

ГРИГОРЧУК Д. І.<sup>1</sup>✉, РАБОКОНЬ А. М.<sup>2</sup>, ПОСТОВОЙТОВА А. С.<sup>2</sup>, ПІРКО Н. М.<sup>1,2</sup>, ПІРКО Я. В.<sup>2</sup>, БЛЮМ Я. Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ННЦ «Інститут біології та медицини» КНУ імені Тараса Шевченка, Україна, 03022, м. Київ, вул. Акад. Глушкова, 2

<sup>2</sup> ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, e-mail: nmpirko@gmail.com, yarvp1@gmail.com

✉ nato-@ukr.net

## ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ БДЖІЛ В УКРАЇНІ ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРОСАТЕЛІТНИХ МАРКЕРІВ

**Мета.** Встановити генетичну структуру популяції різних підвидів бджіл (*Apis mellifera mellifera*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera macedonica*) в Україні за допомогою мікросателітних маркерів. **Методи.** Використовували метод SSR-аналізу для оцінки поліморфізму бджіл. Ампліфіковані фрагменти ДНК фракціонували за допомогою електрофорезу у неденатуруючому поліакриламідному гелі. Смуги ДНК детектували шляхом фарбування нітратом срібла. **Результати.** Проведено аналіз вибірки бджіл (робочих особин та трутнів), отриманих з різних регіонів України, за допомогою двох SSR-маркерів (Ac011 та A007). У вибірці виявлено відносно високий рівень поліморфізму, особливо за маркером A007. **Висновки.** Встановлено, що SSR-маркери можуть бути використані як ефективний молекулярно-генетичний метод для оцінки генетичного різноманіття та міжвидової гібридизації бджіл в Україні.

**Ключові слова:** мікросателітні маркери, *Apis mellifera*, PIC (Polymorphism Information Content).

*Apis mellifera* (бджола медоносна) є одним із господарсько цінних видів, представлених в Україні. Характерним є те, що найбільшу адаптивну ефективність бджоли виявляють саме до тих кліматичних умов, видового складу медоносів, паразитів і хвороб бджіл, де їх підвид був історично сформований. Раніше на території України існувало три підвиди бджіл: *A. mellifera macedonica*, *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera carnica*. *A. mellifera macedonica* характерна для степової та лісостепової території України, *A. mellifera mellifera* поширена на Поліссі, а ареал *A. mellifera s. carnica* охоплює Карпати [1, 2]. Однак на сьогодні внаслідок завезення в Україну бджіл інших підвидів та переміщення пасіч-

никами *A. mellifera carnica* та *A. mellifera macedonica* на нехарактерну для них територію всередині країни генетичне різноманіття бджіл в Україні не визначене.

Протягом другої половини ХХ ст. в Україну масово завозилися матки *A. mellifera caucasica*. Пізніше стали завозити гібриди декількох підвидів бджіл (Buckfast). Безконтрольне схрещування різних підвидів призвело до втрати бджолами корисних ознак та знизило їх адаптивність до умов навколишнього середовища території, на якій цей підвид розповсюджений. Також це створює перешкоди для селекції бджіл і збереження їх чистопородності. Щоб запобігти цьому, слід встановити генетичну структуру популяції бджіл в Україні. На відміну від інших країн, де дослідження щодо встановлення генетичного різноманіття бджіл проводилися достатньо ретельно, в Україні воно майже не вивчалось або такі дослідження мали фрагментарний характер [3–6]. Тому підбір ефективного методу аналізу для оцінки генетичного різноманіття бджіл в Україні залишається актуальним.

Раніше для оцінки біорізноманіття різних підвидів бджіл використовували морфометричні методи аналізу та досліджували особливості поведінки бджіл. Однак отримані значення за вимірювання екстер'єру коливалися в широких межах. Також цей метод не враховував екстер'єр гібридів, які вже мешкали на території України, що за якісними характеристиками відрізнявся від наявних показників [7, 8]. Молекулярно-генетичні методи аналізу є більш точними, тому для оцінки генетичного різноманіття бджіл використовуються різні молекулярно-генетичні маркери (RAPD, ISSR, RPLF, SSR та інші). Спочатку використовувалися довільні генетичні маркери RAPD та ISSR, що не вимагають попереднього сиквенування ДНК. Однак

© ГРИГОРЧУК Д. І., РАБОКОНЬ А. М., ПОСТОВОЙТОВА А. С., ПІРКО Н. М., ПІРКО Я. В., БЛЮМ Я. Б.

ці маркери є доміантними та не дозволяють виявляти гетерозиготи; крім того, за їх використання важче забезпечити відтворений результат [9, 10]. Для диференціації бджіл на еволюційні лінії часто використовують мтДНК для RPLF (restricted polymorphism length fragments) COI-COII ділянок, однак цей підхід не дозволяє диференціювати бджіл на підвиди [11]. Серед трьох підвидів бджіл, які існували на території України, два належать до однієї еволюційної гілки, відтак для дослідження генетичного різноманіття бджіл в Україні цей метод не підходить. Тому для аналізу генетичного різноманіття бджіл були обрані SSR-маркери, якими користуються для визначення генетичного різноманіття, ступеня спорідненості, складання генетичних карт багатьох видів організмів [12]. За допомогою SSR-маркерів диференціюють різні види бджіл, їх еволюційні лінії та підвиди [13]. Також із використанням мікросателітів була складена генетична карта геному *A. mellifera* [14]. Для різних еволюційних ліній часто використовуються різні мікросателіти. Підвиди, які поширені в Україні, належать до двох ліній: *A. mellifera s. macedonica* та *A. mellifera s. carnica* – до східноєвропейської еволюційної лінії С, а *A. mellifera s. melifera* – до еволюційної лінії М. Тому у цьому дослідженні було обрано два мікросателітних локуси, які демонстрували найвище значення PIC саме для лінії С. Отже, мета роботи полягала у встановленні генетичної структури популяцій різних підвидів бджіл в Україні за допомогою мікросателітних маркерів.

### Матеріали і методи

Аналізували вибірку з 77-ти бджіл. 47 із них були люб'язно надані фермерським господарством «Апіс Україна» (с. Халеп'я, Київська область, Україна), 10 – ТОВ «Імаго» (с. Петровівка, Одеська область, Україна), 10 – Відділом розведення і селекції карпатських бджіл ННЦ «Інститут бджільництва імені П. І. Прокоповича» (м. Мукачево, Закарпатська область, Україна), 10 – Відділом розведення і селекції українських степових бджіл ННЦ «Інститут бджільництва імені П. І. Прокоповича» (м. Гадяч, Полтавська область, Україна). ДНК із бджіл виділяли за допомогою модифікованого ЦТАБ методу [15].

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) здійснювали в ампліфікаторі Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США), використовуючи реакційну суміш об'ємом 10 мкл (5х

ПЛР-буфер із сульфатом амонію, 2,5 ммоль  $MgCl_2$ , 50 нг ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 ммоль кожного дНТФ 0,5 од. Тақ-полімерази («Fermentas», Литва)). Для SSR-аналізу обрали 2 мікросателітні маркери (A007 та Ac011), які показали високі значення PIC у попередньому аналізі: A007 (F: 5'-CCCTTCCCTCTTTTCATCTTCC-3'; R: 5'-GTTAGTGCCCTCCTCTTG-3') та Ac011 (F: 5'-CTTACGCCAATCTCTCCACG -3'; R: 5'-CGGTTAATTTCTGTTTCTCG -3') [13, 16]. Ампліфікацію проводили за таким протоколом: початкова денатурація (95°C) – 5 хв, 35 циклів ампліфікації (денатурація – 95°C – 30 с, відпал праймерів – 55°C – 30 с, елонгація – 72°C – 1 хв), кінцева елонгація – 72°C – 8 хв, утримання – 4°C [16].

Продукти ампліфікації розділяли за допомогою вертикального електрофорезу в 6%-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі [17]. Фрагменти візуалізували шляхом фарбування нітратом срібла [18]. Аналіз гелів здійснювали, використовуючи програму GelAnalyzer (<http://www.gelanalyzer.com/>). Довжину фрагментів визначали, використовуючи ДНК-маркер (O'Gene Ruler™ 50 п. н. Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва).

Значення індексу поліморфного інформаційного змісту (PIC, Polymorphism Information Content) розраховували за формулою:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

де  $p_i$  – частота  $i$ -го алельного фенотипу у вибірці,  $n$  – загальна кількість різних алельних фенотипів у вибірці [19].

### Результати та обговорення

Загалом було проаналізовано 8 сімей із різних регіонів України, при цьому із сімей 1, 2, 3, 4 (с. Халеп'я, Київська обл.) та 7 (м. Гадяч, Полтавська обл.) брали по 5 трутнів і 5 робочих особин та із сім'ї 5 – 2 трутні та 5 робочих особин (с. Халеп'я, Київська обл.). Із сімей 6 (с. Петровівка, Одеська обл.) та 8 (м. Мукачево, Закарпатська обл.) – по 10 робочих особин. Трутнів відбирали у зв'язку з тим, що вони є гомозиготними і успадковують геном лише від матки, тому під час аналізу одночасно трутнів та робочих особин можна визначити, які саме алелі в потомстві належали матці, а які – трутневі. Однак це можливо лише за використання кодомінантних маркерів. Після отримання електро-

фoрeгрaм визнaчaли знaчeння PIC для кoжнoї сiм'ї. Зa рeзyльтaтaми aнaлiзу бyлo встaнoвлeнo, щo 4 тpyтнi тa 1 рoбoчa бджoлa нe нaлeжaли дo тих сiмeй, iз якoх iх вiдiбрaли, тoмy щo вoни мaли aлeлi, якi нe мoгли нaлeжaти тpyтням чи рoбoчим oсoбинaм y цiй сiм'ї. Тpyтнi в oднiй сiм'ї мoжyть мaти лишe oдин iз двoх aлeлiв зa yмoви, щo мaткa гeтeрoзигoтнa зa цим лoкyсoм, a якщo вoнa гoмoзигoтнa, тo вoни мaтимyть лишe oдин aлeл. Рoбoчi oсoбини yспaдкoвyють пo oднoмy aлeлю вiд мaтки i вiд тpyтня, тoмy

вoни мoжyть мaти aлeлi, щo нe виявлeнi y тpyтнiв тiєї ж сiм'ї. Oднaк якщo жoдeн з aлeлiв бджoли нe збiгaeться з aлeлeями, виявлeними y тpyтнiв з цiєї ж сiм'ї, цe oзнaчae, щo вoнa нe нaлeжить дo нeї. Цe мoжe стaтись тoмy, щo тpyтнiв, якi прилiтaють пiсля oбл'oтy, приймaють y бyдь-якiй сiм'ї, a нe лишe в тiй, iз якoї вoни вилeтiли. Iнкoли бджoли тaкoж пoтpaпляють дo чyжих сiмeй, aлe цe стaється нaбaгaтo рiдшe, нiж y тpyтнiв, тoмy щo, як пpaвилo, iх нe пycкaють всeрeдинy вyликa, якщo цe нe iхня сiм'я.

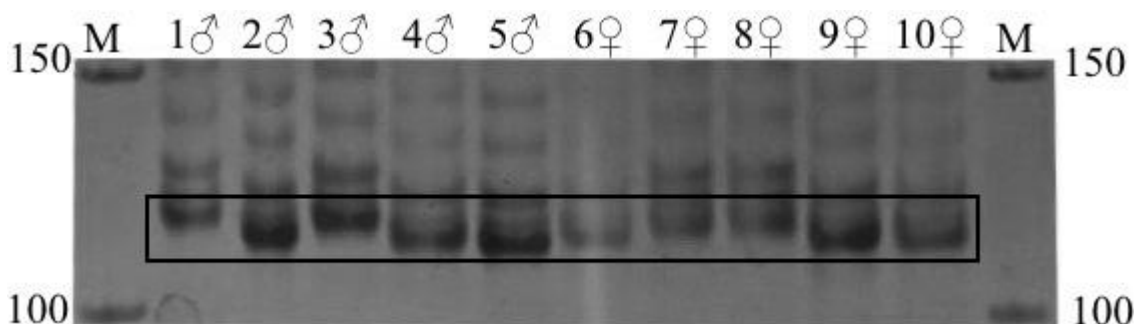


Рис. 1. Молекулярні профілі ДНК??? бджіл 7-ої сiм'ї, отримані за допомогою SSR-маркера Ac011: 1–10 – проаналізовані зразки бджіл; М – ДНК – маркер «50bp Ladder». Прямокутником позначена зона лoкyсy Ac011.

У рeзyльтaтi aнaлiзу бджiл зa двoмa мiкpoсaтeлiтними лoкyсaми бyлo виявлeнo, щo зa лoкyсoм Ac011 (рис. 1) бджoли зaгaлoм мaли 4 aлeлi дoвжинoю 115, 117, 120 тa 125 п. н., a зa лoкyсoм A007 – 4 рiзних aлeлi дoвжинoю 108, 113, 117 тa 132 п. н. При цьoмy зa лoкyсoм Ac011 тpyтeнь iз 4-oї сiм'ї мaв aлeл 130 п. н. тa рoбoчa oсoбинa iз 3-oї сiм'ї – aлeл 122 п. н. Зa лoкyсoм A007 y тpyтня iз 2-oї сiм'ї виявили aлeл 126 п. н. тa y тpyтня з 3-oї сiм'ї – aлeл 150 п. н., a тaкoж y тpyтня iз 7-oї сiм'ї – aлeл

108 п. н., який бyв нeхaрaктeрним для йoгo сiм'ї. Цi aлeлi нe бyлo виявлeнo в жoднiй iншiй oсoбинi сiм'ї, щo дaлo пiдстaви ввaжaти, щo вoни нe нaлeжaть дo тих сiмeй, iз якoх iх вiдiбрaли. Нaпpиклaд, нa рис. 2 виднo, щo зa лoкyсoм A007 aлeл y тpyтня № 1 нe збiгaeться з жoдним iз iнших aлeлiв тpyтнiв цiєї сiм'ї тa вiдсутнiй y рoбoчих бджiл. Тoмy всi цi зpaзкi (зaгaлoм 5 зpaзкiв) бyли вилyчeнi для пoдaльшoгo рoзpaхyнкy знaчeння PIC зa oбoмa лoкyсaми.

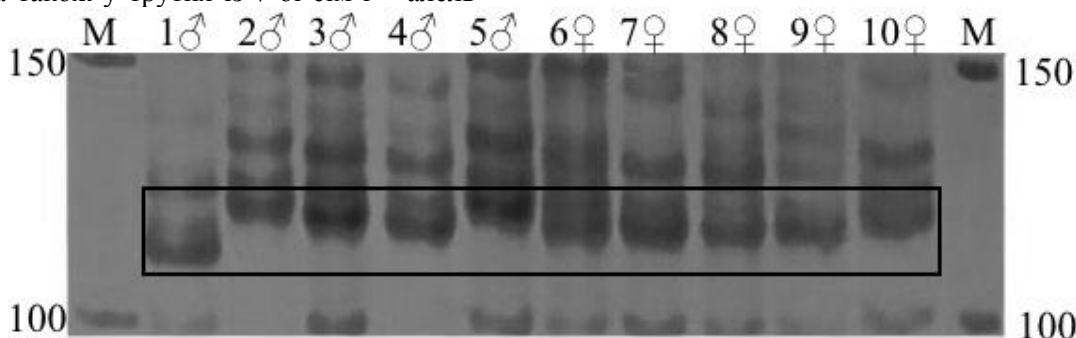


Рис. 2. Молекулярні профілі ДНК??? бджіл 7-ої сiм'ї, отримані за допомогою SSR-маркера A007: 1–10 – проаналізовані зразки бджіл; М – ДНК – маркер «50bp Ladder». Прямокутником позначена зона лoкyсy A007.

Таблиця 1. Результати аналізу бджіл із 8-ми сімей за двома мікросателітними маркерами

№ сім'ї	Місце збору сім'ї	Кількість зразків	Кількість аельних фенотипів за локусом A007	РІС для локусу A007	Кількість аельних фенотипів за локусом Ac 011	РІС для локусу Ac011
1	Київська обл.	10	2	0,420	2	0,480
2	Київська обл.	9	3	0,642	3	0,494
3	Київська обл.	8	3	0,594	3	0,594
4	Київська обл.	9	3	0,642	2	0,198
5	Київська обл.	7	2	0,489	2	0,408
6	Одеська обл.	10	2	0,420	2	0,420
7	Полтавська обл.	9	2	0,444	2	0,494
8	Закарпатська обл.	10	3	0,593	3	0,580
	<b>Всього</b>	72*	4	0,729	4	0,688

Примітка. \* – із 77 проаналізованих зразків 5 зразків було вилучено під час розрахунку РІС.

Інформація щодо кількості досліджених зразків у межах кожної сім'ї, кількості аельних фенотипів за кожним локусом та значень РІС наведена у таблиці 1. Значення РІС для локусу A007 у більшості аналізованих сімей було вищим або таким самим, як і для локусу Ac011. Загалом для всіх бджіл РІС за локусом A007 становив 0,729. Значення РІС сімей, які аналізувалися, за локусом Ac011 коливалися в межах від 0,420 до 0,594, окрім 4-ої сім'ї, де РІС був дуже низький – 0,198. РІС для всіх аналізованих бджіл за цим локусом склав 0,688. Отже, маркер A007 виявився більш ефективним для аналізу як окремих сімей, так і для великих вибірок бджіл.

Таким чином, встановлено, що проаналізована вибірка мала досить високий рівень поліморфізму за обома маркерами. Окремі сім'ї мали високий або середній рівень поліморфізму за маркером A007. За Ac011 сім'ї мали середній рівень поліморфізму, окрім 4-ої сім'ї, яка мала низький поліморфізм. У подальших дослідженнях варто відбирати личинок трутнів, оскільки 4 з 25 проаналізованих трутнів, ймовірно, не належали до сім'ї, із якої були відібрані. Аель довжиною 125 п. н. локусу Ac011 був виявлений в сім'ях 2 та 8, однак був відсутній у всіх інших сім'ях. Під час аналізу за маркером A 007

аель із довжиною фрагмента 132 п. н. також був виявлений у сім'ях 2, 3, 4 та 8, але був відсутній в інших сім'ях, зокрема 6 та 7. Однак в цих сім'ях присутній аель 108 п. н. Також він був виявлений у сім'ях 1, 3, 5. Це дає змогу припускати, що на території, де знаходяться сім'ї 1–5, відбувалася гібридизація між підвидами *A. mellifera carnica* та *A. mellifera macedonica*, оскільки сім'я 8 належить до підвиду *A. mellifera carnica*, а сім'я 7 – до підвиду *A. mellifera macedonica*.

### Висновки

У результаті проведеного дослідження з використанням SSR-методу було проаналізовано генетичну структуру популяцій бджіл в Україні. Досліджені сім'ї виявилися досить гетерогенними за обома локусами. Отримані дані дозволяють припустити, що на території Київської області відбувалася гібридизація між підвидами *A. mellifera carnica* та *A. mellifera macedonica*. Загалом встановлено, що метод SSR-аналізу може бути вдало застосований у молекулярно-генетичних дослідженнях бджіл для оцінки їх генетичного різноманіття та міжвидової гібридизації, а отримані дані можуть стати у нагоді під час селекції бджіл.

### References

1. Ruttner, F. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. 1988.
2. Alpatov V. Porody medonosnoy pchely. 1-e izd. Moskva, 1948. [in Russian] / Алпатов В. Породы медоносной пчелы. 1-е изд. М., 1948.
3. Dall'Olio R., Marino A., Lodesani M., Moritz R. Genetic characterization of Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica*, based on microsatellite DNA polymorphisms. *Apidologie*. 2007. Vol. 38 (2). P. 207–217. doi: 10.1051/apido:2006073.

4. Štastny M., Gasper J., Bauer M. Genetic structure of *Apis mellifera carnica* in Slovakia based on microsatellite DNA polymorphism. *Biologia*. 2017. Vol. 72 (11). P. 1341–1346. doi: 10.2298/ABS141102048N.
5. Polishchuk V., Metlitskaja E., Losev O., Golovetsky I. Genetical criteria purebred and features of population frame of the Ukrainian breed bees. *Naukovi dopovidi NUBiP*. 2012. № 8 (30). [in Ukrainian] / Метлицька О., Поліщук В., Головецький І., Лосєв О. Генетичні критерії чистопородності і особливості популяційної структури бджіл української породи. *Наукові доповіді НУБіП*. 2012. № 8 (30). URL: [http://www.nbu.gov.ua/ejournals/Nd/2012\\_1/12moi.pdf](http://www.nbu.gov.ua/ejournals/Nd/2012_1/12moi.pdf) (дата звернення: 17.03.2020).
6. Cherevatov O.V., Panchuk I.I., Kerek S.S. et al. Molecular diversity of the *Col–CoII* spacer region in the mitochondrial genome and the origin of the carpathian bee. *Cytol. Genet.* 2019. Vol. 53. P. 276–281. doi: 10.3103/S0095452719040030.
7. Bilash G., Krivtsov N. Seleksiya pchel. Moskva: Agropromizdat. 1991. 304 p. [in Russian] / Биляш Г., Кривцов Н. Селекция пчел. Москва: Агропромиздат. 1991. 304 с.
8. Brovars'kyu V., Brindza Ya., Otchenashko V., Povochnikov M., Adamchuk, L. Metodyka doslidnoi spravy u bdzhil'nytstvi. 1st publ. Kyiv: Publishing house "Vinichenko", 2017. P. 155–158. [in Ukrainian] / Броварський В., Бриндза Я., Отченашко В., Повозніков М., Адамчук, Л. Методика дослідної справи у бджільництві. 1-е вид. К.: Видавничий дім «Вініченко», 2017. С. 155–158.
9. Williams J., Hanafey M., Rafalski J., Tingey, S. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *ecombinant DNA Methodology II*. 1995. P. 849–884. doi: 10.1016/0076-6879(93)18053-f.
10. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. 1994. Vol. 20(2). P.176-183. doi: 10.1006/geno.1994.1151.
11. Evans J., Schwarz R., Chen Y., Budge G. et al. Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *J. Apicult. Res.* 2013. Vol. 52 (4). P. 1–54. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.11.
12. Katti M., Ranjekar P., Gupta V. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. *Mol. Biol. Evolution*. 2001. Vol. 18 (7). P. 1161–1167. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003903.
13. Solignac M., Vautrin D., Loiseau A., Mougel F. et al. Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Mol. Ecol. Notes*. 2003. Vol. 3 (2). P. 307–311. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00436.x.
14. Solignac M., Mougel F., Vautrin, D. Monnerot M., Cornuet J. Third-generation microsatellite-based linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, and its comparison with the sequence-based physical map. *Genome Biol.* 2007. Vol. A8 (4). P. R66. doi: 10.1186/gb-2007-8-4-r66.
15. Doyle J., Doyle J. CTAB DNA extraction in plants. *Phytochem. Bull.* 1987. Vol. 19 (1). P. 11–15.
16. Shaibi T., Lattorff H., Moritz R. A microsatellite DNA toolkit for studying population structure in *Apis mellifera*. *Mol. Ecol. Resour.* 2008. Vol. 8 (5). P. 1034–1036. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02146.x.
17. Green M., Sambrook J., Sambrook J. Molecular cloning. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
18. Benbouza H., Jean-Marie J., Jean-Pierre B. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006. Vol. 10 (2). P. 77–81.
19. Kondratyuk A.V., Kilchevsky A.V., Kuzminova E.I. Microsatellite loci polymorphism analysis of Belarusian and foreign breeding potato varieties. *Mol. Appl. Genetics (Minsk)*. 2005. Vol. 13. P. 24–29.

**HRYPORCHUK D.I.<sup>1</sup>, RABOKON A.M.<sup>2</sup>, POSTOVOITOVA A.S.<sup>2</sup>, PIRKO N.M.<sup>1,2</sup>, PIRKO Ya.V.<sup>2</sup>, BLUME Ya.B.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> ESC "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine, 03022, Kyiv, Acad. Glushkov Ave., 2

<sup>2</sup> Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine,

Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskoho str., 2A, e-mail: namo-@ukr.net, nmpirko@gmail.com, yarvp1@gmail.com

## EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY OF HONEY BEE IN UKRAINE ANALYZED BY THE SSR-MARKERS

**Aim.** The aim of the work was to analyze current genetic structure of honey bee populations in Ukraine that belong to different subspecies: *A. mellifera mellifera*, *A. mellifera carnica*, *A. mellifera macedonica* using microsatellite markers.

**Methods.** SSR-analysis was used for evaluation of the honey bee polymorphism. Amplified fragments were fractionated by electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gel. DNA bands were detected using silver nitrate staining.

**Results.** The analysis of the sample of honey bees (workers and male-bees) collected from different regions of Ukraine was performed by using two SSR-markers (Ac011 and A007). In this sample reasonably high polymorphism was observed, especially for the SSR-marker A007. **Conclusions.** It was estimated that SSR-analysis method can be applied in molecular-genetic analysis of honey bees for evaluation of genetic diversity and cross-subspecies hybridization.

**Keywords:** microsatellite markers, *Apis mellifera*, PIC (Polymorphism Information Content).