	INSTYTUT OGRODNICTWA	Zakład Pszczelnictwa Pracownia Hodowli Pszczół Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych Pracownia Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin
---	-------------------------	--



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

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 2018

1. Wstęp

W strefie klimatu umiarkowanego Europy środkowej zapylaczami roślin entomofilnych, są owady z nadrodziny pszczoł (*Apiodea*). Gatunkiem o największym znaczeniu gospodarczym jest pszczoła miodna (*Apis mellifera* L.), która 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 różnią się cechami użytkowymi, których przydatność ujawnia się dopiero w 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 2018 roku do badań pobrano pszczoły z 134 rodzin pszczelich rasy kraińskiej, należących do 8 linii hodowlanych (Tab. 1). Następnie wyizolowano DNA pszczoł zestawem 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. Ocena czystości rasowej rodzin pszczelich wykonano na podstawie użyczkowania prawego skrzydła pierwszej pary u robotnic. Metoda ta zwana morfometrią geometryczną wykorzystuje wzajemne położenie względem siebie 19 punktów przecięcia żyłek. Z każdej próby wypreparowano po 20 skrzydeł 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 program posługując się analizą kanoniczną (CCA- canonical correlation analysis) oblicza wskaźnik różnicy (WR) od populacji wzorcowej (Gerula i inni 2009).

Tabela 1. Wykaz linii hodowlanych przebadanych w roku 2018.

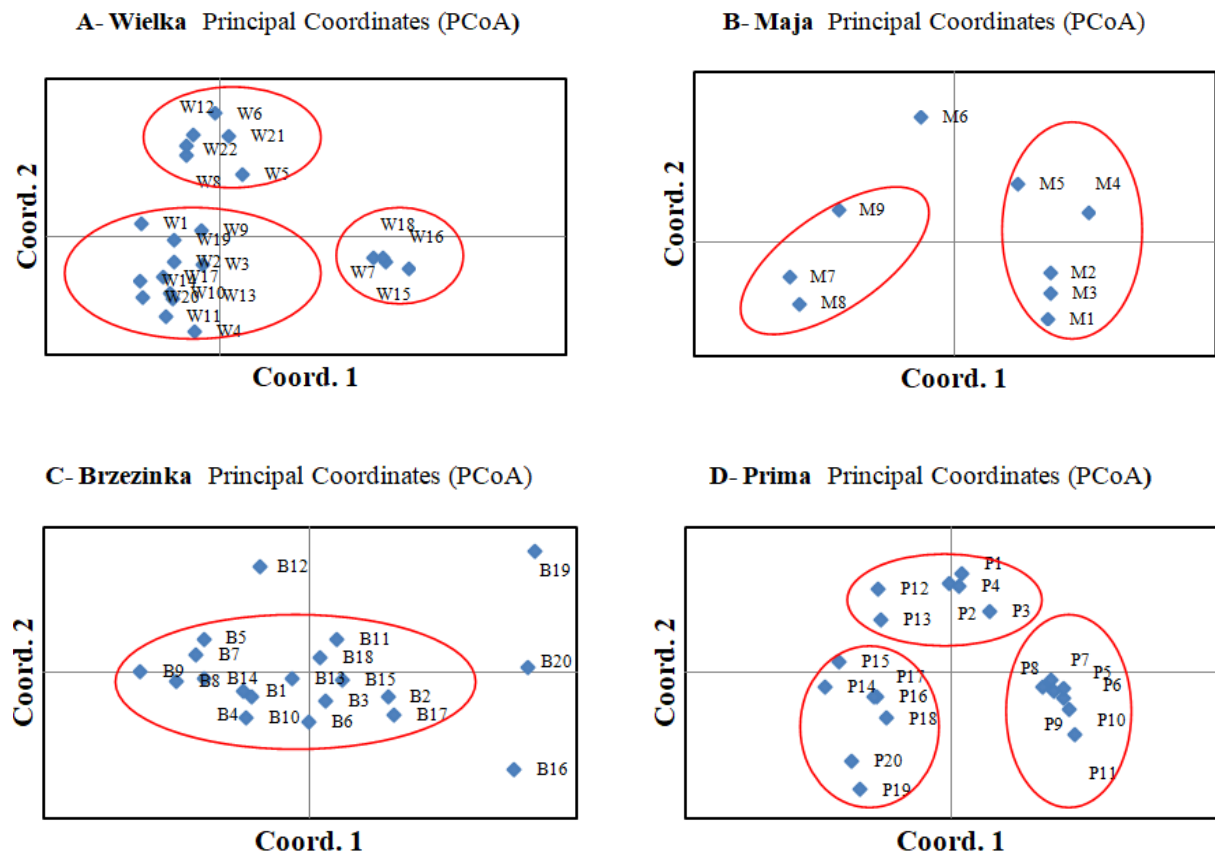
Lp.	Pasieka (hodowca)	Symbol/nazwa linii hodowlanej	Liczba rodzin
1	Pasieka 1	Wielka (W)	22
2	Pasieka 2	Maja (M)	9
3	Pasieka 3	Brzezinka (B)	20
4	Pasieka 4	Prima (P)	20
5	Pasieka 4	Gema(G)	20
6	Pasieka 5	(Cr)	16
7	Pasieka 5	(Cp)	16
8	Pasieka 5	(Cb)	11
Razem			134

4. Wyniki

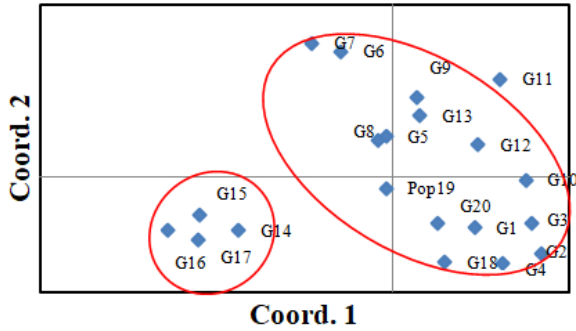
Badanie zróżnicowania genetycznego wybranych linii hodowlanych pszczoł na podstawie analiz molekularnych.

W roku 2018 przebadano 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. 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 niektórych populacjach stwierdzono istnienie 2-3 odrębnych linii matecznych (Ryc. 2 A-E). Linie Cr, Cp i Cb okazały się bardziej jednolite.

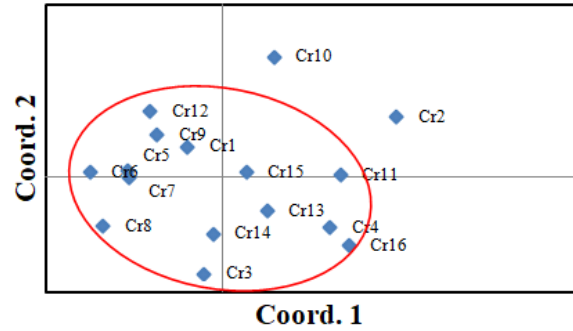
Rycina 2. Analiza głównych współrzędnych na podstawie wartości dystansu genetycznego pomiędzy rodzinami odpowiednich linii hodowlanych: (A)- Wielka, (B)- Maja, (C)- Brzezinka, (D)- Prima, (E)- Gema, (F)- Cr, (G)- Cp, (H)- Cb.



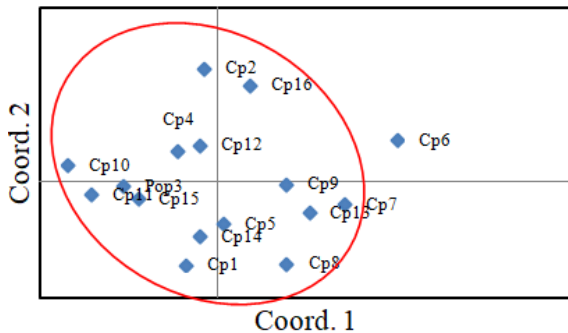
E- Gema Principal Coordinates (PCoA)



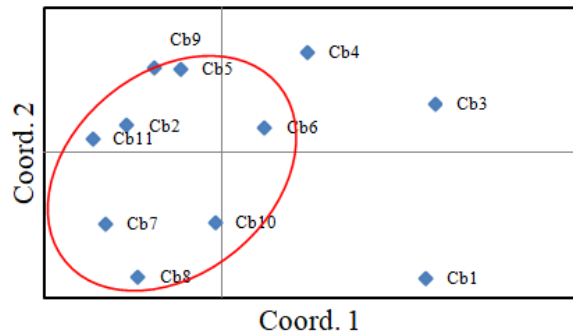
F- Cr Principal Coordinates (PCoA)



G- Cp Principal Coordinates (PCoA)

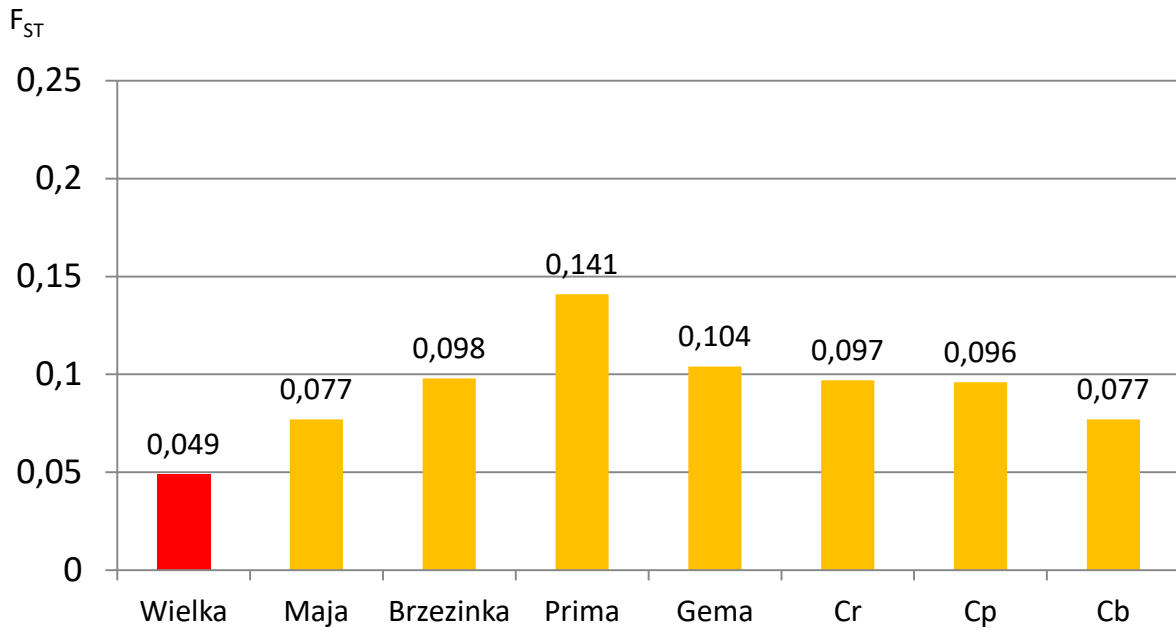


H- Cb Principal Coordinates (PCoA)



Jedną z miar zróżnicowania genetycznego populacji jest indeks utrwalenia alleli F_{ST} , który określa stopień heterozygotyczności w populacji. Najmniej zróżnicowaną linią hodowlaną okazała się Wielka indeks F_{ST} 0,049. W pozostałych populacjach wartość indeksu wynosiła 0,077-0,141, co świadczy o umiarkowanym przepływie genów między badanymi liniami. (Ryc. 3, żółty kolor słupków). Najwyższy indeks utrwalenia (0,141), czyli największe zróżnicowanie genetyczne zaobserwowano w linii hodowlanej Prima, u której 90% całkowitego zróżnicowania molekularnego stanowiły różnice osobnicze, natomiast 10% decydowało o różnicach pomiędzy rodzinami pszczelimi. U żadnej z linii wskaźnik F_{ST} nie przekroczył 0,15, co oznaczałoby znaczną izolację tej populacji od pozostałych.

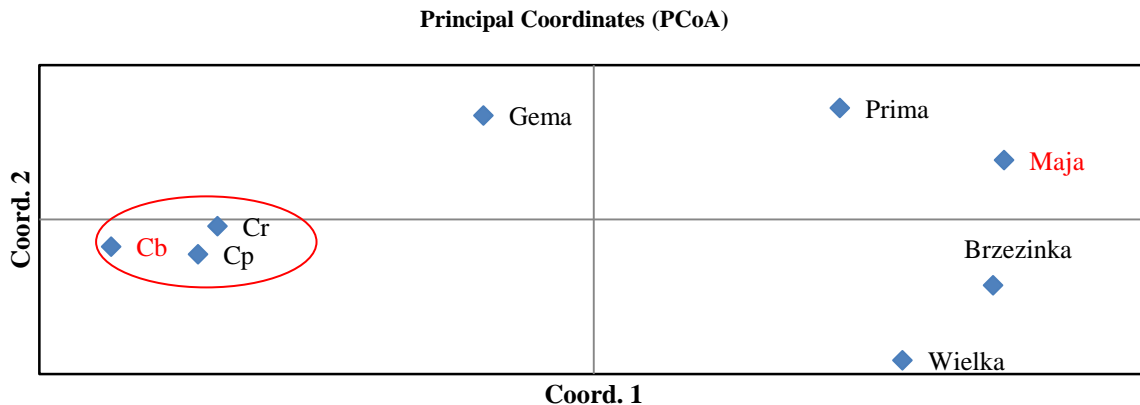
Rycina 3. Zróżnicowanie genetyczne wewnątrz populacji, indeks utrwalenia alleli (F_{ST}) wybranych linii hodowlanych pszczoły miodnej:



Ocena pokrewieństwa wybranych linii hodowlanych na podstawie analizy polimorfizmu DNA.

Analiza wariancji molekularnej (AMOVA) wykazała 5% poziom zróżnicowania genetycznego stanowiącego o różnicach pomiędzy liniami hodowlanymi w całkowitym zróżnicowaniu zaobserwowanym w badanych próbach. Najbliższe pokrewieństwo wykazano pomiędzy liniami Cr, Cp i Cb, natomiast najodleglejsze pomiędzy liniami Cb i Maja (Ryc. 4).

Rycina 4. Analiza głównych współrzędnych na podstawie wartości dystansu genetycznego, zróżnicowanie genetyczne pomiędzy 8 analizowanymi liniami hodowlanymi: Wielka, Maja, Brzezinka, Prima, Gema, Cr, Cp, Cb.



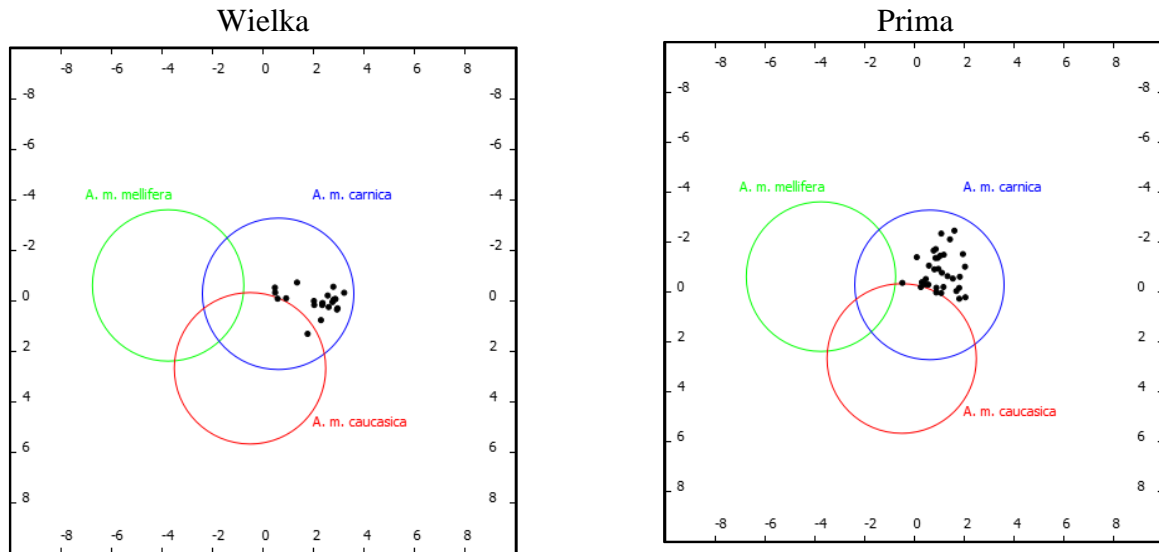
Ocena czystości rasowej i stopnia zróżnicowania fenotypowego wybranych linii pszczół na podstawie pomiarów morfometrycznych

W przypadku użytkowania skrzydeł pszczół dostępne metody nie pozwalają na jednoznaczne zidentyfikowanie poszczególnych linii pszczół w obrębie jednej rasy. Niemniej jednak niektóre z nich można wyodrębnić na podstawie wielkości wskaźnika różnicy (WR), jak w przypadku linii Wielka i Prima (Tab. 2, Ryc. 5). Wskaźnik ten powinien zawierać się w zakresie $0 \leq WR \leq 3$. Analizując zespół cech czyli użytkowanie skrzydła, za wyjątkiem jednej rodziny z linii Cb, pozostałe zostały zakwalifikowane do podgatunku *Apis mellifera carnica* Pollm. (Tab. 2).

Tabela 2. Wykaz linii hodowlanych przebadanych w roku 2018. Wyniki weryfikacji rasowej pszczół.

Symbol/nazwa linii hodowlanej	Liczba rodzin	Wskaźnik Różnicy (WR)	Zmienność między rodzinami (Odch. Std.)	Procent rodzin dla których wskaźnik różnicy (WR) wynosi:			
				$0 \leq WR \leq 1$	$1 < WR \leq 2$	$2 < WR \leq 3$	$WR > 3$
Wielka (W)	22	1,61	0,80	25,0	35,0	40,0	0
Maja (M)	9	1,32	0,42	22,0	78,0	0	0
Brzezinka (B)	20	1,52	0,78	35,0	30,0	35,0	0
Prima (P)	20	0,89	0,62	60,0	30,0	10,0	0
Gema(G)	20	0,91	0,44	55,0	45,0	0	0
(Cr)	16	1,34	0,57	33,4	53,2	13,4	0
(Cp)	16	1,30	0,70	25,0	56,0	19,0	0
(Cb)	11	1,29	1,08	45,4	36,4	9,1	9,1

Rycina 5. Wyniki weryfikacji podgatunkowej pszczół linii Wielka i Prima 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 wybranych linii hodowlanych pszczół krajńskich na podstawie analiz molekularnych. Przeciętna wartość wskaźników utrwalenia alleli w populacjach (F_{ST}) świadczy o przeciętnym lub niskim zróżnicowaniu genetycznym badanych populacji pszczół, co świadczy o znacznym obniżeniu heterozygotyczności. Na podstawie analizy polimorfizmu DNA stwierdzono średni poziom pokrewieństwa wybranych linii hodowlanych wyodrębniając jednak klastery w którym znalazły się linie z jednej pasieki hodowlanej. Analiza czystości rasowej i stopnia zróżnicowania fenotypowego wybranych populacji pszczół na podstawie pomiarów morfometrycznych świadczy o wysokim poziomie cech podgatunkowych. W przypadku użyłkowania skrzydeł pszczół dostępne metody nie pozwalają na jednoznaczne wyodrębnienie poszczególnych linii pszczół w obrębie jednej rasy, metoda ta jest więc nieprzydatna do weryfikacji hybrydowanego materiału. Wskaźnik różnicy (WR) w wybranych liniach pszczół był odwrotnie skorelowany z wskaźnikiem utrwalenia alleli F_{ST} ($R = -0,76$, $p < 0,05$).

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.