

Markery DNA w hodowli zachowawczej rodzimych linii pszczoły miodnej

Andrzej Oleksa, Jarosław Burczyk

*Uniwersytet Kazimierza Wielkiego, Katedra Genetyki, Instytut Biologii Eksperymentalnej,
ul. Chodkiewicza 30, 85-064 Bydgoszcz*

Pszczoła miodna jest jednym z najważniejszych gatunków dla człowieka pod względem ekonomicznym. Znaczenie jej nie sprowadza się tylko do dostarczania szeroko znanych

produktów pszczelich, takich jak miód, wosk czy propolis, gdyż ich wartość jest stosunkowo niewielka w porównaniu z efektem ekonomicznym, jaki przynosi zapylenie upraw (Free, 1993).



Fot. 1. Pszczoły linii Augustowska – *Bees of Augustowska line* (fot. A. Oleksa)

* Praca finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: „Ocena zróżnicowania genetycznego pszczoły miodnej *Apis mellifera* L. z zamkniętego rejonu hodowli w Puszczy Augustowskiej” (projekt nr N311 029 32/2255).

Także znaczenie pszczoły miodnej dla naturalnych ekosystemów wynika z jej roli wysoko sprawnego, uniwersalnego zapylacza (Kevan i Baker, 1983). Mimo to, w Polsce, jak i na całym świecie, stale zwiększa się zagrożenie rodzin pszczelich przez choroby i patogeny (Cox-Foster i in., 2007) oraz rosnące skażenie środowiska (Ponikvar i in., 2005), zaś deficyt zapylaczy jest coraz częściej wskazywany jako jeden z głównych powodów uzyskiwania niskich plonów (Kevan i Phillips, 2001). W tej sytuacji szczególnego znaczenia nabiera ochrona zasobów genetycznych pszczół jako cennego źródła genów warunkujących adaptację do zmian biotycznych i abiotycznych środowiska (Programy hodowlane..., 2005–2008). Zanik rodzimych linii pszczoły, o cechach mniej pożądanym z ekonomicznego punktu widzenia, stanowi problem hodowlany, gdyż dla utrzymania produktywności organizmów użytkowych konieczna jest możliwość modyfikacji i wymiany odmian. Podstawową rolę w ich tworzeniu odgrywają geny dzikich populacji oraz lokalnych odmian hodowlanych, często o niskich walorach użytkowych. Intensywna hodowla opierająca się na selekcji wąskiego zestawu cech prowadzi zazwyczaj do bezpowrotnej utraty części naturalnej zmienności genetycznej (Hartl i Clark, 2007). W tym kontekście szczególnie istotna wydaje się ochrona populacji rodzimych, nawet dziko żyjących, będących nośnikami unikatowych genów, bowiem pozwala ona na zapobieganie degradacji genetycznej gatunku.

Występujące pierwotnie na obszarze Polski pszczoły miodne należały niegdyś do podgatunku *Apis mellifera mellifera*, znanego jako „ciemna pszczoła” (ang. *dark bee*). W przeciągu ostatniego stulecia pszczoły rodzime zostały jednak w dużej mierze zastąpione przez pszczoły importowane, pochodzące głównie z południa Europy (Gromisz, 1997). Zanik rodzimej puli genowej pszczoły miodnej na rzecz genów ukształtowanych w odmiennych warunkach klimatycznych i pożytkowych jest niepokojący, ponieważ prowadzi do spadku zdolności adaptacyjnych nowych populacji do lokalnych warunków, a wymieszanie pul genowych typowych dla różnych optimów środowiskowych prowadzi często do zjawiska określanego jako depresja outbreedingowa, czyli zmniejszenie zdolności dostosowawczych mieszańców. Pro-

blem ochrony rodzimych form pszczoły miodnej został w Polsce dostrzeżony stosunkowo wcześnie w porównaniu z innymi krajami europejskimi, bowiem już w latach 70. XX w. utworzono zamknięte rejony hodowli w Puszczy Kampinoskiej i Puszczy Augustowskiej, zaś obecnie ochroną zasobów genetycznych objęte są cztery linie rasy środkowoeuropejskiej: Kampinoska, Augustowska, Asta i Północna (Programy hodowlane..., 2005–2008). Utrzymanie czystości rasowej tych linii jest zadaniem niezmiernie trudnym, bowiem nie jest możliwa kontrola kojarzeń matek w trakcie lotów godowych. Ponadto, ważnym etapem pracy hodowlanej służącej ochronie zasobów genowych jest ocena istniejącego materiału hodowlanego, tj. odpowiedź na pytanie, jaki jest udział obcych genów w hodowlach zachowawczych. Tak samo jest w przypadku innych rodzajów hodowli: jeśli ocena ta nie zostanie przeprowadzona w sposób adekwatny, dalsze etapy hodowli zachowawczej mogą być bezcelowe. Obecnie w ocenie tej wykorzystywane są cechy fenotypowe, które często wykazują naturalny zakres zmienności, jednak znaczny postęp może zostać osiągnięty poprzez badania zmienności genetycznej w oparciu o analizy DNA. Celem niniejszej pracy jest dokonanie przeglądu możliwości, jakie stwarza wykorzystanie markerów molekularnych w hodowli zachowawczej rodzimych linii pszczoły miodnej.

Zróżnicowanie pszczoły miodnej w Europie i problem zaniku *A. m. mellifera*

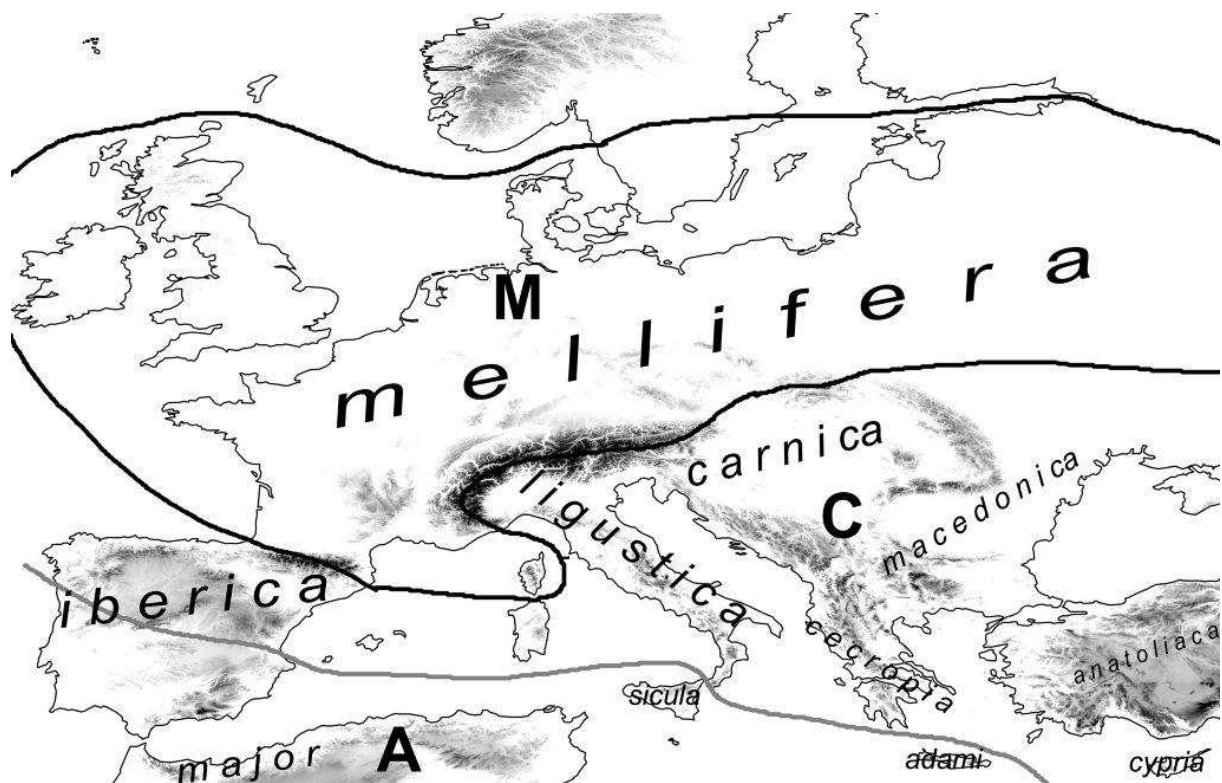
Pierwotny zasięg pszczoły miodnej obejmował rozległe obszary Afryki, Europy i Zachodniej Azji. Populacje pszczoły miodnej z różnych części zasięgu wykazują znaczące różnice pod względem morfologii, cech genetycznych i behawioralnych (Ruttner, 1988). Cechy te zostały ukształtowane w procesie doboru naturalnego, ale także w wyniku przypadkowych procesów genetycznych mających miejsce w trakcie kurczenia się zasięgu podczas zlodowaceń i późniejszych ekspansji z refugium (Franck i in., 1998). Do pewnego stopnia selekcja cech została przeprowadzona przez pszczelarzy, jednak należy podkreślić, że aż do czasu wynalezienia sztucznego unasienniania wysiłki te nie miały decydującego wpływu na strukturę genetyczną lokalnych populacji pszczoły miodnej ze względu na utrudnioną kontrolę nad koja-

rzeniem matek w trakcie lotów godowych (Jensen i in., 2005 b).

W Europie można wyróżnić trzy zasadnicze linie ewolucyjne (rys. 1). Większa część kontynentu zasiedlona była pierwotnie przez pszczoły należące do linii M. Pochodzi ona od pszczoł afrykańskich, które zasiedliły od zachodu (od Półwyspu Iberyjskiego) większą część

Europy na północ od łuku Alp i Karpat, docierając na wschód aż do Uralu, a na północy – do południowej Skandynawii.

Druga linia – C to pszczoły z Europy południowo-wschodniej, Półwyspu Apenińskiego i Bałkańskiego, Kotliny Panońskiej oraz terenów wokół zachodnich i północnych wybrzeży Morza Czarnego.



Rys. 1. Pierwotny zasięg linii ewolucyjnych i podgatunków pszczoły miodnej w Europie. Czarna linia wskazuje przypuszczalny zasięg *A. m. mellifera*. Zasięgi podgatunków (określonych na podstawie morfometrii i jądrowego DNA) pokrywają się z zasięgami linii ewolucyjnych M, C i A, określonych w oparciu o mitochondrialne DNA.

Rozbieżność istnieje jedynie w południowej części Płw. Iberyjskiego i niektórych wysp śródziemnomorskich, w których dominują pszczoły o afrykańskim mtDNA – szara linia (Ruttner, 1998; Franck i in., 1998).

Fig. 1. Original range of evolutionary lines and subspecies of honey bee in Europe. Black line indicates possible range of *A. m. mellifera*. Ranges of subspecies (determined based on morphometry and nuclear DNA) coincide with the ranges of evolutionary branches M, C and A, determined from mitochondrial DNA. Discrepancy exists only in southern part of the Iberian Peninsula and on some Mediterranean islands, dominated by bees with African mtDNA – grey line (Ruttner, 1998; Franck et al., 1998)

Podział na główne linie ewolucyjne jest bardzo dobrze udokumentowany w oparciu o badania morfologii pszczół, a także różnego rodzaju markerów molekularnych: allozymów (Badino i in., 1982; Sheppard i Huettel, 1988; Bouga i in., 2005), sekwencji DNA mitochon-

drialnego (Garnery i in., 1992, 1993; Kandemir i in., 2006), analizę fragmentów restrykcyjnych jądrowego DNA (McMichael i Hall, 1996), mikrosatelity (Estoup i in., 1995; Frank i in., 1998; Garnery i in., 1998 b), polimorfizm pojedynczych nukleotydów (Whitfield et al., 2006), cho-

ciaż w przypadku pewnych populacji pojawiają się rozbieżności pomiędzy ocenami przynależności opartymi na markerach genomu jądrowego (np. mikrosatelity) a markerami DNA mitochondrialnego. I tak np., pszczoły z Półwyspu Iberyjskiego zalicza się do jednego podgatunku *Apis mellifera iberica*, co znajduje potwierdzenie w morfologii i markerach jądrowego DNA, jednak u pszczoł z południowej części Hiszpanii i Portugalii występują niemal wyłącznie haplotypy mtDNA pochodzenia afrykańskiego, na podstawie których mogłyby być one zaliczone do linii ewolucyjnej A (Franck i in., 1998) (rys. 1). Należący do gałęzi M podgatunek *A. mellifera mellifera* był jeszcze do niedawna najszerzej rozprzestrzenionym podgatunkiem pszczoły miodnej, nie tylko w Europie, ale też w tych rejonach świata, gdzie pszczoły te zostały sztucznie wprowadzone przez kolonizatorów europejskich (Moritz i in., 2005). Mimo tak szerokiego zasięgu zmienność genetyczna tego podgatunku jest obecnie poważnie zagrożona (De la Rúa i in., 2009), głównie ze względu na masowe wprowadzanie do hodowli pszczoł obcego pochodzenia (w szczególności od pszczoł z gałęzi ewolucyjnej C, *A. m. ligustica* i *A. m. carnica*, a także *A. m. caucasica*). Obce podgatunki pszczoły miodnej były sprowadzane na masową skalę i rozmnażane w celu ulepszenia cech użytkowych pszczoły rodzimej albo nawet jej całkowitego zastąpienia. Obecnie większość populacji pszczoł w obrębie niedawnego zasięgu *A. m. mellifera* nosi ślady mniejszej lub większej introgresji obcych genów (Garnery i in., 1998 a, b; Jensen i in., 2005 a).

Na obszarze Polski zmieszanie pszczoły miodnej następowało z opóźnieniem w stosunku do zachodniej Europy (Gromisz, 1997), w szczególności Niemiec, gdzie autochtoniczna forma pszczoły miodnej jest uznawana za wymarłą (Kauhausen-Keller i Keller, 1994). Z 389 rojów zbadanych w latach 50. XX w. tylko 35% spełniało morfologiczne kryteria rasy środkowoeuropejskiej (Gromisz, 1997). Mimo to, przeprowadzone ostatnio badania morfometryczne pszczoł z Europy środkowo-wschodniej (Meixner i in., 2007) wykazały, że pszczoły występujące w Polsce wschodniej mogą być pod względem cech fenotypowych sklasyfikowane jako *A. m. mellifera*, jednak liczba lokalizacji z pszczołami o cechach pośrednich

między *A. m. mellifera* a *A. m. macedonica* rośnie w kierunku południowym, dowodząc istnienia szerokiej strefy hybrydyzacji w Polsce południowo-wschodniej i na Ukrainie. Zdaniem Prabuckiego i Chudej-Mickiewicz (1996) rodzima pszczoła miodna występuje w Polsce jeszcze prawdopodobnie w Puszczy Białowieskiej i Kampinoskiej, a zbliżona do niej linia jest wprowadzona w roku 1991, o nazwie Pszczoła Pomorska (Prabucki i Chuda-Mickiewicz, 1997), aczkolwiek według Gromisza (1997) linia ta ograniczona jest jedynie do selekcyonowanych linii hodowlanych. Dwie linie rodzimej *A. m. mellifera*, pszczoła Kampinoska i Augustowska, zostały zachowane w swojej pierwotnej formie w rejonach ich naturalnego występowania (Kampinoski Park Narodowy i Puszcza Augustowska). Stopień introgresji w tych populacjach był oceniany jedynie pośrednio na podstawie analiz morfologicznych, brakuje natomiast ocen opartych na markerach DNA, wobec czego ocena efektywności stosowanej dotychczas hodowli zachowawczej jest utrudniona. Niezweryfikowanym dotychczas założeniem funkcjonowania zamkniętych rejonów hodowli jest przyjęcie, że hodowana populacja pszczoł rozmnaża się w ich obrębie w izolacji genetycznej od populacji otaczających. Mało prawdopodobne są bowiem przyloty trutni z pasiek oddalonych o więcej niż 9 km (Gromisz, 1997).

Odróżnianie podgatunków pszczoły miodnej – morfologia i markery molekularne

Podgatunki pszczoły miodnej są zazwyczaj rozpoznawane w oparciu o badania morfometryczne, przy zastosowaniu wieloczynnikowej analizy odległości, kątów i kształtów (Tofilski, 2008). Zakładając, że mieszańce wykazują często pośrednie cechy morfologiczne, można by oczekiwać, że w tego rodzaju analizach mieszańce będą zajmować miejsce pomiędzy liniami rodzicielskimi.

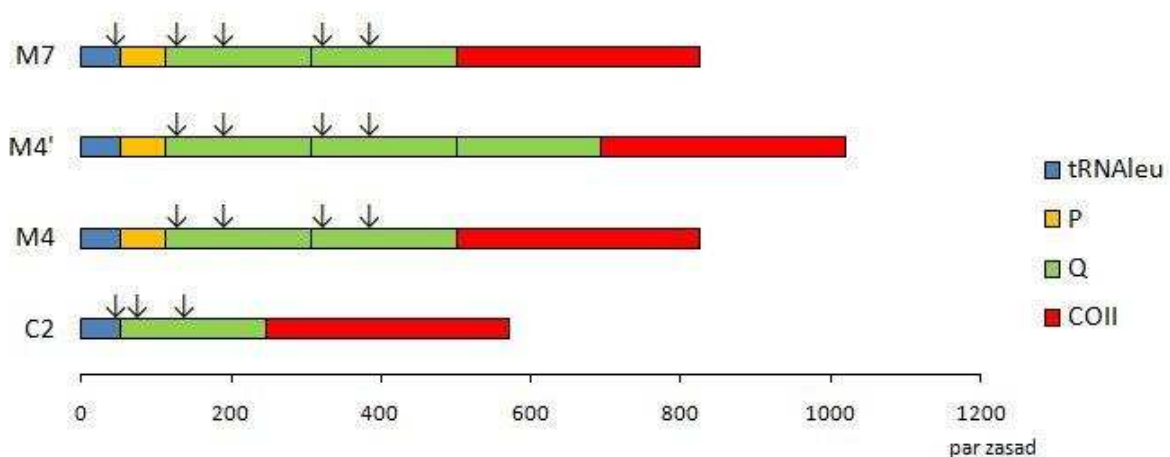
Założenie takie nieczęsto jest spełnione, gdyż potomstwo wcale nie musi wykazywać cech pośrednich pomiędzy rodzicami. Pod tym względem markery molekularne wykazują wyższą, gdyż ich interpretacja jest bardziej bezpośrednią. Ponieważ dywergencja pomiędzy głównymi liniami ewolucyjnej pszczoły miodnej miała miejsce dość dawno – przypuszcza się, że około 670 tys. lat temu (Arias i Sheppard, 1996),

różnią się one znacznie pod względem wielu sekwencji DNA, co przekłada się na możliwość łatwej identyfikacji pszczoł pod względem ich pochodzenia geograficznego za pomocą licznych metod molekularnych, takich jak allozemy (np. Badino i in., 1982), polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP) mitochondrialnego DNA (np. Garnery i in., 1993, 1998 a), mikrosatelity (np. Garnery i in., 1998 b; Clarke i in., 2001; Jensen i in., 2007), polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) (Whitfield i in., 2006). Dwie z tych metod (PCR-RFLP mtDNA i mikrosatelity) znalazły szczególnie szerokie zastosowanie w badaniach służących ochronie zasobów genowych pszczoł ze względu na łatwość analiz i ich niskie koszty (PCR-RFLP) oraz dużą ilość informacji, jakiej dostarczają (mikrosatelity).

Analiza PCR-RFLP mitochondrialnego DNA

Badania mitochondrialnego DNA (mtDNA) są szczególnie użyteczne, bo pozwalają wykryć introgresję na skutek importu matek obcego pochodzenia. Wiąże się to z faktem, że mtDNA dziedziczy się w linii maticznej i nie ulega rekombinacji. Poszczególne podgatunki pszczoły miodnej wykazują znaczny polimorfizm w obrębie sekwencji mtDNA, odzwierciedlający ich długą historię ewolucyjną (Arias i Sheppard, 1996). Zmienność ta dotyczy zwłaszcza niewielkich sekwencji niekodujących,

jednak również w sekwencjach kodujących nagromadziła się niewielka liczba mutacji. Pełną informację na temat zmienności w obrębie mtDNA można uzyskać poprzez sekwencjonowanie, jednak dla odróżniania pszczoł należących do różnych podgatunków istotne są wyłącznie te pozycje w sekwencjach, które różnicują poszczególne taksony. A zatem, stosunkowo drogie sekwencjonowanie można zastąpić z powodzeniem znacznie mniej kosztowną i pracochłonną analizą, polegającą na amplifikacji wybranego fragmentu DNA mitochondrialnego z użyciem specyficznych primerów w reakcji PCR, a następnie pocięciem tak uzyskanej cząsteczki przy pomocy enzymu restrykcyjnego w miejscach różnicujących linie ewolucyjne pszczoły. Oczywiście test taki wymaga wcześniejszej wiedzy o sekwencjach, tak by można było wskazać pozycje sekwencji różnicujące badane linie oraz enzym rozpoznający te miejsca. Analiza tego rodzaju nosi nazwę PCR-RFLP (od ang. *restriction fragments length polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych). Dla określania pochodzenia pszczoł w linii maticznej szczególnie często wykorzystywano region mitochondrialny zlokalizowany pomiędzy pierwszą a drugą jednostką oksydazy cytochromowej (COI i COII) (Garnery i in., 1993). Jest to niewielki fragment niekodującego DNA, składający się z kilku jednostek powtórzonych, określanych mianem P i Q (rys. 2).



Rys. 2. Mapy restrykcyjne regionu COI-COII wybranych haplotypów z linii ewolucyjnych M i C. Strzałki wskazują miejsca cięcia przez enzym *DraI* (Franck i in., 1998)

Fig 2. Restriction maps of the COI-COII region of selected haplotypes from evolutionary lines M and C. Arrows indicate *DraI* enzyme cutting sites (Franck et al., 1998)

U pszczoł z linii ewolucyjnej C istnieje tylko jedna sekwencja *Q*, brakuje natomiast całkowicie sekwencji *P*, natomiast u pszczoł z linii M obok sekwencji *Q* istnieje jeszcze co najmniej jedna sekwencja *P*. U pszczoł afrykańskich (linia A) sekwencja ta przyjmuje nieco odmienną postać określaną jako *Po*. Różnice w liczbie jednostek powtórzonych pozwoliły na opracowanie prostego testu z wykorzystaniem reakcji PCR i trawienia powstałego produktu przy użyciu enzymu restrykcyjnego (endonukleazy) *DraI*. Test ten polega na amplifikacji całego regionu COI-COII (obejmuje on geny transferowego RNA dla leucyny, tRNA^{leu}, części COII i całego niekodującego regionu leżącego pomiędzy nimi). Brak sekwencji *P* u pszczoł z linii C powoduje, że wielkość amplifikowanej cząsteczki jest znacznie mniejsza (około 570 par zasad) niż u pszczoł z linii M (ponad 800 par zasad). Dodatkowe trawienie uzyskanego fragmentu przy pomocy enzymu restrykcyjnego *DraI* pozwala na rozpoznanie dodatkowej zmienności w obrębie sekwencji powtórzonych *P* i *Q*, wiążącej się z obecnością mutacji punktowych. Enzym *DraI* rozpoznaje sekwencję 5'-TTTAAA-3', dokonując przecięcia nici DNA pomiędzy tyminą a adenozyną. W wyniku rozdziału elektroforetycznego powstałych fragmentów na żelu (w praktyce wystarczy żel agarozowy) uzyskuje się charakterystyczny układ prążków, pozwalający na określenie pochodzenia danej pszczoły w linii matecznej. Jak dotąd, z całego zasięgu pszczoły miodnej opisano ponad 60 wzorców restrykcyjnych (haplotypów) regionu COI-COII, możliwych do wykrycia przy pomocy analizy PCR-RFLP z wykorzystaniem *DraI* (Garnery i in., 1993; Franck i in., 2000, 2001; Clarke, 2001). Zmienność jest szczególnie duża u pszczoł z linii A i M, zaś mniejsza u pszczoł z linii C, posiadających tylko jedną stosunkowo krótką sekwencję *Q*, a zatem mało potencjalnych miejsc dla mutacji. W związku z tym odróżnianie haplotypów różnych podgatunków należących do linii C (jak np. *A. m. ligustica* i *A. m. carnica*) może sprawiać trudność, jeśli produkty trawienia rozdzielane są na dających małą rozdzielczość żelach agarozowych. W związku z tym została zaproponowana analiza PCR-RFLP z wykorzystaniem odmiennego enzymu *HinfI*, która pozwala odróżnić dodatkowe haplotypy w linii C (Ózdil i in., 2009).

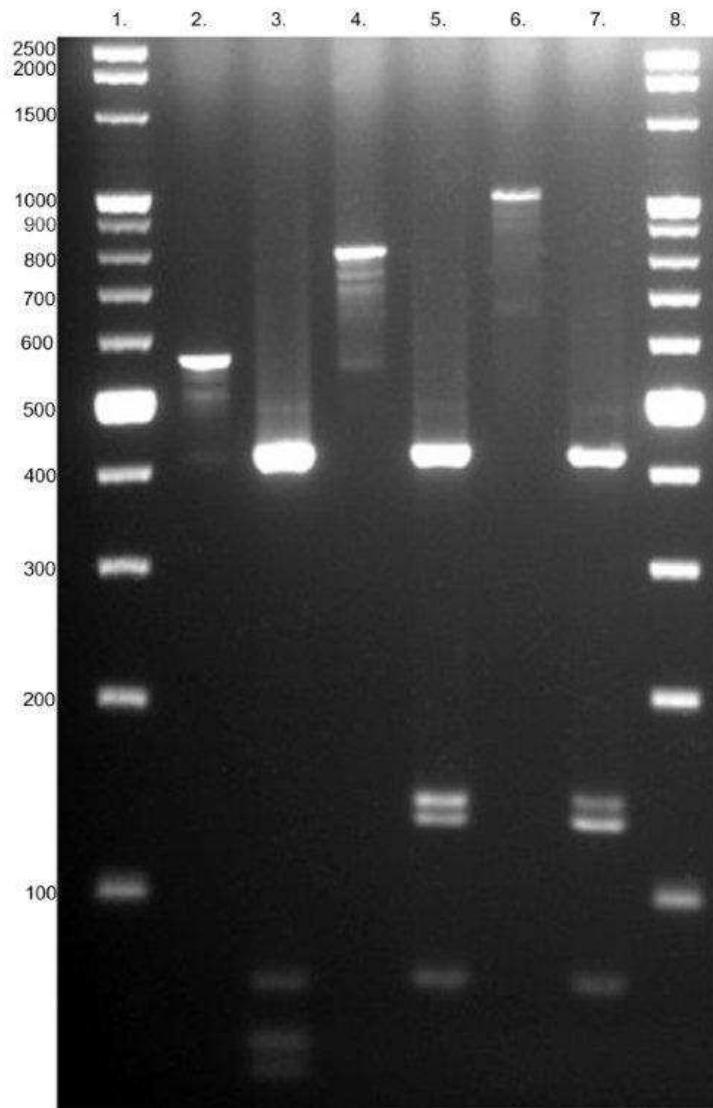
W zbadanych dotychczas hodowlach zachowawczych w Polsce (Oleksa i in., w przygotowaniu) najczęściej spotykane są haplotypy M4 i M4' (najszerzej rozpowszechnione haplotypy rodzimego podgatunku *A. m. mellifera*) oraz haplotypy C2 (typowe dla pszczoł z podgatunków *carnica* i *macedonica*). W przypadku tych haplotypów, ze względu na znaczną różnicę wielkości uzyskiwanego produktu, odróżnienie pszczoł rodzimego pochodzenia od pszczoł obcych nie sprawia najmniejszych trudności (rys. 3).

Oprócz rutynowo stosowanej analizy restrykcyjnej regionu COI-COII z wykorzystaniem enzymu *DraI*, podobne analizy prowadzone były na innych genach mitochondrialnych. Przykładowo, amplifikacja genu cytochromu b (CytB) i trawienie go przy pomocy enzymu *BglII* pozwala na przyporządkowanie badanych próbek do linii ewolucyjnych M, C+O i A (Crozier i in., 1991). Collet i in. (2006) opisali trzy wzorce restrykcyjne genu 16S mtDNA PCR-RFLP, uzyskiwane w wyniku analizy restrykcyjnej przy pomocy enzymów *EcoRI*, *AluI*, *HincII*, *TaqI*, *DraI* i *VspI*. Wzorce te w pełni odpowiadały wzorcom restrykcyjnym *DraI* regionu COI-COII, charakterystycznym dla linii A, M i C. Biorąc pod uwagę fakt, że DNA mitochondrialne nie podlega rekombinacji, nie ma większego znaczenia, który z fragmentów genomu mitochondrialnego zostanie wykorzystany w analizie pochodzenia matiecznego. Mimo wszystko godny polecenia jest region COI-COII, gdyż był on, jak dotąd, badany najczęściej (np. Garnery i in., 1998 a; Franck i in., 1998, 2000 a, b; Nikolenko i Poskryakov, 2002; Jensen i in., 2005; De la Rúa i in., 2004; Susnik i in., 2004; Kozmus i in., 2007; Cauia i in., 2008; Shaibi i in., 2009), co stwarza możliwość porównań z wynikami wcześniej opublikowanych prac.

Z uwagi na to, że mitochondrialne DNA dziedziczone jest wyłącznie od matki, wszystkie robotnice w rodzinie pszczelej powinny posiadać identyczne sekwencje, a zatem analizę PCR-RFLP wystarczy wykonać na pojedynczej robotnicy z ula. Powinna być to robotnica możliwie młoda, która nie opuszczała jeszcze nigdy ula, tak by wyeliminować możliwość zbioru pszczoły pochodzącej od obcej matki, która znalazła się w ulu w wyniku dość powszechnie spotykanego błędzenia. Dla całkowitej pewności można zale-

cić badanie czerwiu. Możliwe jest także przyżyciowe zbadanie haplotypu matki w oparciu o niewielki (około 1,3 mm²) fragment skrzydła (Châline i in., 2004). Obecność obcego haplotypu powinna dyskwalifikować daną matkę z dal-

szej hodowli, jeśli celem jest zachowanie rodzimych cech genetycznych. Warto jednak jeszcze raz podkreślić, że badanie mitochondrialnego DNA pozwala wyłącznie na wykrycie pochodzenia pszczoł w linii macecznej.



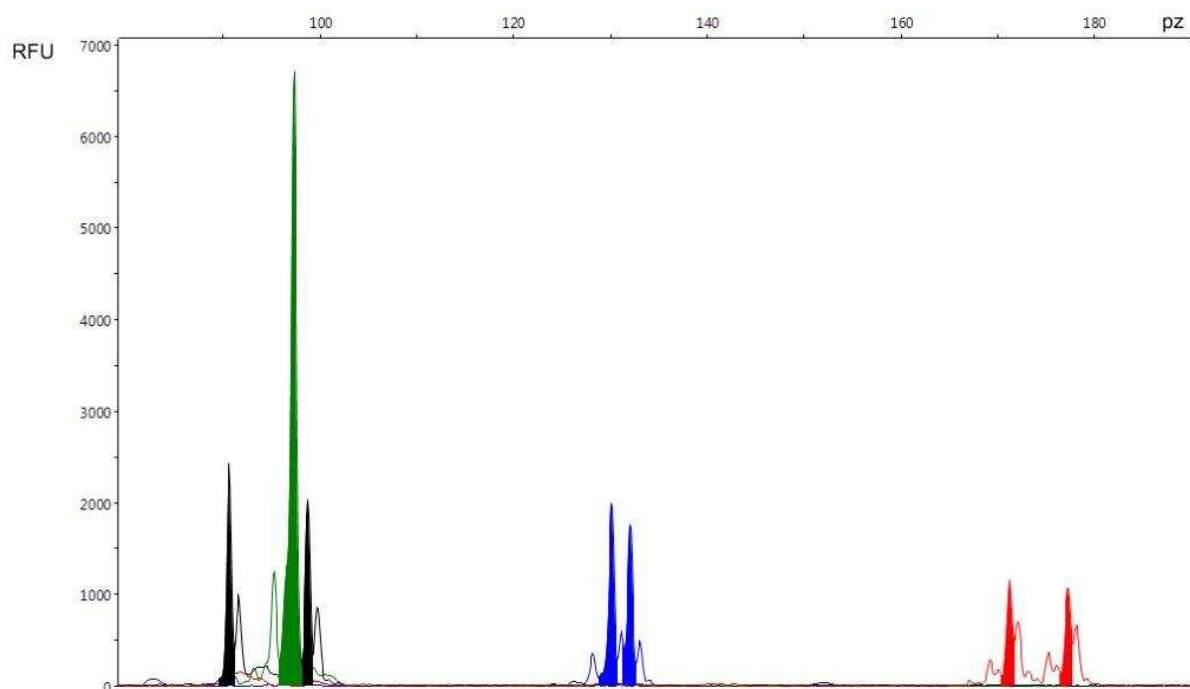
Rys. 3. Przykładowy żel z rozdziałem produktów analizy PCR-RFLP regionu COI-COII. Ścieżki 1 i 8 są drabinkami markerów wielkości. Ścieżki 2, 4 i 6 zawierają nietrawione produkty amplifikacji regionu COI-COII pszczoł z podgatunku *A. m. carnica* (ścieżka 2, haplotyp C2) oraz *A. m. mellifera* (ścieżki 4 i 6, odpowiednio haplotypy M4 i M4'). Na ścieżkach 3, 5 i 7 te same produkty po trawieniu enzymem *DraI* (3 – C2, 5 – M4, 7 – M4')

Fig. 3. Sample gel with separation of PCR-RFLP products from the COI-COII region. Lanes 1 and 8 are size marker ladders. Lanes 2, 4 and 6 contain undigested amplification products of the COI-COII region of *A. m. carnica* (lane 2, haplotype C2) and *A. m. mellifera* bees (lanes 4 and 6, haplotypes M4 and M4', respectively). Lanes 3, 5 and 7 show the same products after digestion with *DraI* enzyme (lane 3 – C2, lane 5 – M4, lane 7 – M4')

Znakomita większość cech fenotypowych determinowana jest przez geny jądrowe, dziedziczone po obydwójgu rodzicach. Wyniki badań pszczoły Augustowskiej (Oleksa i in., w przygotowaniu) pokazują, że obecność obcego haplotypu mitochondrialnego nie zawsze idzie w parze z wysokim poziomem introgresji jądrowej (i *vice versa*), mimo że istnieje pewna staty-

styczna tendencja, zgodnie z którą pasieki o większym udziale rodzin z rodzimym DNA mitochondrialnym odznaczają się zarazem niższą introgresją obserwowaną w oparciu o genom jądrowy.

Kolejnym narzędziem oceny pszczoł z hodowli zachowawczych powinny stać się zatem markery DNA jądrowego.



Rys. 4. Przykład elektroferogramów produktów reakcji multiplex-PCR (4 loci mikrosatelitarne; badany osobnik jest homozygotą w zielonym locus i heterozygotą pod względem pozostałych loci). RFU – względne jednostki fluorescencji, pz – wielkość produktu (liczba par zasad) (program *Peak Scanner 1.0*, Applied Biosystems)

Fig. 4. Sample electrophoregrams for multiplex-PCR products (4 microsatellite loci; analysed bee is homozygous for green locus and heterozygous for the other loci). RFU – relative fluorescence units, pz – size of product (number of base pair) (*Peak Scanner 1.0*, Applied Biosystems)

Mikrosatelity

Do najszerzej wykorzystywanych obecnie genetycznych polimorficznych markerów mendlowskich należą mikrosatelity. Są to krótkie (zazwyczaj dwu-, trzy, lub czteronukleotydowe motywy), powtórzone tandemowo (jedna za drugą) sekwencje DNA, występujące powszechnie w genomie jądrowym. Polimorfizm mikrosatelitów wiąże się z liczbą powtórzeń motywów sekwencji, stąd określa się je czasem jako STR (ang. short tandem repeats – „krótkie

powtórzenia tandemowe”) lub SSR (ang. simple sequence repeats – „powtórzenia prostych sekwencji”). Wielką zaletą SSR jest ich kodominacyjny charakter, tj. możliwość odróżnienia dwu alleli u osobników heterozygotycznych, a co za tym idzie, możliwość precyzyjnego oszacowania poziomu heterozygotyczności.

Mikrosatelity uważa się zwykle za markery selekcyjnie neutralne, gdyż spotykane są zazwyczaj w rejonach niekodujących, a zatem dobór naturalny nie powinien promować żadne-

go z alleli. Skoro nowo powstające allele nie są eliminowane przez selekcję, w puli genowej populacji gromadzi się wysoka różnorodność tych markerów przejawiająca się dużą liczbą alleli.

W genomach większości przebadanych organizmów wykryto wiele *loci* mikrosatelitarnych, zazwyczaj równomiernie rozmieszczonych w całych genomach. Przykładowo, u pszczoły miodnej rozpoznano ponad 500 *loci* mikrosatelitarnych (Solignac i in., 2003, 2007). Daje to możliwość wybrania do badań wielu niesprzężonych genetycznie *loci*, a co za tym idzie, przeprowadzenie wysoko wiarygodnych ocen parametrów genetycznych rodziny lub populacji. Zazwyczaj badanie około 10 *loci* o wysokim polimorfizmie pozwala uzyskać unikalny profil genetyczny dla każdego osobnika.

Polimorfizm mikrosatelitów badany jest poprzez określanie za pomocą elektroforezy wielkości produktu PCR. Obecnie analizy takie można w znacznym stopniu zautomatyzować dzięki wykorzystaniu analizatorów genetycznych z rozdziałem kapilarnym. Ponadto, znakowanie fluorescencyjne starterów używanych w reakcji PCR umożliwia amplifikację wielu *loci* w jednej mieszaninie reakcyjnej, co znacznie ogranicza koszty i skraca czas analiz (rys. 4).

Badania z wykorzystaniem mikrosatelitów potwierdziły wysokie zróżnicowanie pomiędzy populacjami z różnych części zasięgu pszczoły miodnej. W wielu *loci* obserwuje się wyraźną tendencję geograficzną zmian częstości alleli. Pewne allele są bliskie utrwalenia w określonych rejonach zasięgu, będąc równocześnie skrajnie rzadkie w innych. Można więc mówić o istnieniu alleli diagnostycznych dla określonych podgatunków pszczoły miodnej. Allele te zostały wskazane w oparciu o zakrojone na szeroką skalę badania zmienności wielu *loci* mikrosatelitarnych w wielu populacjach europejskich. Znając częstość alleli diagnostycznych w badanej populacji pszczoły w odniesieniu do ich częstości w populacji będącej źródłem sprowadzanych osobników można obliczyć współczynnik introgresji (Garnery i in., 1995 b) wynoszący:

$$IR = \frac{\sum_{i \in D} p_i}{\sum_{i \in D} q_i}$$

gdzie p_i to częstość alleli diagnostycznych C w badanej populacji, q_i – odnośna częstość alleli diagnostycznych w referencyjnej populacji z linii ewolucyjnej C, zaś D – zestaw *loci* diagnostycznych. Obliczenie współczynnika IR jest proste, jednak z jego stosowaniem w praktyce wiążą się dwa poważne problemy.

Po pierwsze, należy wybrać populację odniesienia. Powinna to być populacja, która była źródłem genów dla introgresji. Jak wykazali Garnery i in. (1995 b), zróżnicowanie częstości alleli jest znaczne pomiędzy liniami, natomiast zazwyczaj niewielkie między populacjami w obrębie jednej linii ewolucyjnej. Tak więc, w roli populacji referencyjnej sprawdzi się w zasadzie dowolna populacja z linii C, jednak najlepiej byłoby, aby rozkład częstości alleli nie był w niej zaburzony na skutek importu pszczoł z obcych linii. Garnery i in. (1995 b) jako populację referencyjną wykorzystali pszczoły z podgatunku *A. m. macedonica* z północnej Grecji. Jest to wybór o tyle zasadny, że populacja ta zlokalizowana była z dala od granicy zasięgu dwu gałęzi, więc jej struktura genetyczna przypuszczalnie nie została zmieniona przez przepływ obcych genów.

Po drugie, aby obliczyć współczynnik IR oparty na allelach diagnostycznych wskazanych w literaturze, należy dokonać identycznej interpretacji wielkości alleli mikrosatelitarnych we własnych badaniach. Niestety, różne aparaty do elektroforezy i różne zestawy odczynników (np. różne molekularne standardy wielkości) mogą dawać nieco rozbieżne oceny wielkości fragmentów. Nieodzwonne staje się więc porównanie sekwencji uzyskanych fragmentów z sekwencjami mikrosatelitów zdeponowanych w GeneBanku (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/) na początku badań, tak aby odpowiednio skalibrować interpretację wielkości fragmentów z wynikami poprzednich prac.

Opisany powyżej współczynnik jest mimo wszystko do pewnego stopnia subiektywny, bo wymaga przyjęcia pewnych założeń co do wyboru alleli diagnostycznych, a także skomplikowanej procedury kalibracji wielkości alleli z wartościami literaturowymi. Ponadto, trudne jest oszacowanie wiarygodności tak obliczonej oceny. Dlatego, godne polecenia są inne metody oceny introgresji, oparte na modelach probabilistycznych.

Jeden z tego rodzaju modeli został zaimplementowany w programie komputerowym STRUCTURE (Pritchard i in., 2000; http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure_2_2.html). Program ten umożliwia wykrycie wewnętrznej struktury populacyjnej (tzn. podziału populacji na subpopulacje) bądź stopnia zmieszania populacji w oparciu o dane genotypowe i metodę Bayesa. Model zakłada istnienie pewnej liczby populacji K , z których każda odznacza się określonymi częstościami alleli w każdym *locus*. Każdy osobnik w próbie jest następnie probabilistycznie przypisywany do jednej z populacji, albo też do dwu lub więcej populacji jednocześnie, jeśli genotyp wskazuje na admiksję. Procedura ta jest przeprowadzana w taki sposób, aby przydzielić osobniki do grup znajdujących się w stanie równowagi genetycznej Hardy'ego–Weinberga. Metoda Monte Carlo łańcuchów Markowa umożliwia ocenę *a posteriori* rozkładu prawdopodobieństwa dla obliczonych współczynników przynależności (q). Program STRUCTURE umożliwia także przyjęcie określonych założeń co do wyjściowych populacji ancestralnych – zmieszane lub nie, oraz korelacji częstości alleli pomiędzy populacjami.

Program STRUCTURE został wykorzystany przez Jensen i in. (2005) do oceny stopnia introgresji genów *A. m. ligustica* w chronionych populacjach ciemnej pszczoły w Europie północnej (na Wyspach Brytyjskich i w Skandynawii). Dla każdej z badanych populacji przeprowadzono obliczenia stopnia introgresji, umieszczając w modelu dane genotypowe dla prób pobranych z tej populacji i populacji odniesienia. Przyjęto założenie, że osobniki można podzielić na dwie grupy (odpowiadające podgatunkom *A. m. mellifera* i *A. m. ligustica*) oraz że każdy z badanych osobników odziedziczył pewną część swego genotypu po obydwu tych podgatunkach. Wyniki potwierdziły niski stopień introgresji w badanych populacjach, z wartością współczynników admiksji q zazwyczaj znacznie mniejszą niż 0,2. Tylko w trzech populacjach stwierdzono nieznacznie większą introgresję, co znalazło potwierdzenie również w obecności obcych haplotypów mtDNA.

Analogiczna analiza przeprowadzona dla pszczoł z zamkniętego rejonu hodowli w Puszczy Augustowskiej (Oleksa i in., w przygotowaniu) z użyciem *A. m. carnica* jako populacji refe-

rencyjnej wskazała na introgresję genów jądrowych na średnim poziomie niemal 20%, a zarazem umożliwiła wskazanie najsilniej zmieszanych rodzin.

W jaki sposób markery molekularne mogą pomóc w realizacji programu ochrony rodzimej pszczoły

Markery DNA jądrowego (mikrosatelity) umożliwiają wskazanie osobników, które są mieszańcami, zaś markery DNA mitochondrialnego (analiza PCR-RFLP regionu COI-COII) pozwalają na określenie pochodzenia w linii matecznej. Informacje te mogą być razem z powodzeniem wykorzystane w hodowli zachowawczej rodzimej pszczoły miodnej.

W rodzinach używanych wyłącznie do produkcji trutni konieczne jest badanie genotypu matki, gdyż tylko jej genom jest przekazywany haploidalnemu potomstwu męskiemu. Jeśli nawet dysponujemy tylko genotypami robotnic (córek), na ich podstawie można precyzyjnie określić genotyp matki.

W rodzinach używanych do produkcji matek sytuacja jest bardziej złożona, gdyż matki tych rodzin mogły zostać unasiennione przez trutnie o niewłaściwym, obcym genotypie. Powinny one zostać wyeliminowane z dalszej hodowli zachowawczej. Zakładając, że matki pszczoły miodnej są unasienniane średnio przez 10–20 trutni (Woyke, 1955; Tarpay i Nielsen, 2002), udział kojarzeń matki z trutniami o niepożądanych genotypach może być stosunkowo poprawnie określony dzięki badaniu genotypów około 50 robotnic stanowiących jej potomstwo.

Badania genetyczne umożliwiają ocenę stopnia zmieszania na poziomie poszczególnych osobników, czego nie można dokonać w oparciu o badania morfometryczne. Ze względu na plastyczność fenotypową wnioski na temat przynależności rasowej osobników wyciągane na podstawie pomiarów morfologicznych mogą być obciążone dużym błędem. Dlatego też w badaniach takich zaleca się przebadanie kilkudziesięciu osobników. Konieczność pobierania dużych prób do oceny morfologicznej wiąże się także z koniecznością minimalizacji potencjalnego błędu będącego wynikiem objęcia badaniami potomstwa innej matki, które znalazło się w ulu w wyniku błędzenia. Nawet zbiór młodych robotnic nie eliminuje w pełni ryzyka po-

brania robotnic z innych uli. Badania genetyczne można natomiast przeprowadzić na czerwiu lub poczwarkach, co do których istnieje pewność, że są potomstwem właściwej matki.

Wadą badań genetycznych jest ich kosztowność, która jednak systematycznie maleje, w miarę jak znajdują one coraz bardziej masowe zastosowanie. Jeśli przeprowadzić bilans nakładów i zysków, to precyzja uzyskanych wyników jest najlepszym uzasadnieniem wdrożenia metod genetycznych do praktyki hodowlanej. Nie oznacza to jednak, że można całkowicie zrezygnować ze stosowanej obecnie oceny morfologicznej.

Naczelnym celem hodowli zachowaw-

czej jest bowiem utrzymanie pszczoł o charakterystycznych cechach fenotypowych („ciemna pszczoła”), zdolnych zarazem do przekazywania tych cech potomstwu.

W chwili obecnej nie jest do końca wyjaśniony związek pomiędzy opisywanymi w pracy markerami a cechami fenotypowymi różnicującymi podgatunki pszczoły, zatem wprowadzenie selekcji w oparciu o występowanie określonych alleli nie powinno zastąpić selekcji określonych cech fenotypu.

Tylko połączenie obydwu rodzajów analizy, fenotypowej i opartej o markery DNA, może przyczynić się do realizacji celu, jakim jest uratowanie rodzimej pszczoły przed wymarciem.

Literatura

- Arias M.C., Sheppard W.S. (1996). Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 5 (3): 557–566.
- Badino G., Celebrano G., Manino A. (1982). Genetic variability of *Apis mellifera ligustica* Spin. in a marginal area of its geographical distribution. *Experientia*, 38: 540–541.
- Bouga M., Kiliadis G., Harizanis P.C., Papatotopoulos V., Alahiotis S. (2005). Allozyme variability and phylogenetic relationships in honey bee (Hymenoptera: Apidae: *Apis mellifera*) populations from Greece and Cyprus. *Biochem. Gen.*, 43 (9–10): 471–483.
- Cauia E., Usurelu D., Magdalena L.M., Cimponeriu D., Apostol P., Siceanu A., Holban A., Gavrila I. (2008). Preliminary researches regarding the genetic and morphometric characterization of honeybees (*A. mellifera* L.) from Romania. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, 41 (2): 278–286.
- Châline N., Ratnieks F.L.W., Raine N.E., Badcock N.S., Burke T. (2004). Non-lethal sampling of honey bee, *Apis mellifera*, DNA using wing tips. *Apidologie*, 35: 311–318.
- Collet T., Arias M.C., Del Lama M.A. (2007). 16S mtDNA variation in *Apis mellifera* detected by PCR-RFLP. *Apidologie*, 38: 47–54.
- Cox-Foster D.L., Conlan S., Holmes E.C., Palacios G., Evans J.D., Moran N. A., Quan P.L., Briese T., Hornig M., Geiser D.M., Martinson V., VanEngelsdorp D., Kalkstein A.L., Drysdale A., Hui J., Zhai J., Cui L., Hutchison S.K., Simons J.F., Egholm M., Pettis J.S., Lipkin W.I. (2007). A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science*, 318 (5848): 283–287.
- Crozier Y.C., Koulianos S., Crozier R.H. (1991). An improved test for Africanized honey bee mitochondrial DNA. *Experientia*, 47: 968–969.
- De la Rúa P., Hernández-García R., Pedersen B.V., Galián J., Serrano J. (2004). Molecular diversity of honeybee *Apis mellifera iberica* L. (Hymenoptera: Apidae) from Western Andalusia. *Arch. Zoot.*, 53: 195–203.
- De la Rúa P., Jaffé R., Dall’Olio R., Muñoz R., Serrano J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40: 263–284.
- Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.-M. (1998). The origin of western European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): new insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 52: 1119–1134.
- Franck P., Garnery L., Celebrano G., Solignac M., Cornuet J.-M. (2000 a). Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Mol. Ecol.*, 9: 907–921.
- Franck P., Garnery L., Solignac M., Cornuet J.-M. (2000 b). Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the near east, *Apidologie*, 31: 167–180.

- Free J.B. (1993). Insect Pollination of Crops. Academic Press, San Diego.
- Garnery L., Cornuet J.-M., Solignac M. (1992). Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Mol. Ecol.*, 1: 145–154.
- Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.-M., Solignac M. (1998 a). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). I. Mitochondrial DNA. *Genetics Selection Evolution*, 30: 31–47.
- Garnery L., Franck P., Baudry E., Vautrin D., Cornuet J.-M., Solignac M. (1998 b). Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*). II. Microsatellites. *Genet. Select. Evol.*, 30: 49–74.
- Garnery L., Solignac M., Celebrano G., Cornuet J.-M. (1993). A simple test using restricted PCR amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera*. *Experientia*, 49: 1016–1021.
- Gromisz M. (1997). Zasoby pszczoły rodzimej i ich ochrona. W: Cierzniak T. (red.), *Postępy apidologii w Polsce*. Wyd. WSP w Bydgoszczy, ss. 47–56.
- Hartl D.L., Clark A.G. (2007). *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Programy hodowlane ochrony zasobów genetycznych dla pszczół. (2005–2008). Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, http://www.bioroznorodnosc.izoo.krakow.pl/pszczoły/program_hodowlany.
- Jensen A.B., Palmer K.A., Boomsma J.J., Pedersen B.V. (2005 a). Varying degrees of *Apis mellifera ligustica* introgression in protected populations of the black honeybee, *Apis mellifera mellifera*, in north-west Europe. *Mol. Ecol.*, 14: 93–106.
- Jensen A.B., Palmer K.A., Chaline N., Raine N.E., Tofilski A., Martin S.J., Pedersen B.V., Boomsma J.J., Ratnieks F.L.W. (2005 b). Quantifying honey bee mating range and isolation in semi-isolated valleys by DNA microsatellite paternity analysis. *Conservation Genetics*, 6: 527–537.
- Kauhausen-Keller D., Keller R. (1994). Morphometrical control of pure race breeding of honeybee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 25: 133–143.
- Kevan P.G., Baker H.G., (1983). Insects as flower visitors and pollinators. *Ann. Rev. Entomol.*, 28: 407–453.
- Kevan P.G., Phillips T.P. (2001). The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. *Conservation Ecology*, 5 (1), p. 8 (<http://www.consecol.org/vol5/iss1/art8/>).
- Kozmus P., Stevanović J., Stanimirović Z., Stojić V., Kulišić Z., Meglič V. (2007). Analysis of mitochondrial DNA in honeybees (*Apis mellifera*) from Serbia. *Acta Vet. (Beograd)*, 57: 465–476.
- Meixner M.D., Worobik M., Wilde J., Fuchs S., Koeniger N. (2007). *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe – morphometric variation and determination of its range limits. *Apidologie*, 38: 191–197.
- Moritz R.F.A., Härtel S., Neumann P. (2005). Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity. *Ecoscience*, 12 (3): 289–301.
- Nikolenko A.G., Poskryakov A.V. (2002). Polymorphism of Locus COI-COII of Mitochondrial DNA in the Honeybee *Apis mellifera* L. from the Southern Ural Region. *Russ. J. Genet.*, 38 (4): 364–368.
- Özdil F., Fakhri B., Meydan H., Yıldız M.A., Hall G. (2009). Mitochondrial DNA variation in the CoxI–CoxII intergenic region among Turkish and Iranian honey bees (*Apis mellifera* L.). *Biochem. Genet.*, 47: 717–721.
- Ponikvar M., Šnajder J., Sedej B. (2005). Honey as a bioindicator for environmental pollution with SO₂. *Apidologie*, 36: 403–409.
- Prabucki J., Chuda-Mickiewicz B. (1996). The Middle European honeybee as a component of productive hybrids. *Pszczel. Zesz. Nauk.* 40 (2): 61–69.
- Prabucki J., Chuda-Mickiewicz B. (1997). Linia pomorska rasy środkowoeuropejskiej, pszczoła północnej Polski. W: T. Cierzniak (red.), *Postępy apidologii w Polsce*. Wyd. WSP w Bydgoszczy, ss. 57–77.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Ruttner F. (1988). *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Springer Verlag, Berlin, p. 284.
- Shaibi T., Muñoz I., Dall’Olio R., Lodesani M., De la Rúa P., Moritz R.F.A. (2009). *Apis mellifera* evolutionary lineages in Northern Africa: Libya, where orient meets occident. *Insect. Soc.*, 56: 293–300.
- Sheppard W.S., Huettel M.D. (1988). Biochemical

genetic markers, intraspecific variation, and population genetics of the honey bee, *Apis mellifera*, In: G. R. Needham, R.E. Page, M. Delfinado-Baker, C.E. Bowman (eds), *Africanized honey bees and bee mites*. Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 281–286.

Solignac M., Vautrin D., Loiseau A., Mougel F., Baudry E., Estoup A., Garnery L., Haberl M., Cornuet J.M. (2003). Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Mol. Ecol. Notes*, 3 (2): 307–311.

Solignac M., Zhang L., Mougel F., Li B., Vautrin D., Monnerot M., Cornuet J.M., Worley K.C., Weinstock G.M., Gibbs R.A. (2007). The genome of *Apis mellifera*: dialog between linkage mapping and sequence assembly. *Gen. Biol.*, 8 (3): 403.

Sušnik S., Kozmus P., Poklukar J., Meglič V. (2004). Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera*

carnica in Slovenia. *Apidologie*, 35 (6): 623–636.

Tarpy D.R., Nielsen D.I. (2002). Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honey bee colonies (Hymenoptera: *Apidae*). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 95: 513–528.

Tofilski A. (2008). Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. *Apidologie*, 39: 558–563.

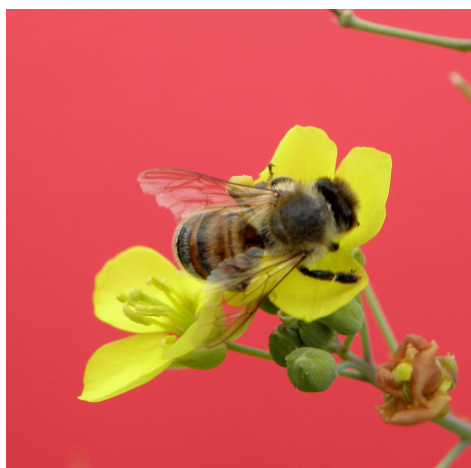
Whitfield C.W., Behura S.K., Berlocher S.H., Clark A.G., Johnston J.S., Sheppard W.S., Smith D.R., Suarez A.V., Weaver D., Tsutsui N.D. (2006). Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science*, 314: 42–645.

Woyke J. (1955). Multiple mating of the honeybee queen (*Apis mellifica* L.) in one nuptial flight. *Bull. Acad. Polon. Sci. Cl.*, 11, 3 (5): 175–180.

DNA MARKERS IN CONSERVATION BREEDING OF NATIVE LINES OF HONEY BEE

Summary

The loss of the gene pool of native honey bees (*Apis mellifera mellifera*), caused by introgressive hybridization with foreign bees (mainly *A. m. carnica*), is alarming because it reduces their adaptability to local conditions. To conserve the genetic resources of native bees, closed breeding areas with selection of breeding material based on evaluation of phenotypic traits, were established in Poland. This paper suggests that simultaneous use of DNA markers could largely facilitate the identification of queen bees and families of hybrid origin. The particularly promising markers that differentiate bee subspecies are nuclear microsatellites and PCR-RFLP analysis in the COI-COII mtDNA region. The use of about 10 polymorphic and unlinked microsatellite loci enables accurate evaluation of the degree of introgression at individual level. Because of relatively simple and inexpensive PCR-RFLP analysis of mtDNA, it is possible to determine the maternal origin of the bees. Both marker classes should be routinely used to evaluate the breeding value of bees from conservation breeding to complement the morphometric methods currently in use.



fot. E. Atkinson