

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ МОРФОМЕТРІЇ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ОЦІНКИ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ЧИСТОПОРОДНОСТІ УКРАЇНСЬКИХ БДЖІЛ

О. І. Метлицька¹, В. П. Поліщук², С. І. Таран³

¹Інститут свинарства ім. О. В. Квасницького НААН України, м. Полтава, Україна

²Національний університет біоресурсів та природокористування України, м. Київ, Україна

³Миколаївський державний аграрний університет, м. Миколаїв, Україна

Наведено результати досліджень породовизначальних ознак екстер'єру та генетико-популяційного аналізу методом ДНК типування бджіл хмельницького внутрішньопородного типу та місцевої популяції української породи Миколаївської області. Виявлено системи, створені на основі затравок амплікації ОРА-4 та SI, які володіють найбільшим рівнем інформативності щодо визначення чистопородності бджіл.

Ключові слова: БДЖОЛИ, ЕКСТЕР'ЄР, ПОРОДА, ВНУТРІШНЬОПОРОДНИЙ ТИП, МІКРОСАТЕЛІТИ, ДНК, ЛОКУС, ФІНГЕРПРИНТ, ГЕТЕРОЗИГОТНІСТЬ

Породи бджоли медоносної в процесі історичного розвитку набули певних морфологічних та інших особливостей, ознаки яких дають можливість їх ідентифікувати та використовувати в селекційній роботі [1]. Визначення породної приналежності бджіл шляхом вивчення екстер'єрних ознак з використанням класичного методу ускладнюється тим, що показники деяких промірів частин тіла у порід знаходяться в однакових або близьких межах [7]. До того ж окремі автори вказують на те, що на результати морфометричних вимірювань, проведених за стандартною методикою, впливають суб'єктивні фактори [3].

Сучасними дослідженнями показано, що визначення належності бджіл до тієї або іншої породи за особливостями екстер'єру, фізіології, етології та показниками господарської цінності при наявності в її ареалі помісних сімей потребує уточнення іншими методами, оскільки спостерігається широке варіювання бджіл у межах однієї породи або популяції [6]. Ряд авторів погоджуються з цією думкою, оскільки оцінка чистопородності бджолиних сімей на основі лише морфологічних ознак є недостатньою [10].

Тому з метою більш точного встановлення чистоти порід бджіл виникла необхідність у застосуванні для цього методики ДНК-фінгерпринтингу геному бджіл [4, 5].

Мета роботи — дослідження ознак екстер'єру та генетико-популяційної оцінки бджіл внутрішньопородного типу «Хмельницький» та бджіл місцевої популяції української породи в степовій зоні України методом ДНК-полілокусного типування.

Матеріали і методи

Відбір бджіл проводили від сімей піддослідних груп базової пасіки в Братському районі Миколаївської області за загальноприйнятою методикою [2] у кількості 30 індивідів з вулика, для екстер'єрних промірів — від 40 бджолиних сімей, для генетико-популяційної оцінки — 20 сімей.

*Науковий керівник — доктор сільськогосподарських наук, професор В. П. Поліщук

Дослідження екстер'єрних ознак проводили за методикою Алпатова В. В. (1948) та Гьотце Г. (1964) [1, 9]. Результати біометричної обробки з оцінки екстер'єру бджіл порівнювали з установленими нормами стандарту бджіл української породи, зокрема хмельницького типу [8].

Частини екзоскелета бджіл вимірювали за допомогою бінокулярного мікроскопа МБС-10 з окуляр-мікрометром [2].

Перша група (дослідна) складалася з 10 сімей бджіл внутрішньопородного типу «Хмельницький» української породи, завезених із бджолорозплідника «Прибузькі медобори» Летичівського району Хмельницької області. Друга група (контрольна) відібрана з бджолиних сімей місцевої популяції, що протягом 15 років розводяться в Братському районі Миколаївської області. Відібраний матеріал щодо генетико-популяційної оцінки (дві групи бджіл), було протиповано за чотирма системами полілокусних ДНК маркерів.

Генетико-популяційний аналіз двох названих груп проводився на основі даних ДНК-фінгерпринтингу бджолосімей, отриманих із використанням трьох RAPD декануклеотидів (OPA-1, OPA-4, B-15) та одного мікросателітного праймера S1, використаного в техніці ISSR типування. Структура використаних в аналізі праймерів, їх температура випалювання в ПЛР-реакції і кількість отриманих ампліконів в досліджених популяціях наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Структура праймерів та температурний режим випалювання праймерів, використаних для дослідження геному бджіл

Структура праймерів	Температура випалювання праймерів, °C	Кількість отриманих ампліконів двох популяціях сумарно
OPA-01: 5' – AGC AGC GTG G – 3'	36	26
OPA-04: 5' – AAT CGG GCT G – 3'	36	31
B-15: 5' – GGA GGG TCT T – 3'	36	17
S1: 5' – AGC AGC AGC AGC AGC AGC C – 3'	58	24

Режим ампліфікації фрагментів ДНК, методики їх електрофоретичного розділення, візуалізації і детекції проводили за методикою, детально описаною в роботах О. І. Метлицької [4, 5]. Статистичну обробку даних проводили із застосуванням стандартної комп'ютерної програми GELSTAT.

Результати й обговорення

При вивченні 40 піддослідних сімей (по 20 у групі) за основними екстер'єрними ознаками (довжина хоботка, кубітальний індекс, дискоїдальне зміщення та форма заднього краю воскового дзеркальця п'ятого стерніта) встановлено, що бджолині сім'ї дослідної групи основними показниками є більш консолідованими у порівнянні з бджолами контрольної групи (табл. 2).

З результатів досліджень випливає, що довжина хоботка бджіл контрольної групи коливалась в межах $lim=6,61-6,84$ мм, з середнім показником по групі $\bar{X}=6,70\pm 0,005$ мм. Довжина хоботка бджіл дослідної групи коливалась в межах $lim=6,50-6,74$ мм, з середнім показником по групі $\bar{X}=6,63\pm 0,005$ мм.

За даними досліду простежуються менші розмахи коливань показників довжини хоботка та кубітального індексу між сім'ями дослідної групи порівняно з контрольною. Це вказує на той факт, що бджоли хмельницького внутрішньопородного типу за результатами вивчення екстер'єрних промірів більш однорідні у порівнянні з місцевою популяцією.

Таблиця 2

Зведені данні комплексної оцінки бджіл піддослідних груп за ознаками екстер'єру

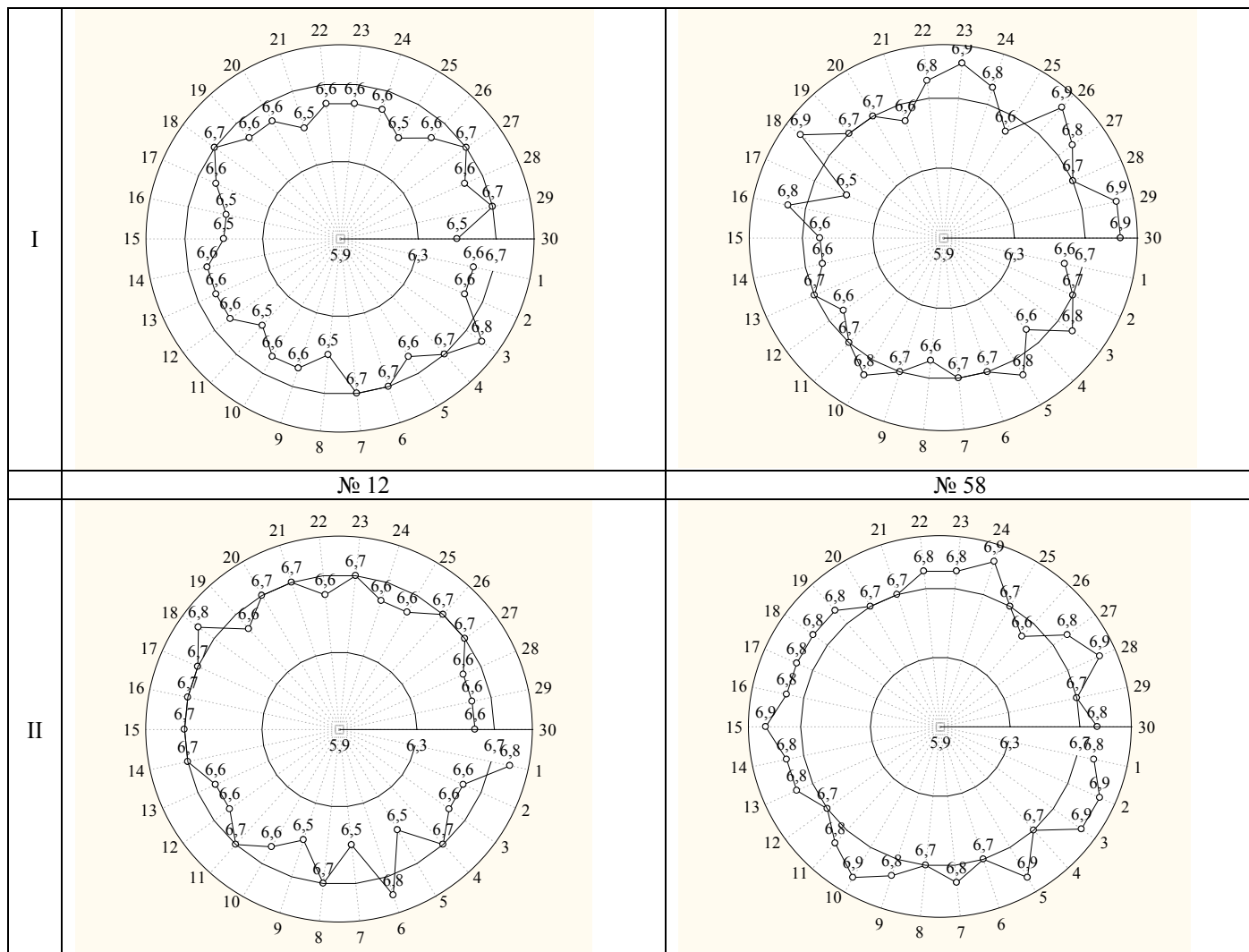
Показник, проміри	Контрольна група (місцева популяція)	Дослідна група (внутрішньопородний тип «Хмельницький»)
Довжина хоботка, мм		

$\bar{X} \pm S\bar{x}$	6,70±0,005*	6,63±0,005*
lim	6,61–6,84	6,50–6,74
Cv,%	1,74	1,70
Кубітальний індекс, од. Гьотце		
$\bar{X} \pm S\bar{x}$	2,46±0,006**	2,49±0,005**
lim	2,27–2,53	2,42–2,53
Cv,%	5,92	4,54
Дискоїдальне зміщення, %	66,8	75,5
lim	16,67–96,67	30,00–90,00
Форма краю воскового дзеркальця п'ятого стерніту, %	90,0	94,8
lim	80,00–100,00	83,33–100,00

Примітка: різниця вірогідна при * — $P > 0,999$; ** — $P > 0,99$

Встановлено, що бджоли контрольної групи мали 66,8 % позитивних випадків дискоїдального зміщення та дослідної групи — 75,5 %. Випукла форма заднього краю воскового дзеркальця п'ятого стерніту бджіл контрольної групи складала 90,0 % випадків, дослідної групи — 94,8 %, що свідчить про їх належність до української породи.

Проте, середній показник по групі не повною мірою характеризує належність сімей до чистопородних. Індивідуальний відбір у селекційному процесі та формування племінного ядра пасіки потребує поглибленого аналізу експериментальних даних. Для прикладу наводимо дані індивідуального порівняння промірів довжини хоботка бджіл піддослідних сімей хмельницького внутрішньопородного типу та місцевої популяції. На рисунку 1 попарно розміщені циклограми аналізу промірів бджіл хмельницького походження (ліворуч) і місцевої популяції української породи (праворуч).



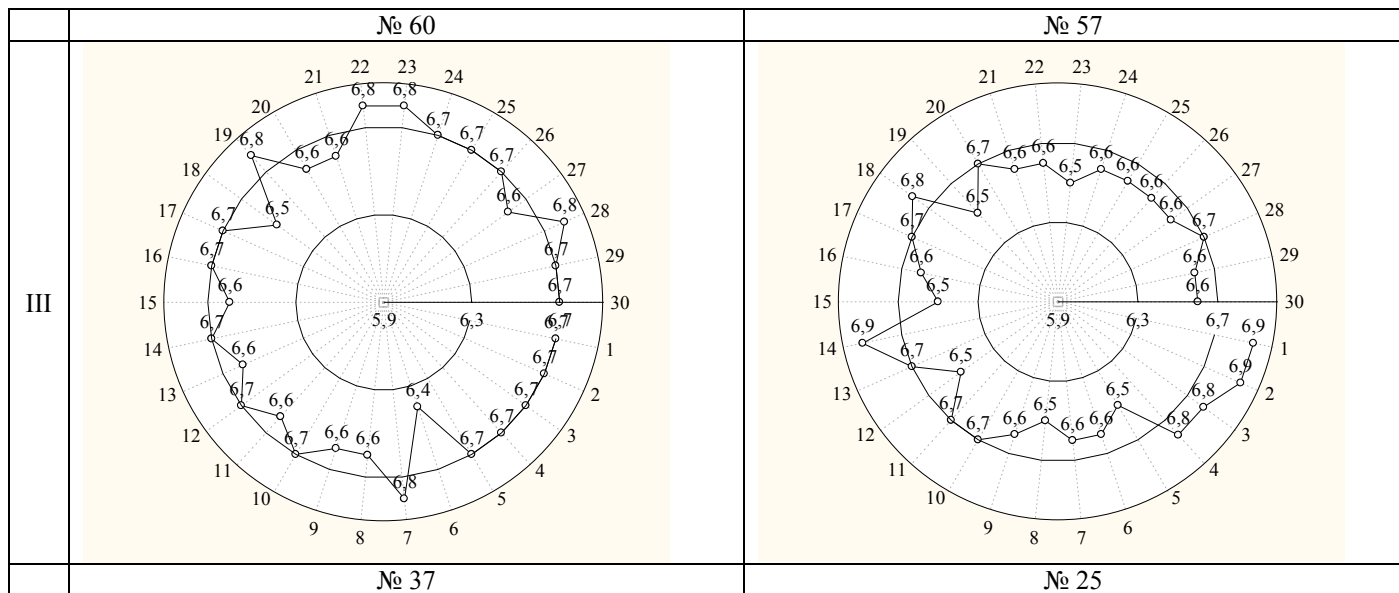


Рис. 1. Циклограми аналізу довжини хоботка бджіл підослідних сімей (ліворуч — хмельницька, праворуч — місцева)

Так, бджолиним сім'ям дослідної групи (хмельницький тип) властива довжина хоботка у вузьких межах коливань (від 6,5 до 6,6 мм або 6,6–6,7 мм) переважній більшості бджіл — 23–24 із 30 досліджених. Сім'ї аналоги з групи місцевої популяції мали в своєму складі лише близько половини бджіл з довжиною хоботка 6,6–6,7 мм. Інша частина їх була з ширшим діапазоном промірів (6,6–6,8 мм).

Тенденція подовження хоботка до 6,7–6,8 мм і вище вказує на відхилення від типової ознаки українських бджіл. Вона може проявлятися під впливом метизації від сірої гірської кавказької породи і навіть бджіл з Карпатського регіону. Тому за результатами вивчення екстер'єрних ознак місцевої популяції Миколаївської області є підстава вважати їх українськими, що незначною мірою відрізняються за середніми узагальненими даними від типових, до яких належать і бджоли внутрішньопородного типу «Хмельницький». Через наявність у складі місцевих сімей частини бджіл іншого породного походження вони не можуть використовуватись для селекції і репродукції.

Найбільшим рівнем інформативності, що дозволило встановити характерні особливості кожної із досліджених популяцій, виявилися системи, створені на основі затравок ампліфікації OPA-04 та S1. Так, на присутність генетичного матеріалу, що не є характерним для чистопородних бджолосімей Хмельницького типу, вказує наявність унікальних ДНК-фрагментів у особин контрольної групи: за системою OPA-4 в місцевій не поліпшеній популяції зафіксовано фрагменти розміром 730 п.н., 420, 340, 280 та 260 п.н., що зустрічалися з низькою частотою в межах 0,10–0,30. Фрагмент розміром 550 п.н. в контрольній групі зустрічався майже у всіх представників досліджуваної популяції — 90 % при повній його відсутності у чистопородних бджіл Хмельницького типу. За використання праймера OPA-1 встановлено в контрольній групі два маркерних амплікони розміром 1000 та 500 п.н. із частотою зустрічності 0,20 та 0,60, відповідно. Генетична система ISSR-S1 дозволила виявити низку ДНК фрагментів, притаманних лише місцевим бджолам Братського району Миколаївської області: алеломорфи розміром 1000, 760, 600, 560, 420 та 400 п.н. зустрічалися з низькою частотою в межах 0,1–0,2, тоді як фрагменти розміром 480 та 270 п.н. зустрічалися у 70 та 40 % бджіл контрольної групи, відповідно. RAPD праймер B-15 при достатньо високому рівні поліморфізму, що виявилася у представників двох досліджуваних популяцій, не дозволяє встановлення приватних алелів.

Генетико-популяційна характеристика дослідної і контрольної групи бджіл української породи проводилася із застосуванням стандартної комп'ютерної програми GELSTAT. Матриця вихідних даних для програми будувалася за принципом присутності-відсутності ДНК фрагмента на електрофореграмі в певному положенні фінгерпринтного спектра, відносно маркера молекулярної маси DNA-Ladder plus. Результати статистичного аналізу наведені в таблиці 3.

Популяційно-генетична характеристика двох популяцій бджіл української породи

Популяції	Середня кількість виявлених бендів	Середня кількість обстежених локусів	Рівень внутрігрупової схожості	Стандартна ступінь гетерозиготності (за формулою М. Нея)	Ефективна кількість алелів
Контрольна група	44,2	29,73	0,57	0,49**	3,2
Дослідна група	36,1	25,10	0,62*	0,44	3,2

Примітка: різниця вірогідна при * — $P > 0,95$; ** — $P > 0,99$

Згідно з отриманими даними, популяція бджіл дослідної групи характеризується нижчим рівнем генетичної гетерогенності, порівняно з контролем, оскільки рівень внутрігрупової схожості в другій групі бджолиних сімей вірогідно перевищував цей показник першої групи ($P > 0,95$). Критерієм генетичної консолідації слугує також значення стандартного ступеня гетерозиготності, оскільки цей показник у вибірці чистопородних бджіл Хмельницького типу вірогідно нижчий (0,44), ніж у представників контрольної групи — 0,49 (різниця вірогідна, $P > 0,99$).

Висновки

1. Поєднання результатів досліджень показників породної належності бджіл методом морфометрії та молекулярно-генетичної оцінки розширює знання з характеристики порід і сприяє відбору племінних бджолиних сімей.

2. Бджоли внутрішньопородного типу «Хмельницький» за екстер'єрними ознаками є більш консолідованими, ніж місцевої популяції Братського району Миколаївської області. Вони характеризуються консолідованим генотипом, високий рівень їх внутрігрупової схожості та дещо занижений рівень гетерозиготності створює сприятливі умови щодо зниження імовірності розщеплення бажаних генетичних ознак в наступних поколіннях.

3. Місцеві бджолині сім'ї контрольної групи характеризуються значним та небажаним для подальшої селекції рівнем генетичної гетерогенності, що підтверджується як значеннями основних генетико-популяційних параметрів, так і виявленням приватних ДНК-фрагментів, не характерних для чистопородних бджолиних сімей хмельницького внутрішньопородного типу.

O. I. Melitska, V. P. Polishchuk, S. I. Taran

THE USE OF COMPARATIVE AND MOLECULAR-GENETIC EVALUATION UNDER STUDY OF STRAIN GENUINENESS OF UKRAINIAN BEES

S u m m a r y

Results of research of exterior assessment of the main breed defines characteristic and genetic-population analysis by DNA-typing bees of Khmelnytsky bees of inbred type and the local population the Ukrainian bees of the Mykolayiv region are presented in this article. The systems created on the basis of seeds the amplification OPA-4 and S1, which posses the highest level of informational content, as to definitions to purity breeds of bees, were revealed in experiment.

E. I. Metliczkaya, V. P. Polishchuk, S. I. Taran

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ МОРФОМЕТРИИ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ЧИСТОПородНОСТИ УКРАИНСКИХ ПЧЕЛ

А н н о т а ц и я

Представлены результаты исследований пороодоопределяющих признаков экстерьера и генетико-популяционного анализа методом ДНК-типирования пчел хмельницкого внутривидового типа и местной популяции украинской породы Николаевской области. Обнаружены системы, образованные на основе затравок амплификации OPA-4 и S1, которые

обладают наибольшим уровнем информативности, относительно определения чистопородности пчел.

1. *Алпатов В. В.* Породы медоносной пчелы / В. В. Алпатов. — М. : Московское общество испытателей природы, 1948. — 184 с.
2. *Билаш Г. Д.* Селекция пчел / Г. Д. Билаш, Н. И. Кривцов. — М. : Агропромиздат, 1991. — 304 с.
3. *Ломаєв Г. В.* Вивчення екстер'єрних ознак бджіл: суб'єктивні фактори і шляхи їх виключення / Г. В. Ломаєв, В. А. Степанов, Н. В. Бондарева ; редкол.: Д. О. Мельничук та ін. // Науковий вісник Національного аграрного університету. — К., 2006. — Вип. 94. — С. 107–113.
4. *Метлицька О. І.* Оптимізація методу ДНК-фінгерпринтингу геному бджіл / О. І. Метлицька ; Редкол.: Д. О. Мельничук та ін. // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. — К., 2009. — Вип. 138. — С. 282–287.
5. *Метлицька О. І.* Ефективність генетичної паспортизації порід свиней із застосуванням ISSR-PCR маркерів / О. І. Метлицька, В. М. Балацький, М. М. Оніщенко // Вісник Полтавської державної аграрної академії. — 2005. — № 3. — С. 39–42.
6. *Поліщук В. П.* Українські бджоли/ В. П. Поліщук// Пасіка. — 2005. — № 8. — С.13–15.
7. *Поліщук В. П.* Методичні рекомендації з оцінювання чистопородності бджіл та створення внутрішньо породного типу / В. П. Поліщук, І. І. Головецький, О. І. Метлицька, В. В. Скрипник. — Київ : Астон, 2009. — 20 с.
8. *Поліщук В. П.* Внутріпородний тип українських бджіл «Хмельницький» / В. П. Поліщук, Д. О. Яцишин, І. І. Головецький, В. В. Скрипник // Пасічник. — 2006. — № 2. — С. 12–13.
9. *Goetze G.* Die Honigniene in natürlicher und künstlicher Zuchtauslese. Teil 1 und 2 / G. Goetze. — Hamburg und Berlin, 1964. — 212 s.
10. *Paplauskiene V.* The use ISSR method for the assessment of bee genetic diversity / V. Paplauskiene, V. Čeksteryte, et al // Biologija. — 2006. — № 3. — P. 16–20.

Рецензент: кандидат біологічних наук, доцент В. О. Мельник