 <p><b>InHort</b> INSTYTUT OGRODNICTWA</p>	<p>INSTYTUT OGRODNICTWA</p>	<p>Zakład Pszczelnictwa Pracownia Hodowli Pszczół Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych Pracownia Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin</p>
---	---------------------------------	---



## **Analiza bioróżnorodności wybranych linii hodowlanych 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](mailto: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 2017**

## 1. Wstęp

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 występowała pierwotnie tylko w Europie, Afryce i na Bliskim Wschodzie. Tak różnorodne warunki klimatyczne spowodowały wykształcenie się kilkudziesięciu ras geograficznych, z których blisko 30 uważa się za odrębne podgatunki (Ryc. 1). Po II wojnie światowej w wielu krajach, również w Polsce, masowy import pszczoł spowodował wyparcie pszczoł lokalnych, które dziś występują w znacznej mniejszości i zostały włączone do programów ochrony zasobów genowych. Rasy a nawet linie pszczoł nieco różnią się cechami użytkowymi, których przydatność ujawnia się w dopiero odpowiednich warunkach klimatyczno-pożytkowych. Pszczoła miodna jest zwierzęciem gospodarskim na którym prowadzi się intensywne prace hodowlane. Jak w każdej hodowli do reprodukcji wybiera się nieliczne osobniki o wybitnych walorach użytkowych uszczuplając tym zasoby genetyczne populacji. W dalszej perspektywie może to mieć negatywne skutki, bowiem bogactwo puli genowej jest źródłem zdolności adaptacyjnych i gwarantem powodzenia prac hodowlanych. Populacje pszczoł różnią się nie tylko pod względem genetycznym, ale i morfologicznym. Ich odrębność można oznaczyć wykonując badania morfometryczne niektórych części ich ciała, oraz wykorzystując bardzo czułe metody molekularne.



**Rycina 1.** Najbardziej popularne podgatunki (rasy) pszczoły miodnej w Europie: pszczoła kraińska *A. m. carnica*, kaukaska *A. m. caucasica*, włoska *A. m. ligustica* i środkowoeuropejska *A. m. mellifera*.

## 2. Cel zadania

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

## 3. Materiał i metody

a) Analizy molekularne. W 2017 roku do badań zebrano 113 prób pszczół z rodzin pszczelich rasy kraińskiej i kaukaskiej, należących do 8 linii hodowlanych (Tab. 1). Następnie wyizolowano DNA pszczół (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 GenAlEx, 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. Ocenę czystości rasowej rodzin pszczelich wykonano na podstawie użyczkowania prawego skrzydła, pierwszej pary u robotnic (morfometria geometryczna). Z każdej próby wypreparowano po 20 prawych skrzydeł pierwszej pary i wprawiono w ramki do przezroczy. Tak przygotowane preparaty zeskanowano do plików cyfrowych o dużej rozdzielczości i poddano analizie programem do automatycznego oznaczania punktów przecięcia się żyłek (Skrzydłak). Następnie poddawano je weryfikacji wykonując analizę kanoniczną (CCA- canonical correlation analysis) w oparciu o wskaźniki różnicujące je od populacji wzorcowej (Gerula i inni 2009).

**Tabela 1.** Wykaz linii hodowlanych przebadanych w roku 2017.

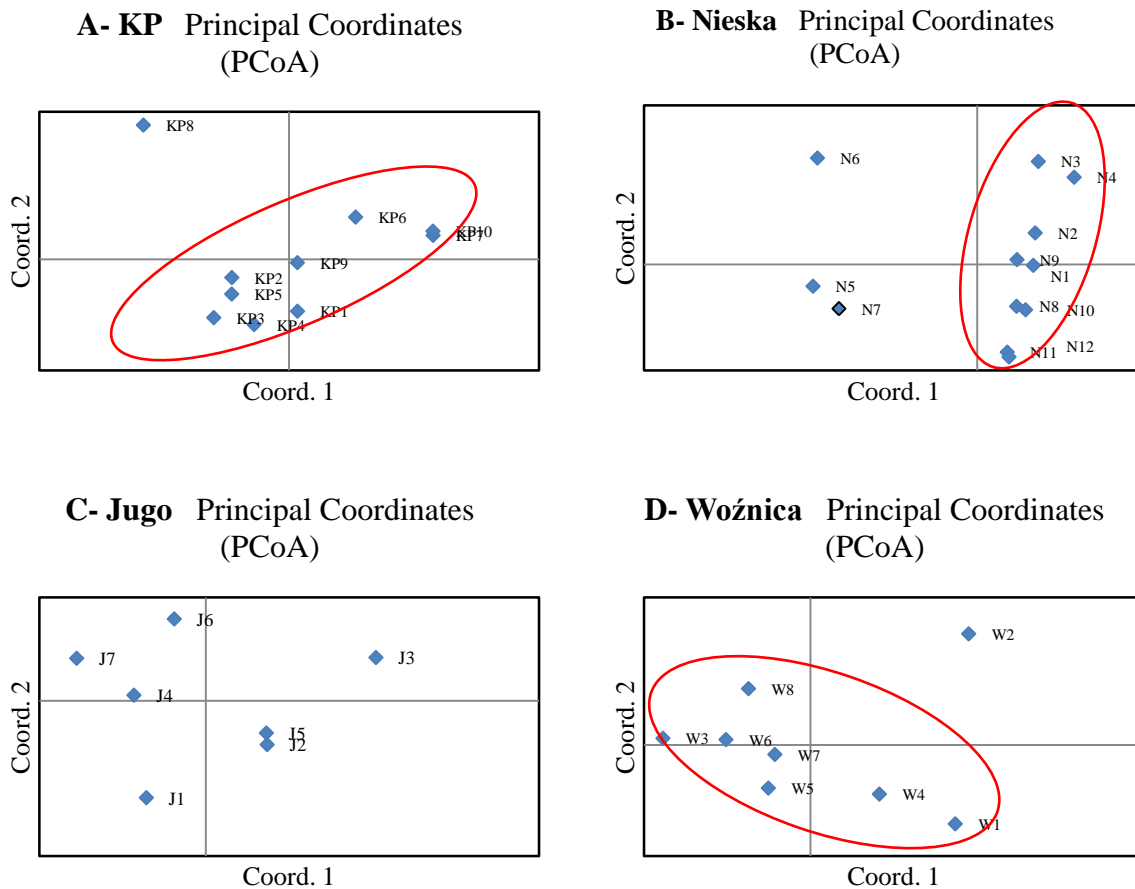
Lp.	Pasieka (hodowca)	Rasa (podgaunek)	Symbol/nazwa linii hodowlanej	Liczba rodzin
1	Pasieka 1	<i>A. m. caucasica</i>	KP	10
2	Pasieka 2	<i>A. m. carnica</i>	Nieska	12
3	Pasieka 2	<i>A. m. carnica</i>	Jugo	7
4	Pasieka 2	<i>A. m. caucasica</i>	Woźnica	8
5	Pasieka 3	<i>A. m. carnica</i>	Majówka	21
6	Pasieka 4	<i>A. m. caucasica</i>	WG	17
7	Pasieka 5	<i>A. m. carnica</i>	Bielka	25
8	Pasieka 6	<i>A. m. carnica</i>	M1	13
Razem				113

#### 4. Wyniki

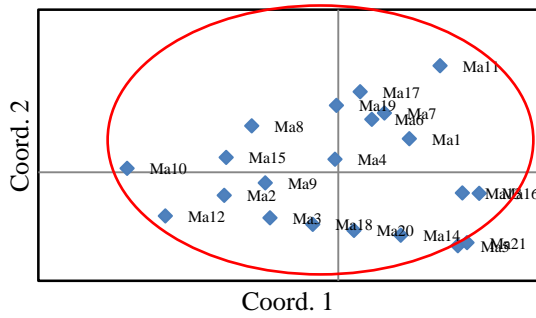
##### Badanie zróżnicowania genetycznego wybranych linii hodowlanych pszczoł na podstawie analiz molekularnych.

W roku 2017 przebadano kolejne 8 z blisko 50 zarejestrowanych linii hodowlanych. Liczebność rodzin w poszczególnych liniach była różna i zależała od liczby matek ocenionych i zakwalifikowanych do wpisu do ksiąg. Liczebności poniżej 10 sztuk będą uzupełniane w kolejnych latach a wyniki uwzględnione będą w raporcie końcowym. W każdej linii hodowlanej stwierdzono zarówno rodziny pszczele blisko spokrewnione genetycznie ze sobą jak i te, u których stwierdzono odmienność genetyczną. Szczegółowe dane wraz z zaznaczonym kolorem czerwonym obszary skupiające rodziny o najbliższym pokrewieństwie genetycznym przedstawia (Ryc. 2 A, B, C, D, E, F, G, H). W populacji pszczoły WG stwierdzono dwie odrębne grupy genetyczne (Ryc. 2 F), natomiast w populacjach Jugo i M1 analiza nie wykazała skupisk spokrewnionych ze sobą rodzin.

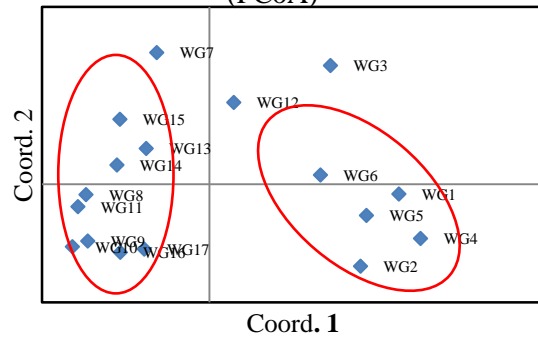
**Rycina 2.** Analiza głównych współrzędnych na podstawie wartości dystansu genetycznego pomiędzy rodzinami odpowiednich linii hodowlanych: (A)- KP, (B)- Nieska, (C)- Jugo, (D)- Woźnica, (E)- Majówka, (F)- WG, (G)- Bielka, (H)- M1.



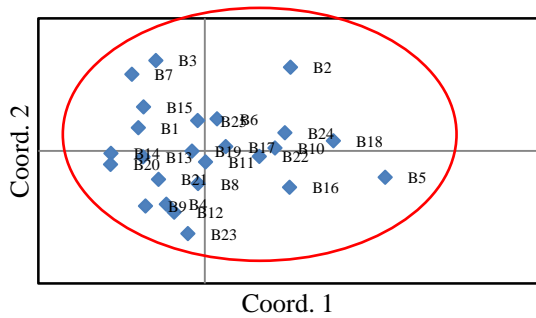
**E- Majówka** Principal Coordinates (PCoA)



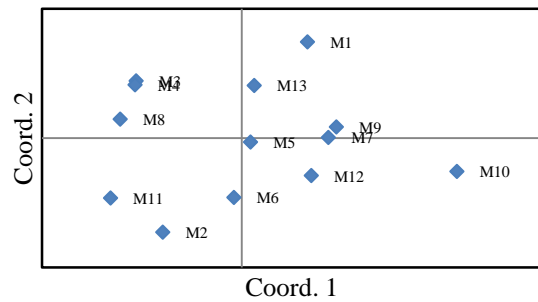
**F- WG** Principal Coordinates (PCoA)



**G- Bielka** Principal Coordinates (PCoA)

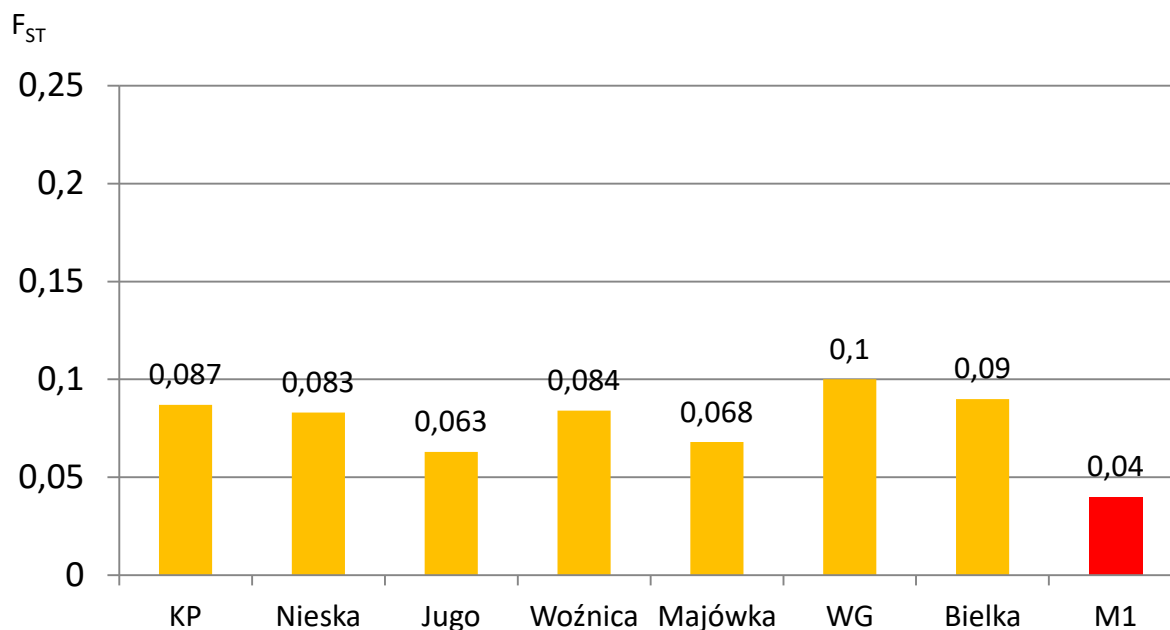


**H- M1** Principal Coordinates (PCoA)



Jedną z miar zróżnicowania genetycznego populacji jest indeks utrwalenia alleli  $F_{ST}$ , który określa spadek heterozygotyczności w populacji. Najmniej zróżnicowaną linią hodowlaną okazała się M1 indeks  $F_{ST}$  0,04. W pozostałych populacjach indeks ten był przeciętny i wynosił 0,063-0,1 (Ryc. 3, żółty kolor słupków) świadczy to o przeciętnym przepływie genów między badanymi liniami. Najwyższy indeks utrwalenia (0,1), czyli największe zróżnicowanie genetyczne zaobserwowano w linii hodowlanej pszczoł kaukaskich WG, gdzie 93% całkowitego zróżnicowania molekularnego stanowiły różnice osobnicze, natomiast 7% decydowało o różnicach pomiędzy rodzinami pszczelimi. Niestety u żadnej z linii wskaźnik  $F_{ST}$  nie przekroczył 0,15, co świadczyłoby o znacznej izolacji tej populacji od pozostałych.

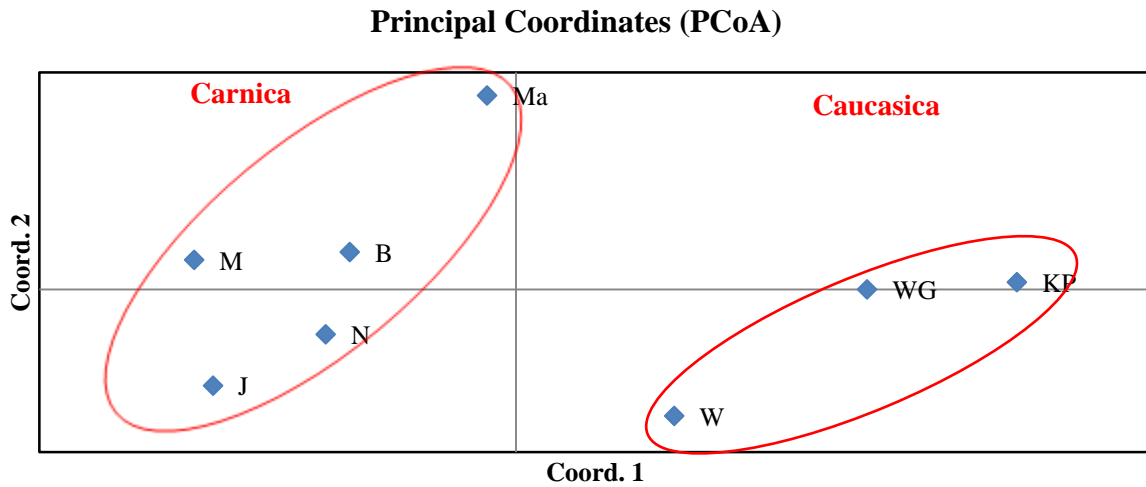
**Rycina 3.** Zróżnicowanie genetyczne wewnątrz populacji, indeks utrwalenia alleli ( $F_{ST}$ ) w badanych liniach hodowlanych pszczoły miodnej:



**Ocena pokrewieństwa wybranych linii hodowlanych na podstawie analizy polimorfizmu DNA.**

Analiza wariancji molekularnej (AMOVA) wykazała 7% poziom zróżnicowania genetycznego stanowiącego o różnicach pomiędzy liniami hodowlanymi w całkowitym zróżnicowaniu zaobserwowanym w badanych próbach. Analiza głównych współrzędnych dla wytypowanych do badań linii hodowlanych pozwoliła na wyodrębnienie dwóch klastrów grupujących linie hodowlane pszczół rasy kraińskiej *Carnica* (Nieska, Jugo, Majówka, Bielka i M1) oraz kaukaskiej *Caucasica* (KP, WG i Woźnica). Jest to zgodne z oczekiwaniem ponieważ rasy te należą do odrębnych linii ewolucyjnych. Najbliższe pokrewieństwo wykazano pomiędzy liniami WG i KP, natomiast najodleglejsze pomiędzy liniami: kraińską M1 i kaukaską KP (Ryc. 4).

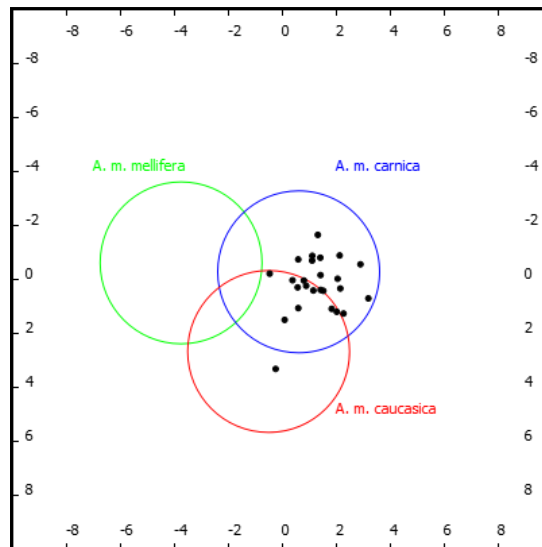
**Rycina 4.** Analiza głównych współrzędnych na podstawie wartości dystansu genetycznego, zróżnicowanie genetyczne pomiędzy 8 analizowanymi liniami hodowlanymi: KP, Nieska (N), Jugo (J), Woźnica (W), Majówka (Ma), WG, Bielka (B), M1 (M).



#### Ocena czystości rasowej i stopnia zróżnicowania fenotypowego wybranych linii pszczół na podstawie pomiarów morfometrycznych

Analizując zespół cech na skrzydłach (wzajemne położenie względem siebie 19 punktów przecięcia się żyłek) stwierdzono, że pszczoły ze wszystkich badanych rodzin są czyste rasowo. Zdyskwalifikowano tylko 1 rodzinę z linii Bielka (Ryc. 5). W przypadku badania użytkowania skrzydeł pszczół dostępne metody badań nie pozwalają na wyodrębnienie poszczególnych linii pszczół w obrębie jednej rasy.

**Rycina 5.** Wyniki weryfikacji rasowej pszczół linii Bielka w postaci graficznej (analiza kanoniczna, dwa pierwiastki kanoniczne). Każdy czarny punkt na wykresie reprezentuje jedną rodzinę pszczelą.



## 5. Podsumowanie i wnioski

Wykonano analizę zróżnicowania genetycznego wewnątrz wybranych linii hodowlanych pszczół kraińskich i kaukaskich na podstawie analiz molekularnych. Wskaźniki utrwalenia alleli w populacjach ( $F_{ST}$ ) świadczą o przeciętnym lub niskim zróżnicowaniu genetycznym badanych populacji pszczół, co świadczy o ich znacznym pokrewieństwie genetycznym. Na podstawie analizy polimorfizmu DNA stwierdzono średni poziom pokrewieństwa wybranych linii hodowlanych. Analiza czystości rasowej i stopnia zróżnicowania fenotypowego wybranych populacji pszczół na podstawie pomiarów morfometrycznych świadczy o wysokim poziomie cech podgatunkowych. W przypadku badania użytkowania skrzydeł pszczół dostępne metody badań nie pozwalają na wyodrębnienie poszczególnych linii pszczół w obrębie jednej rasy, jak również metoda ta jest nieprzydatna do weryfikacji hybrydizowanego materiału.

## 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, Mougel 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.