badanymi liniami hodowlanymi i rodzinami

pszczelimi (analiza wariancji molekularnej AMOVA). Na podstawie otrzymanych wartości dystansu genetycznego przeprowadzono analizę głównych współrzędnych (PCoA – principal coordinate analysis), umożliwiającą graficzne przedstawienie związku pomiędzy zróżnicowaniem molekularnym a odległością genetyczną pomiędzy analizowanymi próbkami.

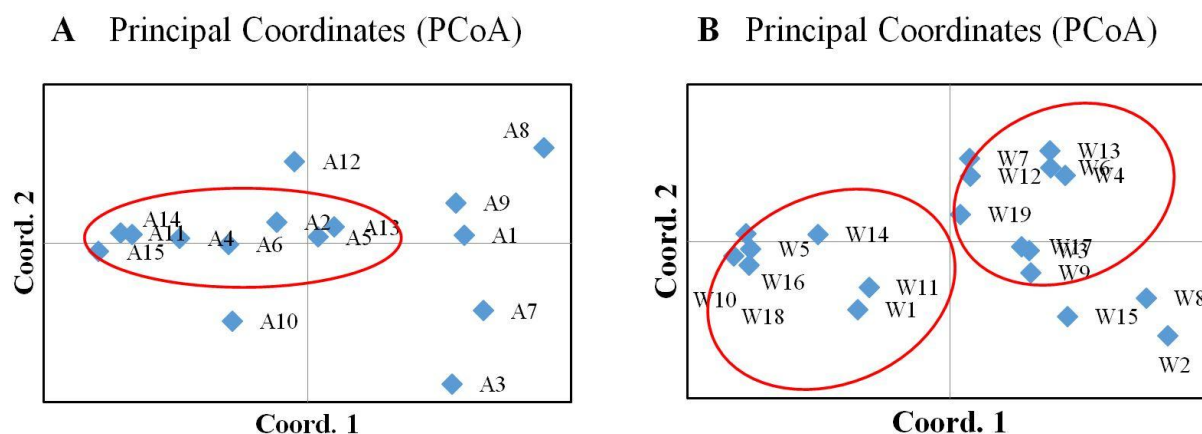
b) Analiza morfometryczna. Do badań morfometrycznych pobrano pszczoły z tych samych rodzin, z których pobierano osobniki do badań molekularnych. Ocena czystości rasowej matek pszczelich wykonano na podstawie użycowania prawego skrzydła, pierwszej pary u robotnic (morfometria geometryczna). Z każdej próby wypreparowano po 20 prawych skrzydeł pierwszej pary i wprawiono w ramki do przezroczystości. Tak przygotowane preparaty zeskanowano do plików cyfrowych o dużej rozdzielczości i poddano analizie programem do automatycznego oznaczania punktów przecięcia się żyłek. Następnie poddawano je weryfikacji wykonując analizę kanoniczną (CCA- Canonical Correlation Analysis) w oparciu o wskaźniki różnicujące je od populacji wzorcowej (Gerula i inni 2009).

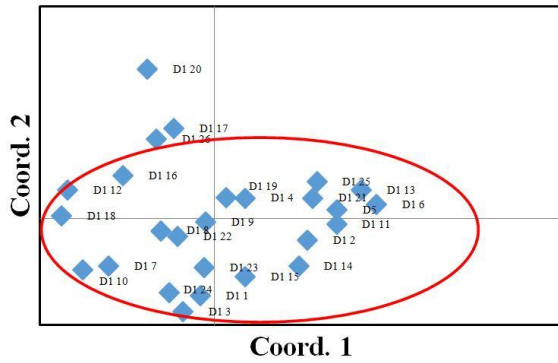
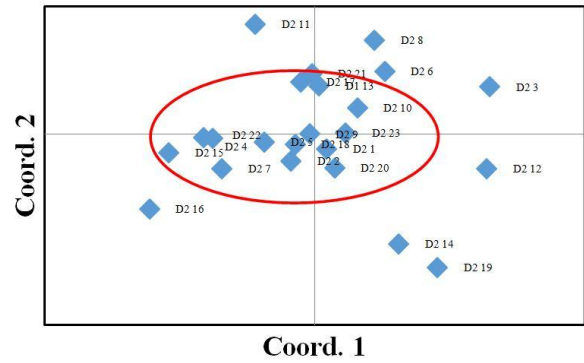
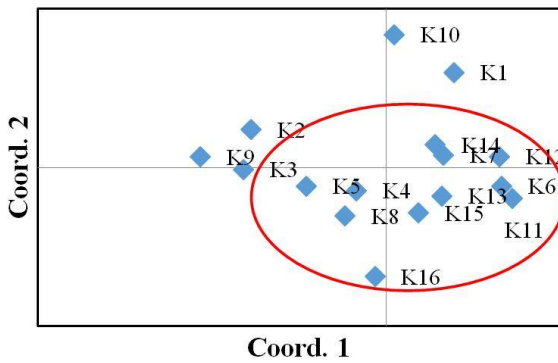
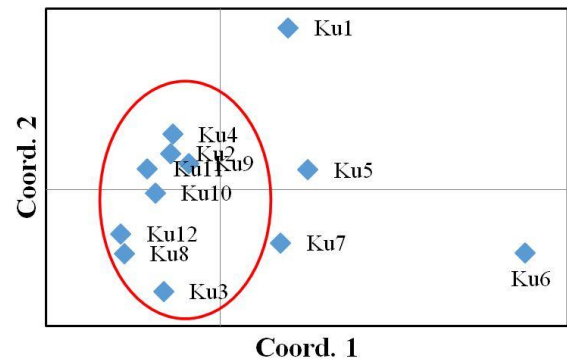
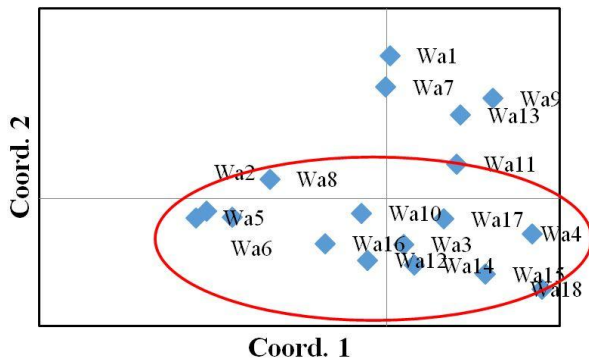
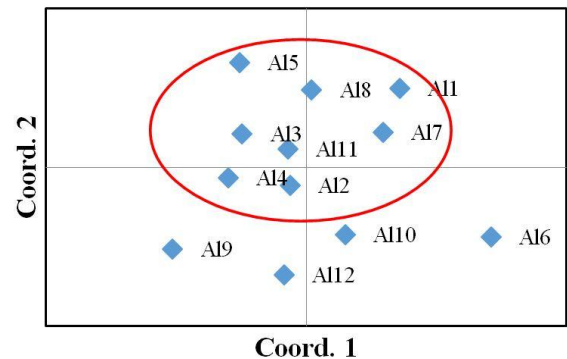
4. Wyniki

Badanie zróżnicowania genetycznego wybranych populacji pszczół na podstawie analiz molekularnych.

W każdej linii hodowlanej stwierdzono zarówno rodziny pszczele blisko spokrewnione genetycznie ze sobą jak i te, u których stwierdzono odmienną genetyczną. Szczegółowe dane wraz z zaznaczonym kolorem czerwonym obszary skupiające rodziny o najbliższym pokrewieństwie genetycznym przedstawia (Ryc. 1 A, B, C, D, E, F, G, H).

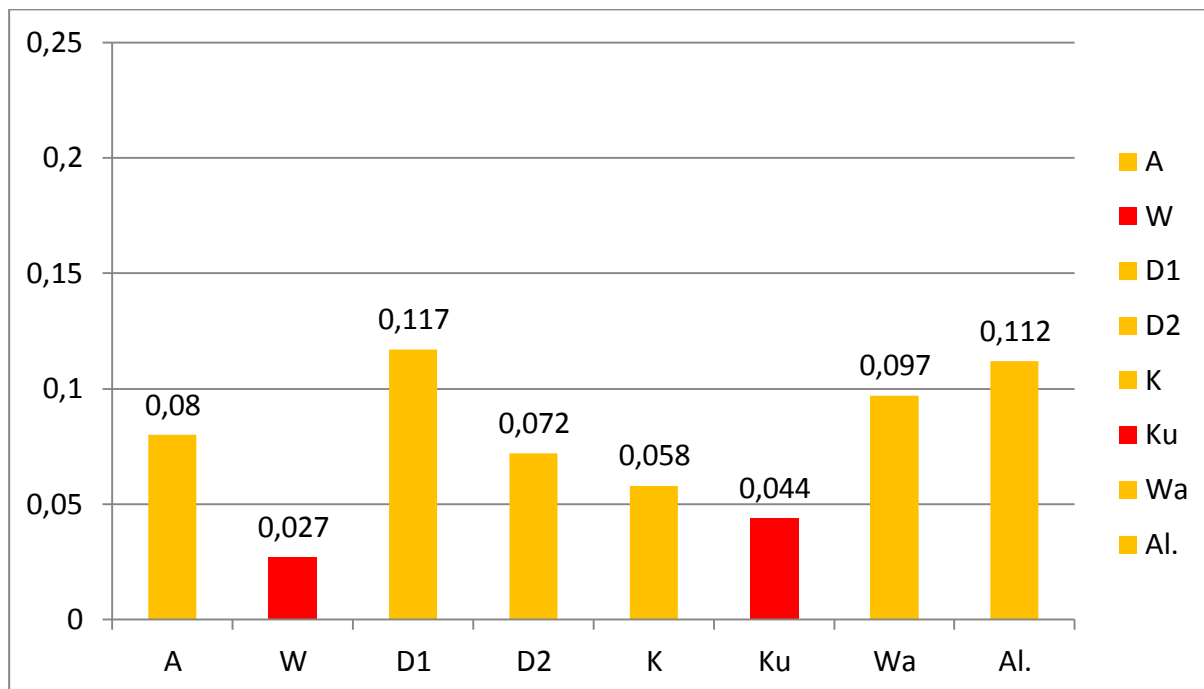
Rycina 1. Analiza głównych współrzędnych na podstawie wartości dystansu genetycznego pomiędzy rodzinami odpowiednich linii hodowlanych: (A)- Aga **A**, (B)- Wineta **W**, (C)- DobraS **D1**, (D)- DobraK **D2**, (E)-Karpátka **K**, (F)- Kujawska **Ku**, (G)- Wanda **Wa**, (H)- Alpejka **Al**.



C Principal Coordinates (PCoA)**D** Principal Coordinates (PCoA)**E** Principal Coordinates (PCoA)**F** Principal Coordinates (PCoA)**G** Principal Coordinates (PCoA)**H** Principal Coordinates (PCoA)

Jedną z miar zróżnicowania genetycznego populacji jest indeks utrwalenia alleli F_{st} , który pokazuje jak silnie dane allele są utrwalone. Najmniej zróżnicowaną linią hodowlaną okazała się Wineta i Kujawska indeks F_{st} odpowiednio 0,027 i 0,044. W pozostałych populacjach indeks ten był przeciętny i wynosił 0,058-0,117 (Ryc. 2). Najwyższy indeks utrwalenia (0,117), czyli największe zróżnicowanie genetyczne zaobserwowano w linii hodowlanej Dobra1, jedynej rodzimej populacji pszczół kraińskich, gdzie 92% całkowitego zróżnicowania molekularnego stanowiły różnice osobnicze, natomiast 8% decydowało o różnicach pomiędzy rodzinami pszczelimi.

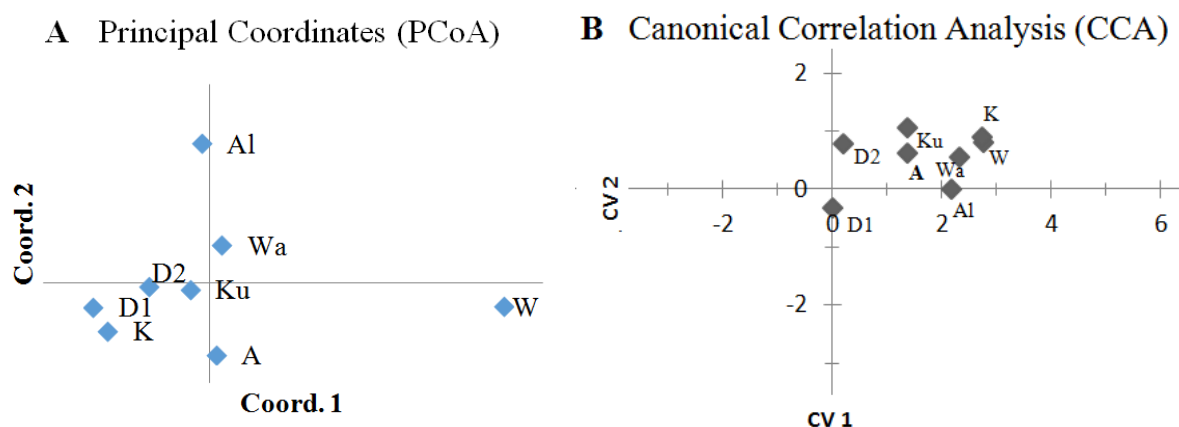
Rycina 2. Zróżnicowanie genetyczne wewnątrz populacji, indeks utrwalenia alleli (F_{st}) w badanych populacjach hodowlanych pszczoły miodnej: (A)- Aga **A**, (B)- Wineta **W**, (C)- DobraS **D1**, (D)- DobraK **D2**, (E)-Karpotka **K**, (F)- Kujawska **Ku**, (G)- Wanda **Wa**, (H)- Alpejka **Al**.



Ocena pokrewieństwa wybranych linii hodowlanych na podstawie analizy polimorfizmu DNA, oraz ocena zróżnicowania na podstawie badań morfometrycznych.

Analiza wariancji molekularnej wykazała, że badane linie są przeciętnie spokrewnione (Ryc.3 A). Najbliższe pokrewieństwo stwierdzono pomiędzy liniami (D1) i (K), natomiast najodleglejsze pomiędzy liniami (D1) i (W).

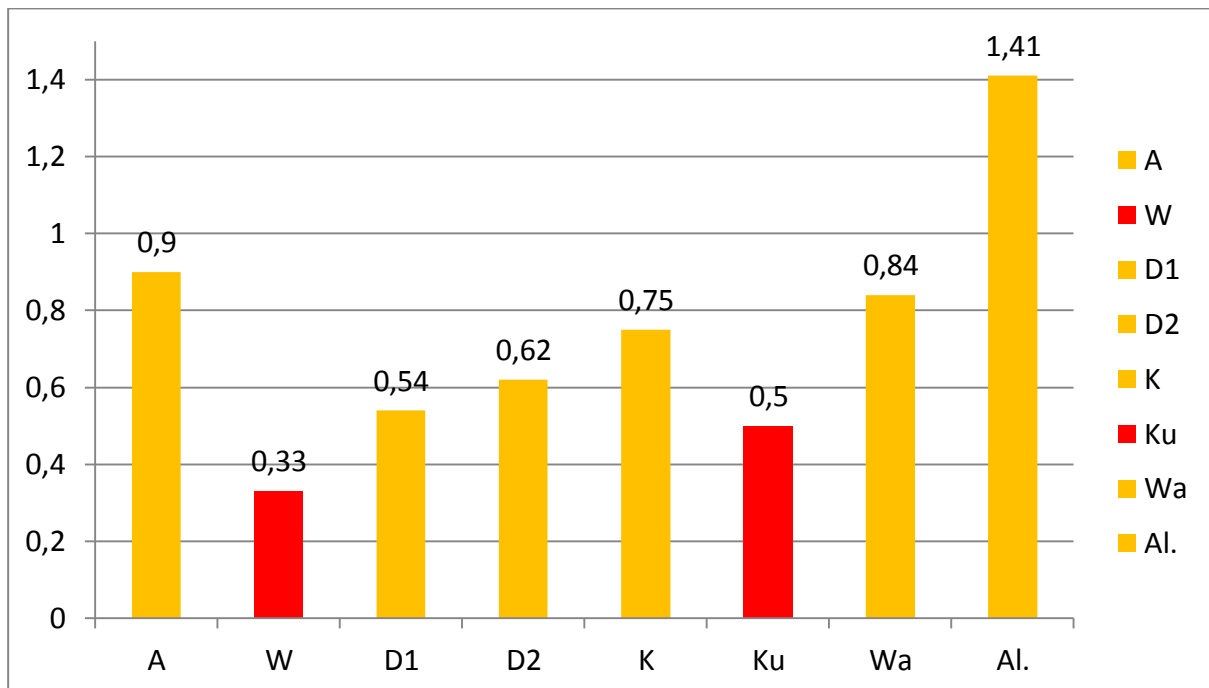
Rycina 3. A- Zróżnicowanie genetyczne między populacjami pszczoły miodnej; B- Zróżnicowanie morfometryczne między populacjami pszczoły miodnej: (A)- Aga **A**, (B)- Wineta **W**, (C)- DobraS **D1**, (D)- DobraK **D2**, (E)- Karpotka **K**, (F)- Kujawska **Ku**, (G)- Wanda **Wa**, (H)- Alpejka **Al**.



Analizując zespół cech na skrzydłach (wzajemne położenie względem siebie 19 punktów przecięcia się żyłek) stwierdzono, że wszystkie badane linie pszczół są czyste rasowo. Zdyskwalifikowano tylko 1 próbę pszczół z linii (K). Na potrzeby wyrażenia

zmienności układu żyłek na skrzydłach robotnic w rodzinach pszczelich opracowano wskaźnik średniego odchylenia od średniego pierwiastka kanonicznego. Na rycinie 3 B przedstawiono podobieństwo badanych linii hodowlanych na podstawie obrazu skrzydeł, natomiast rycina 4 przedstawia wskaźniki zmienności w poszczególnych populacjach pszczoł. Niektóre populacje pszczoł, u których zaobserwowano niskie zróżnicowanie genetyczne (Ryc. 2 słupki w kolorze czerwonym) cechuje również niskie zróżnicowanie morfometryczne (Ryc. 4), a współczynnik korelacji Pearsona pomiędzy wskaźnikami wynosi $R = 0,63$.

Rycina 4. Zróżnicowanie morfometryczne wewnątrz populacji, średnie odchylenie od średniego pierwiastka kanonicznego w badanych populacjach hodowlanych pszczoły miodnej: (A)- Aga **A**, (B)- Wineta **W**, (C)-DobraS **D1**, (D)- DobraK **D2**, (E)-Karpátka **K**, (F)- Kujawska **Ku**, (G)- Wanda **Wa**, (H)- Alpejka **Al**.



5. Podsumowanie i wnioski

Wykonano analizę zróżnicowania genetycznego wewnątrz wybranych populacji pszczoł krajńskich na podstawie analiz molekularnych. Wskaźniki utrwalenia alleli w populacjach (F_{st}) świadczą o przeciętnym lub niskim zróżnicowaniu genetycznym badanych populacji pszczoł. Na podstawie analizy polimorfizmu DNA stwierdzono średni poziom pokrewieństwa wybranych linii hodowlanych. Analiza czystości rasowej i stopnia zróżnicowania fenotypowego wybranych populacji pszczoł na podstawie pomiarów morfometrycznych świadczy o wysokim poziomie cech podgatunkowych.

6. Literatura

- Gerula D, Tofilski A, Węgrzynowicz P, Skowronek W (2009) Computer-assisted discrimination of honey bee subspecies used for breeding in Poland. *Journal of Apicultural Science* 53: 105–114.
- Solignac M, Zhang L, Mougél F, Li B, Vautrin D, Monnerot M, Cornuet JM, Worley KC, Weinstock GM, Gibbs RA (2007). The genome of *Apis mellifera*: dialog between linkage mapping and sequence assembly. *Genome biology* 8(3): 403.