

**Метлицька Олена**

д.с.-г.н., с.н.с.,

**Корінний Сергій**, докторант

Інститут розведення і генетики НААН ім. М.В. Зубця,  
с. Чубинське Київської області

**Супрович Тетяна**

д.с.г.н., професор, завідувач кафедри  
Подільський державний аграрно-технічний університет  
М. Кам'янець-Подільський

**Строяновський Василь**

к.с.-г.н., проректор з навчально-науково-виробничих питань  
розвитку і адміністративно-господарської діяльності  
Подільський державний аграрно-технічний університет  
М. Кам'янець-Подільський

## **РОЗРОБКА ІНФОРМАТИВНИХ STR-МАРКЕРІВ ДЛЯ ВИРІШЕННЯ ПРОБЛЕМ ВІДНОВЛЕННЯ ГЕНОФОНДУ БДЖІЛ УКРАЇНСЬКОГО СТЕПОВОГО ПІДВИДУ**

Масове завезення в Україну бджіл, переважно сірої гірської кавказької, карніки та гібридного бакфасту призвело до безсистемної метизації аборигенної української степової бджоли і поставило її на межу повного зникнення. При цьому починає втрачатися цінний генофонд цієї породи, що століттями формувався на тлі специфічних умов Степу і Лісостепу України.

Методологічними основами системи збереження і відновлення генофонду української степової бджоли має бути її селекція, спрямована на підвищення консолідованості основних продуктивних ознак: сили сімей, зимостійкості,

опірності інфекційним і паразитарним захворюванням, високим репродуктивним якостям маток, медової, прополісної та пилкової продуктивності. Дослідження явища андрогенного запліднення матки, змішування сперми у сперматеці, розподіл обов'язків між робочими бджолами у гнізді, перевага у виборі певних личинок при вирощуванні майбутніх маток у колонії – це далеко не повний перелік важливих у бджільництві питань, на які стало можливим відповісти лише після закінчення повного секвенування геному бджоли медоносної і появи високо поліморфних ДНК маркерів. Серед таких маркерних систем набуває подальшого розвитку створення мікросателітних маркерів (STR) [1,2] за допомогою яких були описані генетичні особливості підвидів і окремих популяцій бджіл. На початковому етапі знаходиться процес створення уніфікованих систем мікросателітного аналізу бджіл із занесенням отриманих даних до міжнародних електронних баз. Проте, у зв'язку із величезним підвидовим різноманіттям медоносних бджіл у кожному окремому випадку виникає необхідність створення генетичних маркерів із огляду на молекулярно-генетичні особливості досліджуваного підвиду.

Створення бджолиних сімей з численними батьківськими лініями робочих бджіл є еволюційно виправданим, оскільки такі сім'ї демонструють кращу пристосованість до умов навколишнього середовища [4]. Низка авторів повідомляють про те, що збільшення генетичної дисперсії бджолиних сімей призводить до підвищення їх продуктивного потенціалу [5], а екстремальне поліандрогінне запліднення бджолиних маток збільшує виробництво комунікативних сигналів робочих бджіл, що полегшує пошук та використання харчових ресурсів, отже збільшує медову продуктивність [6]. Таким чином, створення високоінформативних поліморфних систем мікросателітних маркерів для дослідження бджолиних сімей українського степового підвиду як на рівні окремих індивідів бджолиних сімей, так і на рівні всієї популяції є своєчасним і актуальним завданням.

Метою досліджень було: створення високо поліморфних інформативних мікросателітних маркерів для дослідження етологічних і популяційних особливостей бджіл українського степового підвиду (*Apis mellifera acervorum*) в системі заходів із вдосконалення і збереження їх генофонду.

Для дослідження було відібрано зразки біологічного матеріалу бджіл: частини тіла імаго бджіл (голова та груди) з ПП Калашнюк, с. Мачухи Полтавського району Полтавської області (по 10 особин із 5 вуликів) у процесі проведення етологічного досліду з визначення ступеня злобливості бджолиних сімей. Виділення ДНК із біопроб бджіл проводили за використання 20% іонообмінної смоли «Chelex-100®». Для проведення генотипування бджіл використовували локус-специфічну ПЛР (STR-SSR технологія). Структура праймерів, використаних для ініціації ПЛР синтезу, наведена у табл. 1

1. Нуклеотидна структура і температура випалювання праймерів для генотипування бджіл

Назва праймерів	Нуклеотидна структура праймера	Температура випалювання в ПЛР
AJ509537-F	3'-TCGTCCCATTATATGGTTCGGGCA-5'	60
AJ509537-R	3'-TATAAAGCGCGCGACACCGGTA-5'	60
AJ509586 -F	3'-AACTCGACTGGTGTGCATCG-5'	60
AJ509586 -R	3'-TCTTTCGCACACCAGCAG-5'	60
AF140070-F	3'-ACGTTGTCTGAAGCTTGAC-5'	60
AF140070-R	3'-TCCAATAGCGGATGTGCT-5'	60

Програма для проведення ампліфікації мікросателітних локусів бджоли медоносної у локус-специфічній ПЛР із праймерами власного дизайну, зазначеними в табл.1 була підібрана емпіричним шляхом: попередня денатурація: 95<sup>0</sup> – 4 хвилини; наступні 35 циклів: 95<sup>0</sup> - 30с., 60<sup>0</sup> - 30с., 72<sup>0</sup> – 30с., заключну елонгацію синтезу проводили при температурі 72<sup>0</sup>С протягом 5 хвилин. Продукти ампліфікації з обраними праймерами розділяли у 8%

поліакриламідному гелі в денатуруючих умовах з мочевиною при напрузі 300В протягом 1,5 годин. Забарвлення гелів здійснювали протягом 5 хв. в розчині бромистого етидію, після багаторазової відмивки дистильованою водою, електрофореграми візуалізували на транслюмінаторі з наступним фотодокументуванням гелів. Розміри продуктів ампліфікації для кожного досліджуваного локусу мікросателітів бджіл після проведеного аналізу окремих робочих особин бджіл української степової поради коливалися у наступних межах: для AJ509537 – 140-150 п.н., AJ509586 – 110-125 п.н., AF140070 – 80-100 п.н.

Для підбору праймерів власного дизайну до поліморфних ділянок мікросателітної ДНК бджоли медоносної застосовували інформацію міжнародної бази GeneBank. Аналіз структури обраних нуклеотидів, вирівнювання обраних послідовностей, розрахунок вірогідності комплементарного перекривання їх послідовностей в ПЛР, орієнтовний розмір отриманих продуктів реакції, теоретично розраховану температуру випалювання на основі термодинамічних показників «найближчих сусідів» здійснювали у програмі FastPCR ver 6.1. Етологічні експерименти виконували за методикою (Guzman-Novoa, 2003) у власній модифікації.

При виборі мікросателітних локусів для створення власних STR систем популяційно-генетичного аналізу українських степових бджіл нами було проаналізовано первинні послідовності ДНК, доступні у базі даних GenBank: AJ509287, AJ509279, AJ509239, S58549, AJ509245, AJ509256, AJ509292, AJ509586, AF140070, AJ509671, AJ509405, AJ509466, AJ509537 за допомогою програми FastPCR ver 6.1 та сконструйовано праймери. Секвенування зазначених мікросателітних локусів було проведене на основі біологічного матеріалу бджіл спорідненого виду *Apis mellifera carnica*. Серед зазначених генетичних локусів шляхом застосування вищезгаданого програмного забезпечення, нами було обрано три фрагменти із них, а саме: AJ509537, AJ509586 та AF140070 для яких сконструйовано праймери оптимальної структури власного дизайну. Для всіх трьох пар праймерів визначена

оптимальна температура випалювання складала +60С, що підтвердило розрахунки програми FastPCR щодо можливості їх об'єднання в систему мультиплекс.

Рядом дослідників було висловлене припущення з приводу того, що представники різних патріліній (нащадків від одного трутня) можуть виконувати у колонії бджіл певні функції і що цей розподіл певним чином залежить від батьківського походження. Нами було проведено перевірку цієї гіпотези з допомогою створених мікросателітних маркерів.

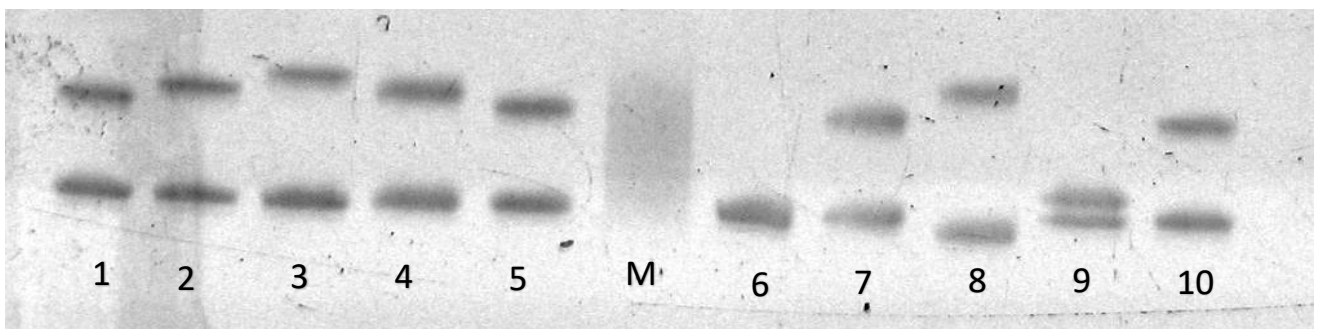


Рис.1. Електрофореграма ПЛР-продуктів локусу AJ509537. 1-5: генотипи робочих бджіл-стінгерів української степової породи, вулик 26б, М- маркер молекулярної маси рUC19/MspI, 6-10: генотипи робочих бджіл- стінгерів, вулик 53

Відомо, що всі робочі бджоли у вулику є повними сестрами за материнським генотипом і напівсестрами за своїми батьками. Середня кількість трутнів, що запліднюють одну бджолину матку варіює в широких межах 5-28. В дослідженнях з визначення кількості патріліній у одній бджолиній сім'ї за допомогою мікросателітного аналізу, середній рівень розрахованих патріліній не перевищував 10-12 через неможливість чіткого визначення генотипу гетерозиготної матки через генотип її дочок [1]. При дослідженні генотипу робочих бджіл стінгерів із вулика 26б нами були визначені три різні генотипи із п'яти особин: дві з генотипом 140/145; дві - 140/147 і одна - 140/150 п.н. (рис.1). Співпадіння одного алеля у всіх робочих бджіл цього вулика свідчить про гомозиготний генотип матки 140/140. Досліджені бджоли вулика 53П також відносилися до різних патріліній, загалом їх було виявлено чотири: одна

особина гомозиготного генотипу: 140/140, дві – 140/145, одна 140/150 і одна 140/142 (рис.1). Як і у попередньому випадку, всі напівсестри вулика мали однаковий алель 140 п.н., що свідчить про гомозиготний генотип матки за цим генетичним локусом.

При дослідженні генотипів робочих бджіл за локусом AF140070 у бджіл стінгерів вулику 28 нами було визначено лише два варіанти генотипів: у чотирьох особин - 110/118 і у однієї - 115/118. В цьому випадку було досить складно визначити генотип бджоломатки. Не виключно, що він може бути і гетерозиготним, проте однозначно материнським алелем є фрагмент мікросателіту розміром 118 п.н. За іншою створеною маркерною системою, локусом AF140070 було визначено три варіанти генотипів робочих бджіл: дві особини з генотипами 80/85 дві - 85/88 і одна бджола гомозиготного генотипу 85/85 що, не виключно, співпадає з генотипом бджоломатки цього вулика.

Таким чином, із створених нами маркерних систем найбільш інформативним, що дозволив виявити більшу кількість алельного різноманіття в межах однієї бджоломатки сім'ї, виявився локус AJ509537 що дозволив встановити п'ять різних алелів одночасно. Дві інші системи показали можливість визначення меншої кількості патріліній в межах однієї сім'ї.

### Список використаних джерел

- 1 DNA fingerprinting method for identifying patriline in honeybee colonies// *Apidologie*.-1998.- V.29.-P.255-263.
2. Moritz R.F.A., Kryger P., Koeniger G., Koeniger N., Estoup A., Tingek S., High degree of polyandry in *Apis dorsata* queens detected by microsatellite variability// *Behav. Ecol. Sociobiol.*- 1995.- V.37.- P.35. Neumann M., Schmitzová J., Klauđiny J. Simúth S., Felder M., Moritz R. A simple, non-radioactive 7-363.
4. Jones J.C., Myerscough M.R., Graham S., Oldroyd B.P. Honey bee nest thermoregulation: diversity promotes stability// *Science*.- 2004.- V. 305.- P.402-404.
5. Mattila H.R., Seeley T.D. Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness// *Science*.- 2007.- V. 317.- P.362-364.

6. Mattila H.R., Seeley T.D. Genetic diversity in honey bee colonies enhances productivity and fitness// Science.- 2007.-V.317.-P.362-364.