



Różnorodność pszczoły miodnej na podstawie analizy wybranych linii hodowlanych

Opracowanie zbiorowe pod redakcją: dr hab. 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 2019

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 pierwotnie występowała w Europie, Afryce i na Bliskim Wschodzie. Różnorodne warunki klimatyczne na tych obszarach spowodowały wykształcenie się kilkudziesięciu ras geograficznych, z których blisko 30 uważa się za odrębne podgatunki. Do lat 50-tych ubiegłego stulecia na przeważającym obszarze Polski dominował podgatunek pszczoły środkowoeuropejskiej (*Apis mellifera mellifera* L.). W niedługim czasie masowy import pszczoł spowodował wyparcie pszczoł lokalnych, które dziś występują w znacznej mniejszości i zostały włączone do programów ochrony zasobów genowych. Obecnie dopuszczone są do hodowli cztery podgatunki pszczoł zwane potocznie rasami (Ryc. 1). Rasy a nawet linie pszczoł różnią się cechami użytkowymi, wyglądem i zachowaniem, a cechy te dziedziczą po praprzodkach, którzy dostosowali się do określonych warunków dzięki ewolucji. Przydatność użytkowa poszczególnych linii ujawnia się dopiero w odpowiednich dla nich warunkach klimatyczno-pożytkowych, ze względu na występowanie interakcji genetyczno-środowiskowej. Pszczoła miodna jest zwierzęciem gospodarskim, poddanym intensywnym pracom hodowlanym. W wyniku selekcji 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. Dlatego istotnym jest aby hodowla była zrównoważona, i uwzględniała zachowanie różnorodności pszczoł na poziomie wewnątrz gatunkowym. Niezbędne jest zatem utrzymywanie i selekcja wielu populacji pszczoł, oraz ochrona pszczoł miejscowych jako dziedzictwa naturalnego.

W roku 1758 Linneusz po raz pierwszy opisał i sklasyfikował gatunek pszczoły miodnej wydzielając z niego w Europie pierwszy podgatunek pszczoły miodnej właściwej *A. m. mellifera*. Od tego czasu, co kilkadziesiąt lat, inni badacze oznaczali coraz to nowe podgatunki zarówno na starym kontynencie jak i w Afryce i Azji zachodniej. Początkowo podział na poszczególne podgatunki opierano na obserwacji biologii pszczoł i cechach behawioralnych. Analiza danych biometrycznych pozwoliła na dokładniejsze rozróżnienie ras geograficznych a nawet na ich podział uwzględniający kierunki ewolucji na przestrzeni dziejów (Ruttner 1978, 1988). W ostatnich latach w taksonomii znalazła zastosowanie morfometria geometryczna (kształtu) początkowo wykorzystywana w badaniach antropologicznych (Bookstein 1991, Kendall i inni 1999, Zeldith i inni 2004). U pszczoł układ żyłek na skrzydłach tworzy pewien wzór charakterystyczny dla różnych jednostek systematycznych i jest cechą wysoko odziedziczną, co wykorzystywane jest w badaniach taksonomicznych. Bazując na teorii kształtu, w tym przypadku wzajemnym położeniu połączeń żyłek względem siebie opracowano oprogramowanie do szybkiej i wielowymiarowej analizy danych, pozwalającej na bardzo precyzyjne i szybkie wykonanie badań morfometrycznych (Tofilski 2008, Gerula i inni 2009, Nawrocka i inni 2018). Rozwój genetyki molekularnej sprawił, że lista oznaczonych podgatunków stała się listą otwartą. Wykorzystując nowoczesne techniki stosunkowo niedawno wyróżniono trzy nowe podgatunki: *A. m. pomonella* w 2003, *A. m. simensis* w 2011 czy *A. m. sinixinyuan* w 2016, dowodząc tego, że naturalny zasięg występowania pszczoły miodnej w kierunku wschodnim

jest większy niż sądzono wcześniej. Wykorzystanie markerów genetycznych jak mikrosatelitarne (SSR), czy wykorzystanie zmienności DNA jądrowego pojedynczego nukleotydu (SNP) lub polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych mitochondrialnego DNA (PCR-RFLP) daje szerokie możliwości. Badania te wykorzystuje się najczęściej w celu odróżnienia od siebie podgatunków pszczoły miodnej i w badaniach filogenetycznych i oceny struktury genetycznej populacji.



Rycina 1. Podgatunki (rasy) pszczoły miodnej w dopuszczone do hodowli w Polsce: 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 różnorodności linii hodowlanych pszczoły miodnej poprzez analizę zróżnicowania genetycznego i morfometrycznego.

3. Materiał i metody

a) Analizy molekularne. W 2019 roku do badań pobrano pszczoły z 108 rodzin pszczelich rasy kraińskiej i kaukaskiej, należących do 8 linii hodowlanych (Tab. 1). Następnie wyizolowano DNA pszczół 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. Poddane genotypowaniu próby pszczoł w ostatnim roku badań przeanalizowane metodą STRUCTURE pozwalającą na wykrycie wewnętrznej struktury populacyjnej oraz stopnia zmieszania w oparciu o grupowanie metodą Bayesa.

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 użyczenia 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 przezroczystości. 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). Wskaźnik ten jest liczbą niemianowaną, aby zaliczyć pszczoły do określonego podgatunku jego wartość powinna zawierać się w zakresie 0-3,0.

Tabela 1. Wykaz linii hodowlanych przebadanych w roku 2019.

Lp.	Pasieka (hodowca)	Symbol/nazwa linii hodowlanej	Liczba rodzin
1	Pasieka 1	Ca	15
2	Pasieka 2	Kortówka (K)	16
3	Pasieka 3	Bałtycka (B)	20
4	Pasieka 4	KPW	10
5	Pasieka 4	CT46	12
6	Pasieka 4	CNT	11
7	Pasieka 4	CJ10	12
8	Pasieka 4	AlSin (A)	12
Razem			108

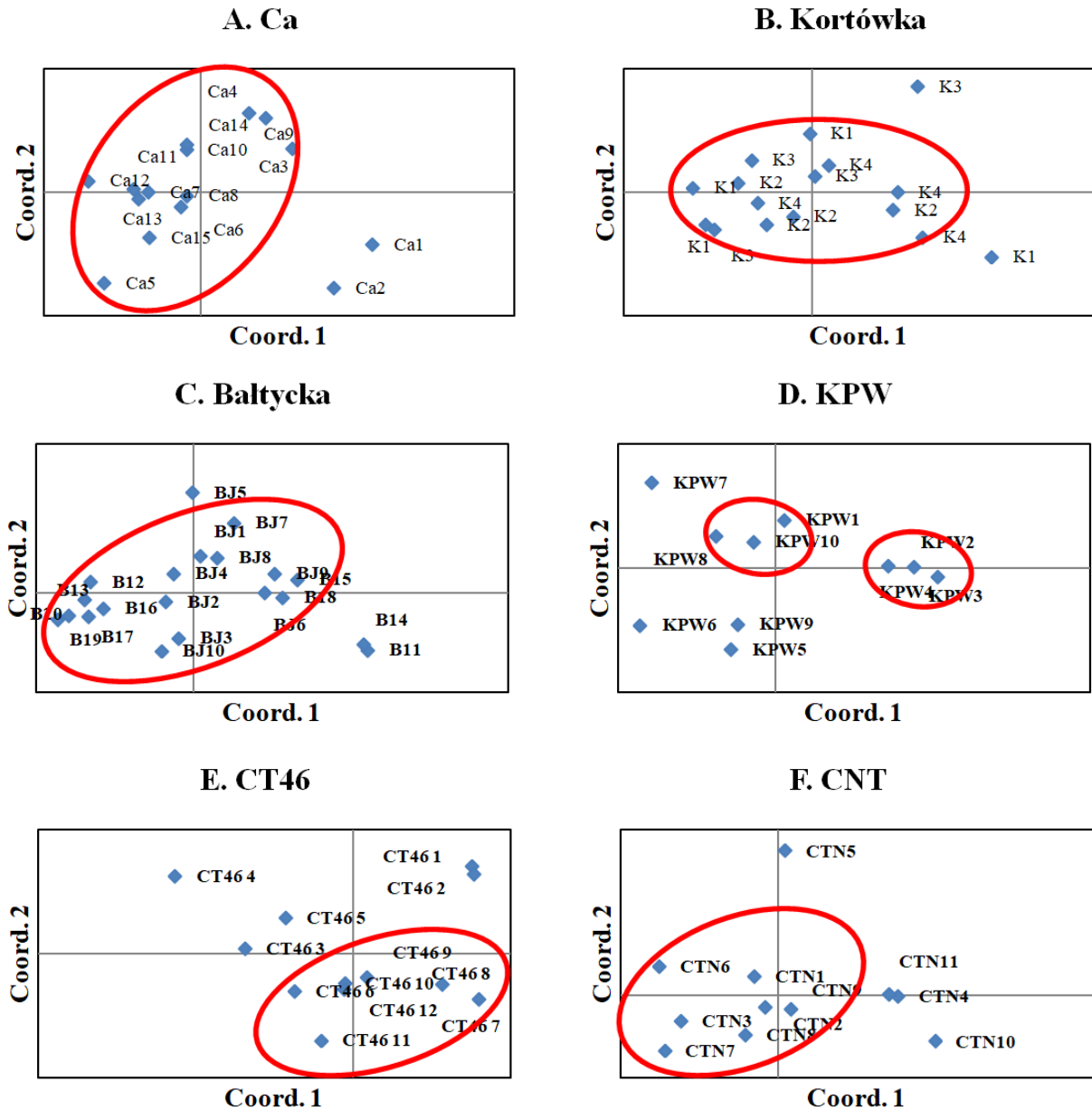
4. Wyniki i dyskusja

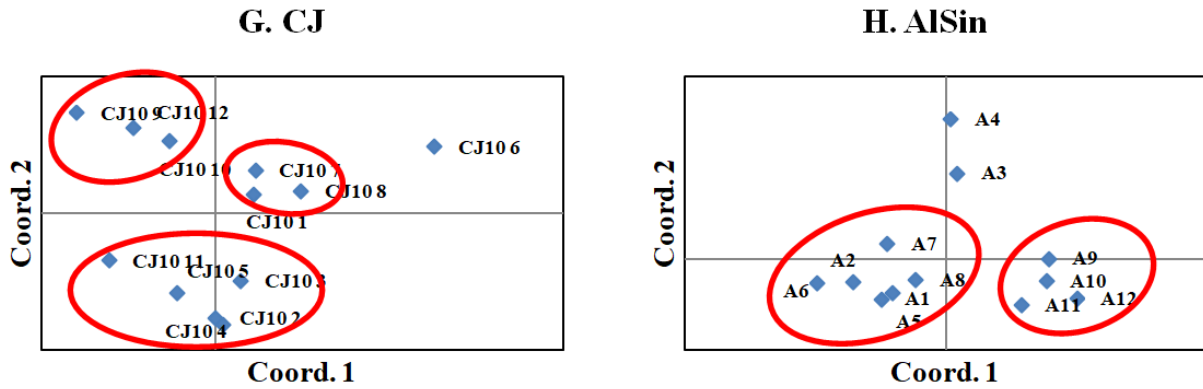
Badanie zróżnicowania genetycznego wybranych linii hodowlanych pszczoł na podstawie analiz molekularnych.

W roku 2019 genotypowano 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 D, G, H). Linie Ca i Kortówka okazały się bardziej jednolite.

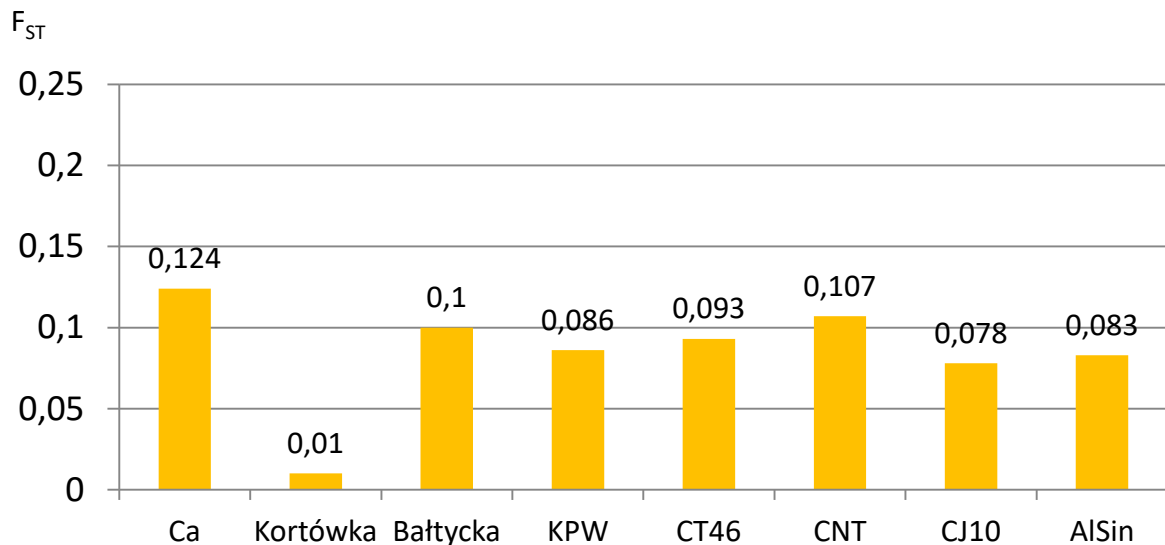
Rycina 2. Analiza głównych współrzędnych na podstawie wartości dystansu genetycznego pomiędzy rodzinami odpowiednich linii hodowlanych: (A)- Ca., (B)- Kortówka **K**, (C)- Bałtycka **B**, (D)- **KPW**, (E)- **CT46**, (F)- **CNT**, (G)- **CJ10**, (H)- **AlSin A**. Zaznaczone obszary skupiają rodziny o najbliższym pokrewieństwie genetycznym.





Jedną z miar zróżnicowania genetycznego populacji jest indeks utrwalenia alleli F_{ST} , który określa stopień heterozygotyczności w populacji. Najwyższy stopień wsobności zaobserwowano w obrębie linii Kortówka F_{ST} 0,01. W pozostałych populacjach wartość indeksu wynosiła 0,078-0,124, co świadczy o umiarkowanym przepływie genów między badanymi liniami. (Ryc. 3). Najwyższy indeks utrwalenia (0,124), czyli największe zróżnicowanie genetyczne zaobserwowano w linii hodowlanej Ca, u której 91% całkowitego zróżnicowania molekularnego stanowiły różnice osobnicze, natomiast 19% 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. Stopień heterozygotyczności populacji, indeks utrwalenia alleli (F_{ST}) wybranych linii hodowlanych pszczoły miodnej:

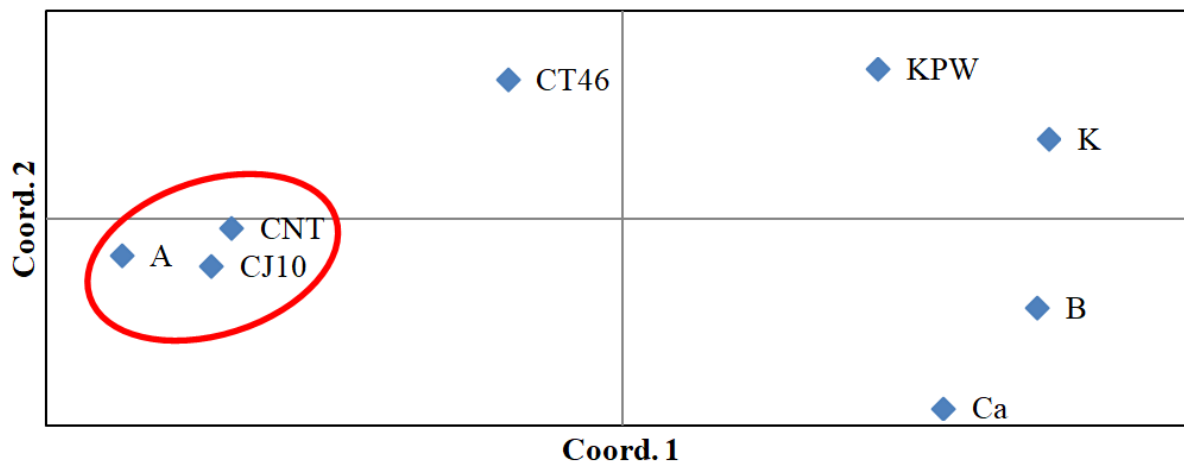


Ocena pokrewieństwa wybranych linii hodowlanych na podstawie analizy polimorfizmu DNA.

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 Alsina, CNT, CJ10 natomiast najodleglejsze pomiędzy liniami Alsina i Kortówka (Ryc. 4).

Rycina 4. Analiza głównych współrzędnych na podstawie wartości dystansu genetycznego, zróżnicowanie genetyczne pomiędzy 8 analizowanymi liniami hodowlanymi: Ca, Kortówka (K), Bałtycka (B), KPW, CT46, CNT, CJ10, AlSin (A). Zaznaczone obszary skupiają rodziny o najbliższym pokrewieństwie genetycznym.

Principal Coordinates (PCoA)



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

Metoda oceny czystości rasowej pszczół na podstawie użycowania skrzydeł z wykorzystaniem programu Skrzydlak nie pozwala na klasyfikację badanych pszczół do poszczególnych linii. Niemniej jednak niektóre z nich można wyodrębnić na podstawie wielkości wskaźnika różnicy (WR), jak w przypadku linii CNT, CJ10, AlSin, i CT46, które wyraźnie odstają od pozostałych (Tab. 2). Podobne zależności można zauważyć w przypadku graficznej interpretacji podobieństwa linii na podstawie poliformizmu DNA (Ryc. 4). Wszystkie rodziny pszczele z linii: Ca, Kortówka, Bałtycka i CT46 zakwalifikowano do podgatunku *Apis mellifera carnica* Pollm ($0 \leq WR \leq 3$). W pozostałych liniach stwierdzono zmieszanie rodzin przy czym najwyższy odsetek takich rodzin był w linii CNT (Tab. 2).

Tabela 2. Wykaz linii hodowlanych przebadanych w roku 2019, oraz 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:			
				$0 \leq WR \leq 1$	$1 < WR \leq 2$	$2 < WR \leq 3$	$WR > 3$
Ca	15	0,97	0,60	53,3	40,0	6,7	0
Kortówka (K)	16	0,19	0,42	100	0	0	0
Bałtycka (B)	20	1,29	0,79	50	35	15	0
KPW	10	2,23	1,49	20	30	10	40
CT46	12	1,74	0,51	0	80	20	0
CNT	11	2,28	1,11	9,1	45,4	9,1	36,4
CJ10	12	2,00	0,90	16,6	41,6	25,2	16,6
AlSin (A)	12	1,81	1,15	33,3	25,0	33,3	8,4

5. Podsumowanie i wnioski

W oparciu o dane mikrosatelitarne w niektórych populacjach stwierdzono istnienie 2-3 odrębnych linii matecznych. Przeciętna wartość wskaźników utrwalenia alleli w populacjach (F_{ST}) świadczy o przeciętnym lub niskim zróżnicowaniu genetycznym badanych populacji pszczoł, 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 wybranych populacji pszczoł na podstawie pomiarów morfometrycznych świadczy o wysokiej jakości materiału hodowlanego, jednak liczba rodzin zdyskwalifikowanych była wyższa niż w latach poprzednich. Dostępna metoda weryfikacji podgatunkowej pszczoł nie pozwala na jednoznaczne rozróżnianie linii hodowlanych w obrębie jednej rasy. Mimo to na podstawie wielkości wskaźników (WR) należy stwierdzić, że w obrębie podgatunku *A. m. carnica* istnieje znaczna różnorodność fenotypowa, która jest wynikiem pozyskiwania niejednorodnego materiału hodowlanego z wielu źródeł.

6. Literatura

- Bookstein F.L. (1991) Morphometric tools for land-mark data: Geometry and Biology, Cambridge University Press.
- 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.
- Gromisz M. (1981) Morfologiczna ocena populacji rojów w pasiekach zarodowych. *Pszczeln. Zesz. nauk.* 25:51-66.
- Kendall D.G., Barden D., Carne T.K., Le H. (1999) Shape and shape theory, John Wiley & Sons, Chichester.
- Nawrocka, A., Kandemir, İ., Fuchs, S., Tofilski, A. (2017) Computer software for identification of honey bee subspecies and evolutionary lineages. *Apidologie*, 49, 172-184.
- Ruttner, F. Biogeography and taxonomy of honeybees. (1988). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 284 p.
- Ruttner, F., Tassencourt L., J. Louveaux J. (1978) Biometrical-statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* LI Material and methods. *Apidologie* 9.4: 363-381.
- 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.
- Tofilski, A. (2008) Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. *Apidologie* 39.5: 558-563.
- Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. (2004) Geometric morphometrics for biologists: A primer, Elsevier Academic Press, London.