

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2014-01/18



## ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

## A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

## 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	V4-1127
<b>Naslov projekta</b>	Genetske karakteristike kranjske čebele
<b>Vodja projekta</b>	5098 Peter Dovč
<b>Naziv težišča v okviru CRP</b>	3.01.01 Genetske karakteristike kranjske čebele
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	800
<b>Cenovni razred</b>	D
<b>Trajanje projekta</b>	10.2011 - 09.2013
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	401 Kmetijski inštitut Slovenije
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	4 BIOTEHNIKA 4.02 Živalska produkcija in predelava 4.02.01 Genetika in selekcija
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	08. Kmetijstvo
<b>Raziskovalno področje po šifrantu FOS</b>	4 Kmetijske vede 4.04 Kmetijska biotehnologija

## 2. Sofinancerji

	Sofinancerji	
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo in okolje
	Naslov	Dunajska 22, 1000 Ljubljana

## B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Povzetek raziskovalnega projekta<sup>1</sup>

SLO

Projekt obravnava kompleksno vprašanje genetske karakterizacije kranjske čebele z uporabo sodobnih genetskih metod. Preliminarne raziskave so pokazale, da je genetska pestrost v slovenski populaciji kranjske čebele precej večja kot je bilo sprva pričakovano. V projektu smo zato skušali ugotoviti ali je bila genetska pestrost v populaciji *Apis mellifera carnica* sprva podcenjena, ali pa je v zadnjih letih prišlo do nekontroliranega vnosa tujerodnih čebel v slovensko populacijo. V ta namen smo uporabili nabor različnih pristopov, ki vključujejo analizo jedrnih genetskih označevalcev, mitohondrijske DNA in analizo mikrobiote v prebavilih čebel. Potencialni vnos tujerodnih čebel smo proučevali s sekvenčno analizo mtDNA arhivskega materiala izpred desetih let in s primerjavo z rezultatom naših analiz v letih 2009 in 2010. Morfološke lastnosti (predvsem kubitalni indeks in barva abdominalnih obročkov) smo uporabili za izoblikovanje meril za opis kranjske čebele. S proučevanjem mikrobiote v prebavilih čebel smo ugotavljali razlike v sestavi mikrobiote na različnih geografskih lokacijah in tako skušali postaviti osnovo za identifikacijo ekotipov. Za proučevanje pomembnih vedenjskih in metabolnih značilnosti kranjske čebele smo vzpostavili celične linije z različnim genetskim ozadjem in tako pripravili orodje za študij učinka fitofarmaceutskih sredstev na čebele. Celovita analiza celotnega seta nam daje novo sliko o genetski strukturi populacije kranjske čebele v Sloveniji in nam omogoča postavitev kriterijev za ohranjanje populacije. Z uvedbo fizičnega preverjanja porekla matic, vzrejenih v Sloveniji, bomo lahko povečali zaupanje v pristnost našega plemenskega materiala in prispevali k doseganju boljše cene na mednarodnem tržišču.

ANG

The project addresses the complex issue of genetic characterization of the Carniolan bee using modern genetic methods. Preliminary studies have shown that the genetic diversity in Slovenian population of Carniolan bee is much larger than initially expected. In this project, we therefore sought to determine whether the genetic diversity in a population of *Apis mellifera carnica* was initially underestimated, or in recent years the uncontrolled immigration of non-native bees has led to the present situation in the Slovenian population. To address these questions we used a range of different approaches, including analysis of nuclear genetic markers, mitochondrial DNA and analysis of the microbiota in the gut of bees. The potential introduction of non-native bees were studied by mtDNA sequence analysis of archival material from ten years ago and by comparison with the results of our analyzes in 2009 and 2010. Morphological characteristics (especially cubital index and abdominal color rings) were used to form the criteria for description of the Carniolan bee. By studying the microbiota in the gut of bees we tried to determine differences in the composition of the microbiota in different geographical locations and also to put the basis for the identification of ecotypes. Important for the study of behavioral and metabolic characteristics of the Carniolan bee is the fact that we have established cell lines with different genetic backgrounds and also prepared a tool to study the impact of plant protection products on bees. A comprehensive analysis of the entire set gives us a new picture of the genetic structure of populations of the Carniolan bee in Slovenia and allows us to set up criteria for the conservation of the population. With the introduction of physical verification of the origin of queens reared in Slovenia, we can increase the confidence in the authenticity of our breeding material, and contribute to achieving better prices on the international market.

#### 4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu<sup>2</sup>

Na vzorcih DNA, ki smo jih zbrali za tekoči poskus in arhivskih vzorcev iz leta 2002 smo skušali dobiti pregled nad genetsko pestrostjo mitohondrijskih haplotipov v populaciji kranjske čebele v zadnjih desetih letih. Ker so bili arhivski vzorci v večji meri analizirani z restriksijsko analizo, ki je bistveno manj natančna kot sekvenciranje, je tedaj prevladal vtis, da je situacija v populaciji KČ zelo enostavna in da je prisoten en sam haplotip (Kozmus in sod., 2004). Poleg materiala, ki smo ga proučili v predhodnih študijah in je bil zbran v letih 2008-2010, smo v okviru projekta zbrali aktualne vzorce (2011 in 2012) ter s ponovno analizo referenčnega arhivskega materiala proučili populacijsko dinamiko kranjske čebele zadnjih desetih letih. Sekvenciranje vzorcev čebel od vzrejevalcev matic je pokazalo, da je porazdelitev mtDNA haplotipov v Sloveniji enaka porazdelitvi haplotipov v študijah v letih 2009 in 2010. To potrjuje našo tezo, da je genetska konstitucija populacije kranjske čebele v Sloveniji kompleksna in da je prisotnih večje število mtDNA haplotipov (17), ki ne kažejo jasnega geografskega vzorca porazdelitve. Arhivski vzorci iz obdobja 2000-2002 so pokazali, da je bila situacija že takrat bistveno bolj kompleksna kot je bilo pričakovano, saj smo našli vsaj sedem različnih haplotipov, ki so bili že tedaj prisotni in so zato zaključki iz tistega časa preveč splošni in ne odražajo realnega stanja v populaciji. Analizirali smo 290 vzorcev, med katerimi so bili vzorci, zbrani v okviru tega projekta in vzorci iz obdobja 2002-2004, ki smo jih uporabili tudi za analizo mtDNA Pregled MS označevalcev na 25 lokusih v populaciji kranjske čebele je pokazal, da je v populaciji prisotna precejšnja genetska pestrost, vendar je na nekaterih lokusih

prisoten močno prevladujoč alel. Tak primer je lokus Ac306, kjer je frekvenca prevladujočega alela 164 kar 0,85, ali lokus A43, kjer je frekvenca prevladujočega alela 140 68%. Na nekaterih drugih lokusih smo opazili izjemno alelno pestrost, ki kaže na kompleksnot populacijske strukture KČ. Tak primer je lokus Ap53, kjer le najpogostejša alela dosežeta frekvenco 0,10, vsi ostali pa veliko nižje frekvence. Na osnovi študija literature smo izbrali 25 mikrosatelitnih lokusov, ki smo jih uporabili za tipizacijo genomske DNA čebel, ki pripadajo različnim populacijam, hkrati pa jih bomo uporabili za preverjanje porekla genetskega materiala pri vzrejevalcih matic. Isti set markerjev nam omogča oceno genetskih distanc med populacijami in ugotavljanje genetske strukturiranosti populacij. Žal za sosednje populacije ni podatkov za tako veliko število lokusov, tako da bomo morali nekaj tipizacij v populacijah iz Avstrije in Italije še opraviti. S programom Structure smo analizirali podatke in iskali prisotnost geografskega vzorca znotraj populacije kranjske čebele. Z analizo podatkov s programom Genetix smo uspeli delno razslojiti podatke iz različnih geografskih območij, v največji meri se od skupne gruče vzorcev ločijo vzorci s Krasa in delno tudi vzorci s Tolminskega. V obeh primerih gre lahko za introgresijo genetskega materiala iz Italije. Z uporabo programa STRUCTURE nismo uspeli ločiti posameznih podpopulacij iz populacije kranjske čebele ob predpostavki obstoja različnih podpopulacij. Na ta način smo skušali preveriti, če so razlike med populacijsko strukturo z različnih geografskih območij dovolj velike, da bi te geografsko grupirane vzorce lahko ločevali tudi na osnovi genetskih parametrov. Izkazuje se, da so komponente različnih genetskih skupin prisotne tako rekoč v vseh vzorcih, da doprinos različnih genotipov sicer med vzorci variira, vendar razlike niso dovolj značilne, da bi lahko govorili o geografsko ločenih genetskih entitetah.

Uvrstitev vzorcev čebeljega tankega črevesa in čebeljega rektuma v drevesih podobnosti kaže na to, da v večini primerov vzorci čebel iz različnih geografskih območij Slovenije tvorijo lastne gruče. Te gruče se, glede na geografsko območje, uvrstijo vsaka zase. Vzrok za takšno razporeditev vzorcev v drevesu podobnosti je lahko različna paša na teh območjih, ki lahko nadalje pogojuje sestavo mikrobne združbe v prebavnem traktu kranjske čebele. Kolikšen je pri tem vpliv genotipskih razlik pa bo treba preveriti v prihodnosti.

Genetska variabilnost znotraj genov za nekodirajoče RNA predstavlja vir potencialnih biooznačevalcev za fenotipske lastnosti. Med ncRNA je zelo dobro raziskan razred mikro RNA (miRNA). V zadnji izdaji podatkovne zbirke miRBase je navedenih 218 genov za miRNA. V predhodnih raziskavah smo izdelali bioinformacijsko orodje microRNA SNIper, s katerim je možno prekriti informacije o genih za mikroRNA (miRNA) in genetskimi polimorfizmi pri vrstah živali, za katere je genom že anotiran in na razpolago v genomskem brskalniku Ensembl (Zorc et al., 2012; Jevšinek Skok in sod., 2013). V prvih verzijah razvoja orodja teh informacij za čebelo ni bilo možno pridobiti, saj verziji zbirk Ensembl in miRBase nista bili usklajeni. Z objavo Ensembl verzija 72 (09/2013) je bilo možno to orodje razviti tudi za genom čebele. Na ta način bomo lahko izdelali katalog polimorfizmov in regulatornih elementov, ki se nahajajo v genih za miRNA v genomu čebele. Za potrditev vedenjskih razlik v plesnem sporazumevanju (K. vonFrisch 1967) smo pripravili mešano družino z dodajanjem delavk italijanskih čebel v družino kranjske čebele. Italijanske čebele delavke (pazili smo, da nismo prinesli trotov, poleg tega pa poskus izvedli v septembru, ko ni več prahe matic) smo dodali v opazovalni panj s kranjsko matico in kranjskimi čebelami. Čebele smo privadili na krmišče na oddaljenosti 56 m, kjer se najbolj zanesljivo vidijo razlike v plesnem sporazumevanju (Johnson in sod., 2002). Kranjske čebele so plesale v večjem številu in več krogov zapored, italijanske pa le redko in večinoma le z enim zibanjem. Kljub temu, da je bilo težko prepoznati dejansko obliko plesa (kroženje in osmičenje), je bila jasna razlika v trajanju potresavanja zadka med plesom. Italijanke so kazale dolgotrajnejše potresavanje kot kranjske čebele.

Za preverjanje učinka fitofarmaceutskih sredstev na čebele smo začeli z razvojem celičnega modela, ki temelji na primarni celični kulturi celic, ki smo jih pridobili iz ličink, starih 2-3 in ličink 9-10 dni ter iz jajčec. Čebelja jajčeca in ličinke smo nabirali 4.5.2012, 8.6.2012, 27.7.2012 in 25.9.2012. Nabrana jajčeca in ličinke smo spravili v 0,9% fiziološko raztopino sobne temperature z dodatkom fungizona. V 5ml fiziološke raztopine smo dodali 500µl fungizona. Pri prvem poskusu smo uporabili 0,9% fiziološko raztopino brez dodatka fungizona, nato pa smo v vseh ostalih ponovitvah dodajali fungizon, da bi preprečili prenos okužbe v kulturo celic. Primerjava rasti celic ličink starih 2-3dni in 9-10 dni v Grace insect mediju je pokazala da celice ličink starih 2-3 dni rastejo boljše. Opazno je bilo, da celice ličink starih 2-3 dni, najprej narastejo nato pa njihova vrednost pade pod vrednost ličink starih 9-10 dni, vendar po 13. dnevu naraste nad vrednost ličink starih 9-10 dni.

## 5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>

Raziskovalni projekt je dosegel zastavljene cilje in dal odogovore na vsa v programu dela

zastavljena vprašanja. Celo več, dodali smo tudi modula za študij mikrobiote in vzpostavitev celične kulture. Ta dva segmenta bosta v prihodnje služila kot dobrodošlo orodje za študij učinka okoljskih dejavnikov na čebele (celična kultura) in pri proučevanju genetske osnove ekotipov (mikrobiota), ki jo bomo skušali nadgraditi tudi z epigenetskimi mehanizmi, ki smo jih tudi že poskusno vključili v pričujoči projekt.

Kot končni rezultat projekta smo oblikovali priporočila za čebelarje in tako izpolnili osnovno nalogo v okviru projektnega predloga, namreč oblikovati strategijo, ki bo omogočila bolj učinkovito zaščito kranjske čebele.

Z uporabo orodij, ki smo jih imeli na voljo v tem projektu smo ustrezno pojasnili stanje v populaciji kranjske čebele v RS, pričakujemo pa, da bomo v enem od prihodnjih projektov lahko uporabili bolj zmogljiva genomska orodja, ki smo jih morali iz tega projekta žal zaradi finančnih omejitev izločiti.

## 6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>4</sup>

Kot že zgoraj omenjeno, smo še v fazi pogajanj morali izprojektne predloga izločiti razvoj SNP čipa, ki bi zagotovo predstavljal mnogo boljše orodje za naslavljanje številnih vprašanj v projektu. Pričakujemo, da bomo v prihodnjih raziskavah to obljubo lahko ustrezno finančno podprli in ta nova orodja uporabili za iskanje odgovorov o genetski strukturi populacije kranjske čebele.

Tekom projekta se projektne skupina ni spreminjala in je ostala v začetni sestavi, kot ob prijavi projekta.

## 7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>5</sup>

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	3494504	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Pregled metod za razlikovanje populacij medonosne čebele, ki jih uporabljajo evropski čebelarji	
	ANG	A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping	
Opis	SLO	Članek povzema različne metode za fenotipsko razlikovanje populacij medonosne čebele v Evropi in njihovo vrednotenje v različnih populacijah medonosne čebele.	
	ANG	This article summarizes the various methods for phenotypic differentiation of populations of honeybees in Europe and their evaluation in different populations of honeybees.	
Objavljeno v	Bee Research Association; Journal of Apicultural Research; 2011; Vol. 50, No. 1; str. 51-84; Impact Factor: 1.531; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.185; WoS: IY; Avtorji / Authors: Bouga Maria, Gregorc Aleš, Kozmus Peter		
Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek		
2.	COBISS ID	2867023	Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Sinergija ksenobiotikov pri medonosni čebeli	
	ANG	The synergy of xenobiotics in honey bee <i>Apis mellifera</i>	
Opis	SLO	Članek obravnava različne mehanizme presnove ksenobiotikov pri medonosni čebeli in ocenjuje njihov učinek na fiziologijo medonosne čebele.	
	ANG	The article discusses the different mechanisms of metabolism of xenobiotics in honeybees and evaluate njihov effect on the physiology of honeybees.	
Objavljeno v	Društvo biologov Slovenije; Acta biologica slovenica; 2013; Vol. 56, no. 1; str. 11-27; Avtorji / Authors: Glavan Gordana, Božič Janko		

Tipologija	1.02 Pregledni znanstveni članek
------------	----------------------------------

## 8. Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

		Družbeno-ekonomski dosežek	
1.	COBISS ID	3806568	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Genetska karakterizacija kranjske čebele	
		<i>ANG</i> The Genetic characterization of <i>Apis mellifera carnica</i>	
	Opis	<i>SLO</i> Prispevek povzema najpomembnejše ugotovitve raziskav na področju mtDNA in mikrosatelitov in opisuje stanje genetske pestrosti v populaciji kranjske čebele.	
		<i>ANG</i> This article summarizes the most significant findings of research on mtDNA and microsatellite markers and describes the status of genetic diversity in the population of the Carniolan bee.	
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	Čebelarska zveza Slovenije; ApiSlovenija; 2012; Str. 15; Avtorji / Authors: Kozmus Peter, Sušnik Bajec Simona, Razpet Andrej, Meglič Vladimir, Dovč Peter	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
2.	COBISS ID	3805800	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i> Rejske in selekcijske aktivnosti povezane z <i>Apis mellifera carnica</i> v Sloveniji	
		<i>ANG</i> Breeding and selection activities of <i>Apis mellifera carnica</i> in Slovenia	
	Opis	<i>SLO</i> Prispevek povzema najpomembnejše poudarke selekcijskega programa za kranjsko čebelo in predlaga ukrepa za njeno zaščito in ohranjanje biotske pestrosti v populaciji.	
		<i>ANG</i> This article summarizes the most significant principles of selection program for the Carniolan honey bee and proposes measures for its protection and conservation of biological diversity in the population.	
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	Čebelarska zveza Slovenije; ApiSlovenija; 2012; Str. 12, 45; Avtorji / Authors: Kozmus Peter	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	

## 9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>7</sup>

Pomemben rezultat dela projektne skupine je priprava metodologije za populacijsko presejavanje na osnovi genotipizacije 25 mikrosatelitnih lokusov. Test je optimiran v več multipleks reakcijah in omogoča hitro in zanesljivo genotipizacijo večjega števila osebkov v razmeroma kratkem času. Z izjemo SNP čipov je to še vedno najboljše orodje za genotipizacijo genomske DNA in nam daje dobro osnovo za karakterizacijo populacij medonosne čebele.

Karakterizacija mikrobiote in proučevanje epigenetskih mehanizmov predstavljata popolnoma nov pristop k proučevanju ekotipov in obetata v prihodnosti dobre možnosti za opis krajevnih različic kranjske čebele.

## 10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>8</sup>

### 10.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>9</sup>

*SLO*

Rezultati projekta povezujejo uporabo genetskih metod za karakterizacijo populacij mednosne čebele s stanjem v populaciji kranjske čebele v Sloveniji. Ker je Slovenija relativno zaprt habitat in je promet s čebelami znotraj Slovenije prost, je pričakovati, da zaradi prometa z maticami in prevoznega čebelarjenja razlike med krajevnimi različicami postopno izginjajo. Hkrati je populacija izpostavljena pritisku sosednjih populacij in nesistematičnemu sporadičnemu vnosu tujerodnih čebel. Glede na ta dejstva je stanje v populaciji kranjske čebele zelo zanimivo in lahko z detajlnim študijem genetske strukture populacije sklepamo na dogodke v bližnji in daljni preteklosti, ki so botrovali izoblikovanju genetskih mehanizmov, ki obvladujejo to populacijo. S tega aspekta predstavlja populacija kranjske čebele zelo zanimiv raziskovalni objekt.

ANG

The results of the project are linking the use of genetic methods for characterization of populations of honey bees with the situation in the Carniolan bee population in Slovenia. Since Slovenia is a relatively closed habitat and bee traffic in Slovenia is free, it is expected that due to the transport beekeeping differences between local varieties are gradually disappearing. At the same time, the population is exposed to pressure from neighboring populations and unsystematic and sporadic introduction of non-native bees. Under these circumstances, the situation in the population of the Carniolan bee in Slovenia is very interesting and with the detailed study of the genetic structure of population we can conclude about the events in the near and distant past that formed genetic mechanisms that affect this population. In this aspect, the population of the Carniolan bee represents a very interesting research material.

## 10.2.Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>

SLO

Ohranitev kranjske čebele je za slovensko kmetijstvo eden osrednjih naravovarstvenih ciljev. Gre za enega najpomembnejših genetskih resursov, ki je osrednjega pomena tudi v mednarodnem merilu, in za katerega nosimo večji del odgovornosti. Ker je čebela tudi pomemben bioindikator in opraševalec, seveda njen pomen daleč presega direktni cilj proizvodnje medu. Ustrezno pozicioniranje slovenskega čebelarstva v mednarodnem okviru in zagotovitev obstoja in razvoja tega genetskega vira je pomembna naloga našega kmetijstva in tudi širše skrbi za naravo in okolje.

ANG

Preservation of the Carniolan bee is for Slovenian agriculture one of the main conservation objectives. Carniolan bee is one of the most important genetic resources, which is central as well for the national agriculture as for the international community, giving the republic of Slovenia the bulk of responsibility for its preservation. As the bee is also an important bioindicator and pollinator, of course, its importance goes far beyond the direct objective the production of honey. Proper positioning of Slovenian apiculture in an international context and to ensure the existence and development of this genetic resource is an important task of our agriculture and also wider care about our nature and environment.

## 11.Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine.

### 11.1.Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih
- pri domačih uporabnikih

**Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?**<sup>11</sup>

Za rezultate projekta izražajo interes čebelarji, predvsem pa njihova krovna organizacija, Čebelarska zveza Slovenije, ki je tudi že organizirala posvet, kjer smo predstavili rezultate projekta.

### 11.2.Vpetost raziskave v tuje okolje



Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v mednarodnih znanstvenih krogih  
 pri mednarodnih uporabnikih

**Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:**<sup>12</sup>

V okviru dela na projektu in sodelovanja s partnerji v tujini smo navezali tesne stike z raziskovalno skupino dr. Sare Botti (Parco Tecnologico Padano, Lodi), s katero smo tudi sodelovali pri pripravi predloga evropskega projekta v okviru FP7. Tesne stike imamo tudi s prof. Kasparjem Bienefeldom z univerze v Berlinu, s katerim se dogovarjamo za uporabo SNP čipa, ki ga je razvila njegova skupina.

**Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:**<sup>13</sup>

Prijava skupnega evropskega projekta za razvoj genetskih markerjev za ohranitev medonosne čebele in njene biodiverzitete v okviru FP7:  
Sustainable control of apiculture disease and conservation of honey bee genetic diversity.  
Acronym: SustainaBee  
Funding Scheme: Collaborative Project  
Large-scale integrating project targeted to SMEs  
Work Programme Topic:  
KBBE.2013.1.3-02: Sustainable apiculture and conservation of honey bee genetic diversity, Co-ordinator Sara Botti, Fondazione Parco Tecnologico Padano (FPTP)

## 12. Izjemni dosežek v letu 2013<sup>14</sup>

### 12.1. Izjemni znanstveni dosežek

Rezultati genetske analize populacije kranjske čebele so pokazali rahlo strukturiranost, ki jo lahko povežemo z geografskim poreklom čebel. Verjetno gre za vpliv *A.m. ligustica* v mejnem območju z Italijo, zato se vzorci iz obmejne regije rahlo ločujejo od odsrednje slovenskih. Pregled pestrosti mitohondrijskih haplotipov kaže na veliko pestrost, ki nakazuje na bistveno kompleksnejšo situacijo kot je bila domnevana pred to raziskavo. Večji del genetske pestrosti verjetno izvira že iz naravne populacije medonosne čebele na tem območju.

### 12.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Predstavitev stanja v populaciji kranjske čebele v povezavi z načeli in cilji rejskega programa so pomembna podpora delu čebelarjev, ki si želijo ohraniti kranjsko čebelo na njenem izvornem območju in jo želijo tudi obvarovati pred škodljivimi vplivi okolja (policija in škodljivci). Za napredek rejskega programa bomo morali več pozornosti posvečati zdravju čebel in njihovi odpornosti na bolezni. Tako izboljšanje stanja v populaciji bo tudi dvignilo ceno slovenskih matic na svetovnem trgu in povečalo ugled slovenskega čebelarstva v svetu.

## C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

**Podpisi:**

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
raziskovalne organizacije:*

in

*vodja raziskovalnega projekta:*

Univerza v Ljubljani, Biotehniška  
fakulteta

Peter Dovč

---

## ŽIG

Kraj in datum: 

Ljubljana,	15.4.2014
------------	-----------

### Oznaka prijave: ARRS-CRP-ZP-2014-01/18

---

- <sup>1</sup> Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)
- <sup>2</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- <sup>3</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- <sup>4</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)
- <sup>5</sup> Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta.  
Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'. [Nazaj](#)
- <sup>6</sup> Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta.  
Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A" ali A'.  
Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.  
Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)
- <sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>8</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)
- <sup>9</sup> Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>10</sup> Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>11</sup> Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>12</sup> Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>13</sup> Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>14</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2013 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu.



Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/> [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2014-01 v1.00

85-4D-D5-8A-30-BE-1B-58-49-82-32-8D-C9-6A-6F-D7-5F-E0-DE-15

# Genetske karakteristike kranjske čebele

Genetic characteristics of Carniolan honey bee

## Povzetek

Projekt obravnava kompleksno vprašanje genetske karakterizacije kranjske čebele z uporabo sodobnih genetskih metod. Preliminarne raziskave so pokazale, da je genetska pestrost v slovenski populaciji kranjske čebele precej večja kot je bilo sprva pričakovano. V projektu smo zato skušali ugotoviti ali je bila genetska pestrost v populaciji *Apis mellifera carnica* sprva podcenjena, ali pa je v zadnjih letih prišlo do nekontroliranega vnosa tujerodnih čebel v slovensko populacijo. V ta namen smo uporabili nabor različnih pristopov, ki vključujejo analizo jedrnih genetskih označevalcev, mitohondrijske DNA in analizo mikrobiote v prebavilih čebel. Potencialni vnos tujerodnih čebel smo proučevali s sekvenčno analizo mtDNA arhivskega materiala izpred desetih let in s primerjavo z rezultatom naših analiz v letih 2009 in 2010. Morfološke lastnosti (predvsem kubitalni indeks in barva abdominalnih obročkov) smo uporabili za izoblikovanje meril za opis kranjske čebele. S proučevanjem mikrobiote v prebavilih čebel smo ugotavljali razlike v sestavi mikrobiote na različnih geografskih lokacijah in tako skušali postaviti osnovo za identifikacijo ekotipov. Za proučevanje pomembnih vedenjskih in metabolnih značilnosti kranjske čebele smo vzpostavili celične linije z različnim genetskim ozadjem in tako pripravili orodje za študij učinka fitofarmaceutskih sredstev na čebele. Celovita analiza celotnega seta nam daje novo sliko o genetski strukturi populacije kranjske čebele v Sloveniji in nam omogoča postavitev kriterijev za ohranjanje populacije. Z uvedbo fizičnega preverjanja porekla matic, vzrejenih v Sloveniji, bomo lahko povečali zaupanje v pristnost našega plemenskega materiala in prispevali k doseganju boljše cene na mednarodnem tržišču.

## Ključne besede

*kranjska čebela, genetska struktura, kontrola porekla, mtDNA, kvantitativni lokusi, morfološki znaki, introgresija, mikro čipi, genetski označevalci.*

## Abstract

The project addresses the complex issue of genetic characterization of Carniolan bee using modern genetic methods. Our preliminary studies have shown that the genetic diversity in the Slovenian population Carniolan bee is much higher than originally expected. In this project we therefore tried to determine whether the genetic diversity in the population of *Apis mellifera carnica* in Slovenia was initially underestimated, or in recent years the uncontrolled introduction of non-native bees in the Slovenian population occurred. We used a range of different approaches, including analysis of nuclear genetic markers, mitochondrial DNA and analysis of the microbiota in the gut of bees. The potential introduction of non-native bees was studied using the mtDNA sequence analysis of ten years old archival material and by comparison with the results of our analyzes in 2009 and 2010. Morphological characteristics (especially cubital index and abdominal color rings) were used to set up criteria for the description of the Carniolan bee. By studying the microbiota in the gut of bees we found differences in the composition of the microbiota in different geographical locations and so set the basis for the identification of ecotypes. Important for the study of behavioral and metabolic characteristics of the Carniolan bee, we have established cell lines with different genetic backgrounds and established the tool to study the effect of plant protection products on bees. A comprehensive analysis of the entire set of data revealed a new picture of the genetic structure of the Slovenian population of the Carniolan bee and allows us to set the criteria for the conservation of the population. With the introduction of the physical control of the origin of queens reared in Slovenia, we can increase the confidence in the authenticity of our breeding stock and contribute to achieving better prices on the international market.

## Key words

*Carniolan honey bee, genetic structure, parentage control, mtDNA, quantitative trait loci, morphological traits, introgression, micro arrays, genetic markers.*

## Opis problema in ciljev

Kranjska čebela (*Apis mellifera carnica*) – je v Sloveniji avtohtona in zaščitena podvrsta čebel. V Sloveniji je z zakonom prepovedan vnos drugih podvrst in linij medonosne čebele ter njihovo križanje s kranjsko čebelo. Zaradi obsežne trgovine s čebelami v preteklosti in cenjenih morfoloških in etoloških lastnosti je danes kranjska čebela druga najbolj razširjena rasa čebel na svetu. Slovenija velja za izvorno deželo kranjske čebele, zaradi česar je povpraševanje po slovenskih maticah stalno prisotno in se v zadnjih letih povečuje, tako da je večje od ponudbe matic na slovenskem trgu. Kljub temu cene v Sloveniji vzrejenih matic na svetovnem trgu ne dosežajo cen, ki bi bile primerljive s cenami matic iz drugih čebelarsko razvitih dežel. Ker je kranjska čebela v Sloveniji avtohtona in zaščitena podvrsta čebel in ker Slovenija velja za izvorno območje čiste kranjske čebele, kamor je uvoz tujerodnih čebel prepovedan, bi pričakovali, da je populacija kranjske čebele v Sloveniji, kljub domnevam, da je prisotnih več ekotipov, genetsko dokaj homogena in da jo je mogoče z ustreznimi genetskimi označevalci razlikovati od sosednjih populacij medonosne čebele,

predvsem tistih, ki se od kranjske čebele ločijo tudi po fenotipskih znakih. Seveda pa je geografsko območje naselitve kranjske čebele precej večje od ozemlja RS in sega predvsem na širše območje Balkana in v sosednjo Avstrijo. V tem kontekstu se pojavlja vprašanje, če se slovenska populacija kranjske čebele genetsko razlikuje od fenotipsko podobnih sosednjih populacij in kolikšna je stopnja genetske pestrosti v celotni populaciji kranjske čebele. V zadnjih nekaj letih čebelarji opozarjajo, da nezanimljiv delež čebel fenotipsko ne ustreza opisu kranjske čebele, kar zbuja sum, da je prišlo do vnosa tujerodnih čebel.

Za učinkovito zaščito in ohranitev kranjske čebele je potrebno to podvrsto čebel ustrezno genetsko opredeliti in vzpostaviti sistem za presojo genetske čistosti populacije kranjske čebele. Razlog za to, da je v drugih populacijah interes raziskovalcev predvsem usmerjen v proučevanje izvora in evolucije populacij, manj pa v preverjanje porekla posameznih matic, je verjetno tudi dejstvo, da vzrejevalci iz tujine bolj kot genetski izvor vzrejenih matic poudarjajo in tržijo njihove gospodarske lastnosti, vzrejevalci iz Slovenije pa bolj kot gospodarske lastnosti tržijo genetski potencial lastnih vzrejenih matic (kranjske čebele z izvornega območja). V prihodnosti se bo ta vidik po vsej verjetnosti še okrepil, ker lokalne populacije čebel zaradi pritiska tujih komercialnih linij vse bolj izginjajo

### **Povzetek ključnih ugotovitev iz literature in predhodnih raziskav**

Raziskovalci so se v preteklosti pri preučevanju kranjske čebele in drugih podvrst medonosne čebele osredotočali predvsem na preučevanje populacijske genetike in na ugotavljanje evlucijskega izvora in mešanja posameznih podvrst čebel (Franck in sod., 2001; De la Rúa in sod., 2001; Shaibi in sod., 2009). Pri podvrstah, ki izkazujejo večjo variabilnost so uspeli identificirati genetske označevalce, ki omogočajo delitev podvrste na pod-populacije (ekotipe), ki naseljujejo posamezna geografska območja (Garnery in sod., 1993). Ker se mtDNA deduje samo po materini plati to v čebelarstvu pomeni, da je vnos novega tipa mtDNA v populacijo mogoč samo z vnosom matic in čebeljih družin, ki imajo drugačen tip mtDNA, kot ga je imela prvotna populacija. Primer takega vnosa novih tipov mtDNA v populacijo divjih čebel predstavlja rojenje selekcijskih linij čebel v Avstraliji (Paini, 2004). Zaradi visoke stopnje genetske variabilnosti se je proučevanje najbolj variabilnega dela mtDNA, ki se nahaja med genoma COI in COII uveljavilo kot ustrezno orodje za razlikovanje in filogenetsko opredelitev populacij čebel. Ker gre v teh primerih v glavnem za razločevanje na ravni podvrst, je bilo upravičeno začetno pričakovanje, da se posamezne rase čebel med seboj razlikujejo glede na tip mtDNA. To pričakovanje utemeljujejo visoka frekvenca mutacij v mtDNA, ki omogoča akumulacijo mutacij v relativno kratkem evlucijskem času, geografska izolacija med posameznimi rasami in prisotnost ozkih grl ob formiranju ras, kar vse omogoča formiranje prevladujočega tipa mtDNA znotraj posameznih ras. Prve raziskave mtDNA medonosne čebele so podprle delitev podvrst vrste *Apis mellifera* v pet glavnih skupin haplotipov (A, M, C, O, Y) ki se ujemajo z glavnimi filogenetskimi linijami čebel (Franck in sod., 2001). Porazdelitev tipov mtDNA v različnih taksonomskih skupinah (vrstah, podvrstah, lokalnih populacijah) je dokaj različna in različno dobro odraža stanje v populaciji.

V preteklosti je bilo narejenih nekaj študij, ki so obravnavale mtDNA v populaciji kranjske čebele. Le-ta je bila glede na genetske značilnosti uvrščena v filogenetsko linijo C, zanjo je bil opisan en sam haplotip gena v mtDNA regiji COI-COII in sicer haplotip C2c (Kozmus in sod., 2002; Sušnik in sod., 2004). To je impliciralo tudi sklep, da se posamezni ekotipi, o katerih je v preteklosti tekla živahna debata, med seboj ne ločijo po tipu mtDNA. Kozmus in sod. (2002) poročajo, da na osnovi genetskih analiz čebel v Sloveniji ni bilo mogoče sklepati na vnos čebel iz tujine, ki bi pripadale alohtonim linijam čebel. Podobno tudi raziskava 269 vzorcev z desetih geografskih območij v Sloveniji z bolj variabilnimi genetskimi označevalci (mikrosateliti) ni potrdila značilne genetske diferenciacije med tako imenovanimi ekotipi kranjske čebele (Sušnik in sod., 2004), te rezultate pa podpira tudi raziskava morebitnih razlik med ekotipi na osnovi kubitalnega indeksa (Kozmus, 2008), ki tudi ni pokazala statistično značilnih razlik med ekotipi. Na osnovi teh rezultatov je prevladalo mnenje, da je v populaciji kranjske čebele v Sloveniji prisoten en sam haplotip (C2c) in da je pojav drugih haplotipov znak, da je prišlo do vnosa tujega genetskega materiala.

V letu 2009 je bila opravljena analiza matičnih panjev kranjske čebele, v kateri je bilo identificiranih osem različnih haplotipov, od katerih so bili prevladujoči trije (ti skupaj predstavljajo 88% analiziranih vzorcev), in sicer C2c, ki smo ga povezovali s populacijo kranjske čebele in C1a, ki je veljal za značilen haplotip za populacijo italijanske čebele (*A.m. ligustica*). Tretji prevladujoči haplotip C2j prej še ni bil opisan in je še najbolj podoben haplotipu, ki je bil opisan v populaciji makedonske čebele (*A.m. macedonica*). V letu 2010 je sledila sistematična analiza mtDNA na 945 lokacijah v Sloveniji, ki je pokazala prisotnost 17 različnih haplotipov (od tega je bilo 10 haplotipov, ki so se le malenkostno razlikovali od sedmih bolj pogostih). Najpogostejši so bili isti trije haplotipi kot v predhodni raziskavi (skupaj 86%), torej C2j (37%), C2c (26%) in C1a (23%). Analiza podatkov kaže, da ni opazne geografske distribucije haplotipov C1a (italijanska čebela) in C2j (nov, izven Slovenije še neopisan haplotip).

Na osnovi teh rezultatov ugotavljamo, da je stanje v slovenski populaciji čebel bistveno drugačno, kot ga opisujeta Kozmus s sod., 2002 in Sušnik s sod., 2004. Razlike lahko interpretiramo na več načinov. Ena možnost je, da zaradi nekoliko drugačne metodike, ki je bila uporabljena v predhodnih raziskavah vse raznolikosti ni bilo mogoče zaznati (vedno moramo upoštevati tudi razlike pri strategijah vzorčenja). Naše simulacije, v katerih smo rezultate, ki smo jih dobili s sekvenciranjem mtDNA, prevedli v haplotipe, ki bi jih lahko določili z restrikcijsko analizo, kažejo, da bi tudi s preprostejšo metodologijo morali vsaj v primeru haplotipa C1a najti nekaj osebkov s tem haplotipom. Druga možnost pa je, da je dejansko prihajalo do znatnega vnosa tujerodnih čebel v zadnjem desetletju, kar pa se zdi ob upoštevanju naše zakonodaje in dobrega strokovnega dela v čebelarstvu manj verjeten scenarij. Poleg mtDNA raziskovalci v zadnjih letih za populacijske študije uporabljajo tudi mikrosatelitne lokuse, ki zaradi svoje domnevne selekcijske nevtralnosti in visoke stopnje mutacij predstavljajo dober sistem za odkrivanje strukturiranosti populacij in oceno genetskih distanc med njimi. Ker pa je pojav privatnih alelov ali striktna odsotnost posameznih alelov v realnih populacijah relativno redek pojav, ta tip markerjev ni najbolj primeren za določanje genetske čistosti populacij, še posebej ob upoštevanju dejstva, da je

dedovanje mikrosatelitov biparentalno in svoj delež genetske pestrosti v populacijo prinesejo troti, ki, vsaj v mejnih področjih, lahko pripadajo drugim populacijam ali celo podvrstam. Tudi rezultati analiz mikrosatelitov pri kranjski čebeli kažejo na pričakovano genetsko pestrost znotraj populacije, odsotnost strukturiranosti, ki bi pričala o obstoju ekotipov in ob pomanjkanju ustreznih podatkov za sosednje populacije tudi ne omogočajo jasne razmejitev med populacijo kranjske čebele in sosednjimi populacijami (Sušnik in sod., 2004).

#### Literura

**De la Rúa P.**, Galian J., Serrano J., Moritz R.F.A. (2001) Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain), *Apidologie* 32, 417–427

**Franck, P.**, Garnery, L., Loiseau, A., Oldroyd, P., Helburn, H. R., Solignac, M., Cornuet, J. M. 2001. Genetic diversity of the honeybee in Africa: Microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86; 420-430

**Franck, P.**, Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.M. 1998. The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 52, 1119-1134

**Garnery, L.**, Solignac, M., Celebrano, G. and Cornuet, J.M. (1993). A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia* 49: 1016-102

**Kozmus P.** (2008) Ugotavljanje prisotnosti ekotipov kranjske čebele (*Apis mellifera carnica* Pollman) v Sloveniji na podlagi razlik v ožiljenosti prednjih kril. *Acta agric.*

*Slov.* 92 (2): 139-149.

**Kozmus P.**, Sušnik S., Poklukar J., Meglič V. (2002) Opredelitev populacij kranjske čebele (*Apis mellifera carnica* Pollman) na osnovi analize mitohondrijske DNK. *Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, Zootehnika,*

*Agricultural issue, Zootechnica*, 80 (2): 181-191.

**Paini, D.R.**, 2004. Impact of the introduced honey bee (*Apis mellifera*)

(Hymenoptera: Apidae) on native bees: A review. *Australian Ecol.*, 29: 399–407

**Shaibi, T.**, I. Muñoz, R. Dall'Olio, M. Lodesani, P. De la Rúa & R.F.A. Moritz. 2009. *Apis mellifera* evolutionary lineages in Northern Africa: Libya, where orient meets occidente. *Insectes Sociaux* 56: 293-30

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

indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. *Apidologie*, 35:623-636.



## Material in metode

V raziskavi smo obravnavali vzorce čebel, ki smo jih zbrali za namen raziskave na različnih lokacijah v Sloveniji in z njimi skušali pokriti geografsko distribucijo kranjske čebele in različne kategorije čebelarjev (proizvodne obrate in matičarje). Za preverjanje porekla matic smo zbrali serijo večletnih vzorcev pri matičarjih in na osnovi haplotipov mtDNA ugotavljali skladnost genetskega materiala skozi leta. Vzorce za vzpostavitev celične kulture smo zbirali v čebelnjaku Biotehniške fakultete in Čebelarске zveze Slovenije, vzorce za ugotavljanje razlik med čebelami v različnih okoljih pa v Ribnici, Čretežu in v Ljubljani. Poleg vzorcev iz Slovenije smo v študiji obravnavali tudi vzorce iz Avstrije, z mejnega območja z Italijo in iz Hrvaške. Za opredelitev časovne perspektive smo aktualne vzorce primerjali z arhivskimi vzorci iz obdobja 2000-2002.

Genetsko strukturo populacije smo ugotavljali na osnovi nukleotidnega zaporedja regije med COI in COII mitohondrijske DNA. Sekvenciranje smo izvedli s klasično Sangerjevo metodo na avtomatskem DNA sekvenatorju ABI 3100xl. Poleg mitohondrijskih markerjev smo uporabljali tudi mikrosatelitne lokuse, ki smo jih izbrali na osnovi literaturnih podatkov in testiranja na vzorcih kranjske čebele. Uporabili smo 25 mikrosatelitov in na osnovi teh rezultatov ocenili osnovne genetske parametre populacije s programom Genetix (stopnjo genetske pestrosti populacije, delež heterozigotov, frekvence alelov in genetske distance). S programom STRUCTURE smo preverjali prisotnost populacijskih substruktur in možnost ugotavljanja regionalnih specifik v populaciji kranjske čebele.

Za preverjanje razlik med geografsko ločenimi populacijami smo iz vzorcev zbranih v Ribnici, Čretežu (Krško), Sužidu (Kobarid) in Ljubljani izolirali vsebino prebavil in s polimerazno verižno reakcijo pomnožili gene za ribosomalno RNA različnih taksonomskih skupin bakterij. Dobljene amplifikate smo ločili z gelsko elektroforezo v denaturacijskem gradientu in rezultate obdelali s statističnim programom za ugotavljanje podobnosti med elektroforetskimi vzorci.

Celice za vzpostavitev primarne celične kulture smo osamili iz ličink, starih 2-3 dni, ličink starih 9-10 dni ter iz jajčec. Jajčeca in ličinke smo spravili v 0,9% fiziološko raztopino sobne temperature z dodatkom fungizona. Za kultivacijo celic smo uporabljali gojišča za celične kulture insektov pod standardnimi laboratorijskimi pogoji.

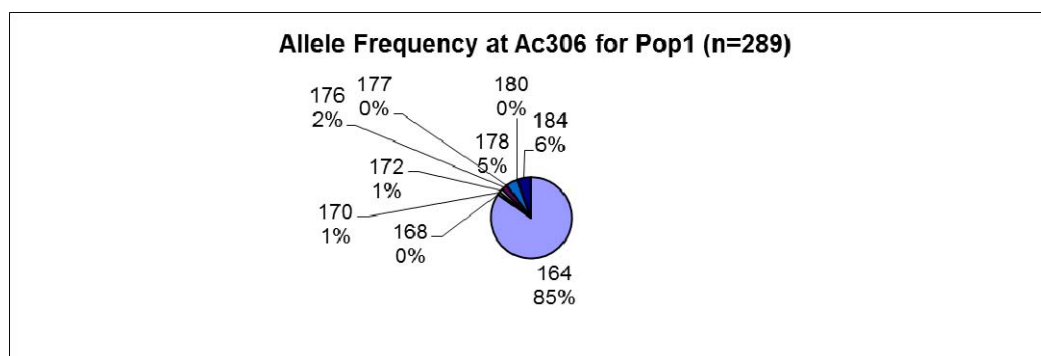
Vedenjske značilnosti smo proučevali v poskusu z opazovanjem v poskusnem panju Biotehniške fakultete ob beleženju posnetkov v časovni vrsti. Za napoved epigenetskih dejavnikov, ki vplivajo na profil izražanja genov smo uporabili bioinformacijska orodja in podatke iz javnih podatkovnih zbirk.

## Rezultati raziskave

### 1. Primerjava stanja v populaciji KČ in preverjanje porekla matic

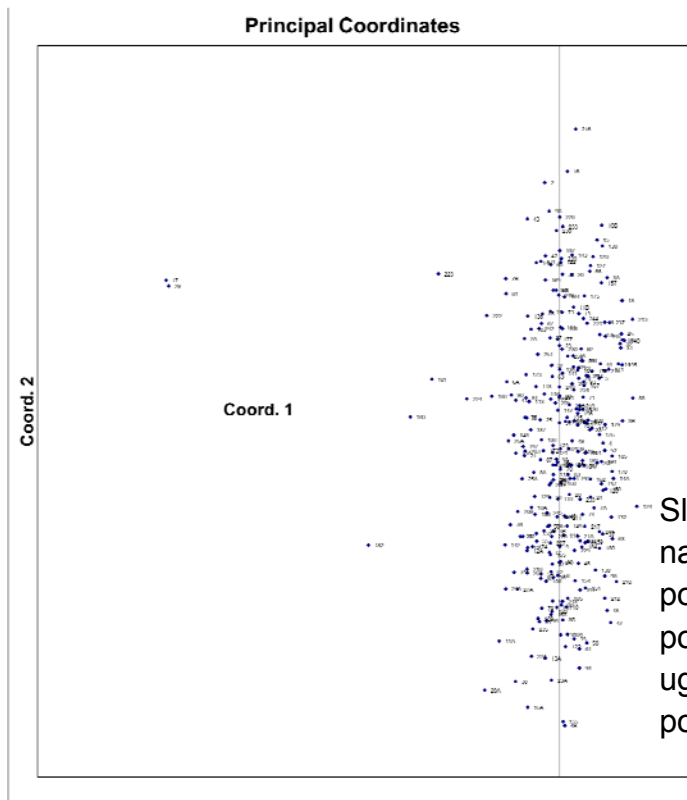
Na vzorcih DNA, ki smo jih zbrali za tekoči poskus in arhivskih vzorcev iz leta 2002 smo skušali dobiti pregled nad genetsko pestrostjo mitohondrijskih haplotipov v populaciji kranjske čebele v zadnjih desetih letih. Ker so bili arhivski vzorci v večji meri analizirani z restrikcijsko analizo, ki je bistveno manj natančna kot sekvenciranje, je tedaj prevladal vtis, da je situacija v populaciji KČ zelo enostavna in da je prisoten en sam haplotip (Kozmus in sod., 2004). Poleg materiala, ki smo ga proučili v predhodnih študijah in je bil zbran v letih 2008-2010, smo v okviru projekta zbrali aktualne vzorce (2011 in 2012) ter s ponovno analizo referenčnega arhivskega materiala proučili populacijsko dinamiko kranjske čebele zadnjih desetih letih. Sekvenciranje vzorcev čebel od vzrejvalcev matic je pokazalo, da je porazdelitev mtDNA haplotipov v Sloveniji enaka porazdelitvi haplotipov v študijah v letih 2009 in 2010. To potrjuje našo tezo, da je genetska konstitucija populacije kranjske čebele v Sloveniji kompleksna in da je prisotnih večje število mtDNA haplotipov (17), ki ne kažejo jasnega geografskega vzorca porazdelitve. Arhivski vzorci iz obdobja 2000-2002 so pokazali, da je bila situacija že takrat bistveno bolj kompleksna kot je bilo pričakovano, saj smo našli vsaj sedem različnih haplotipov, ki so bili že tedaj prisotni in so zato zaključki iz tistega časa preveč splošni in ne odražajo realnega stanja v populaciji.

Analizirali smo 290 vzorcev, med katerimi so bili vzorci, zbrani v okviru tega projekta in vzorci iz obdobja 2002-2004, ki smo jih uporabili tudi za analizo mtDNA Pregled MS označevalcev na 25 lokusih v populaciji kranjske čebele je pokazal, da je v populaciji prisotna precejšnja genetska pestrost, vendar je na nekaterih lokusih prisoten močno prevladujoč alel. Tak primer je lokus Ac306, kjer je frekvenca prevladujočega alela 164 kar 0,85 (slika1), ali lokus A43, kjer je frakvenca prevladujočega alela 140 68%.



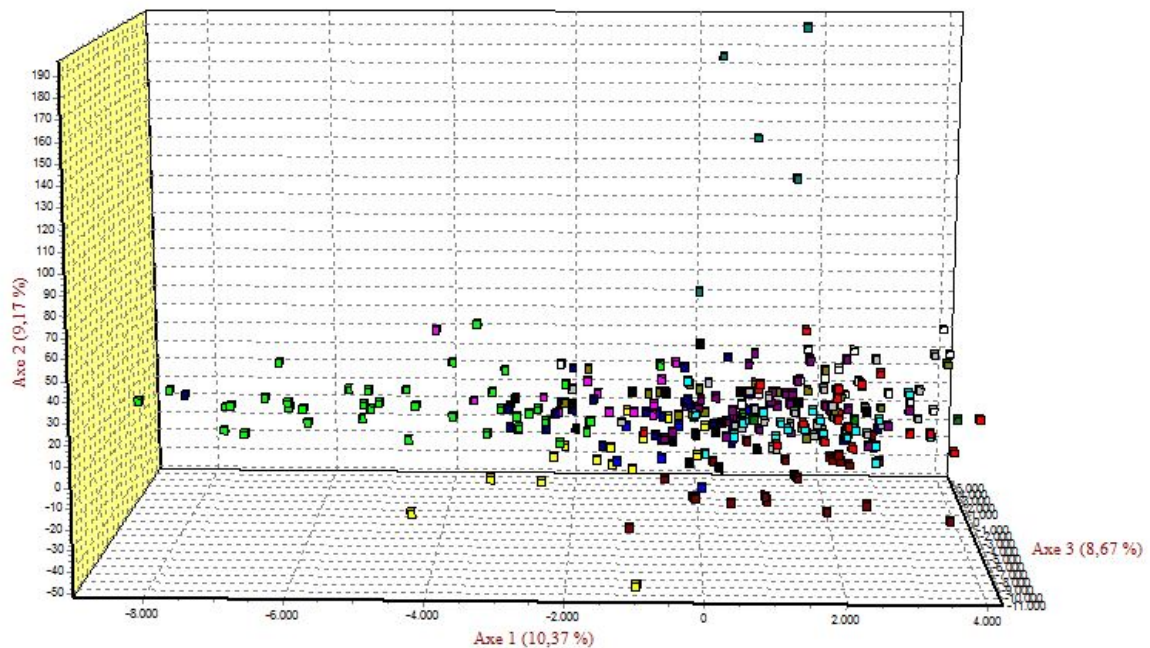
Slika 1: Alelne frekvence na lokusu Ac306 v populaciji KČ





Slika 3: Preliminarna PCA analiza kaže na veliko razpršenost genotipov in posledično široko genetsko bazo v populaciji KČ. Za natančnejše ugotavljanje strukture populacije bodo potrebne nadaljnje statistične analize.

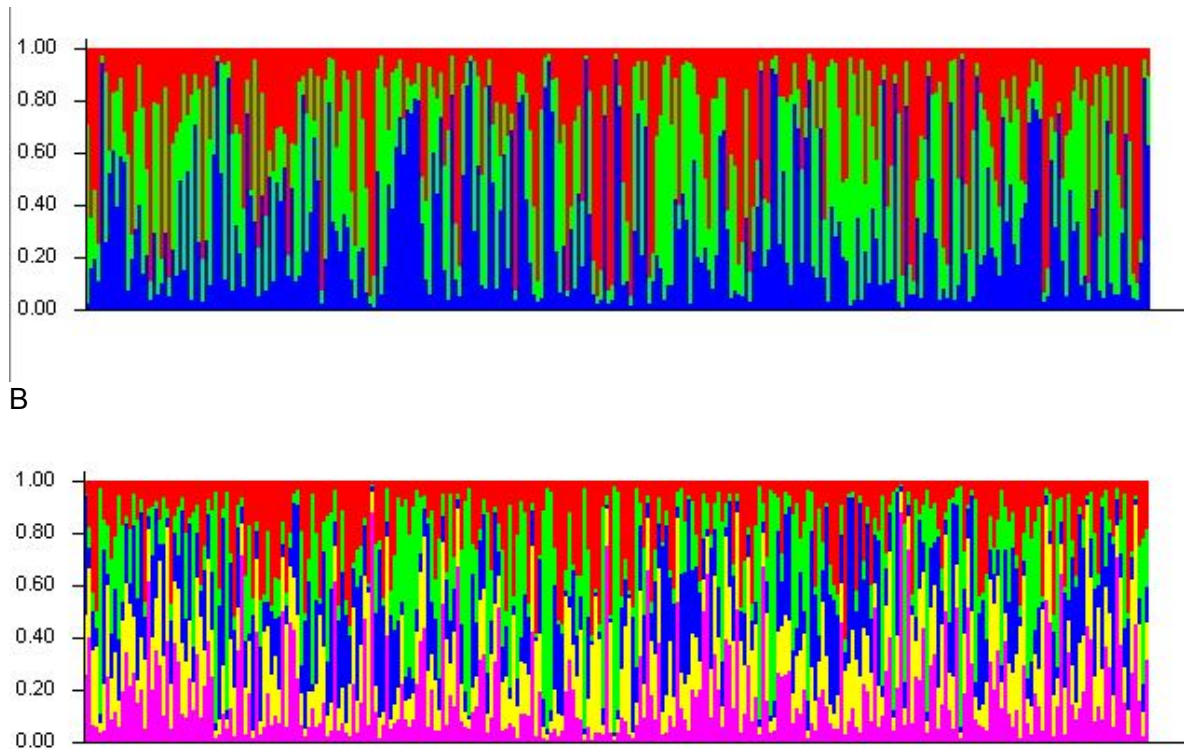
Z analizo podatkov s programom Genetix smo uspeli delno razslojiti podatke iz različnih geografskih območij, v največji meri se od skupne gruče vzorcev ločijo vzorci s Krasa in delno tudi vzorci s Tolminskega. V obeh primerih gre lahko za introgresijo genetskega materiala iz Italije. Rezultati so prikazani na sliki 4.



Slika 4.: Raztros podatkov genetske pestrosti mikrosatelitnih lokusov. Podatki so obdelani s programom Genetix. Legenda: zeleno: Kras, rumeno: Bovec/Tolmin, rdeče: Štajerska, modro: Prekmurje.

Z uporabo programa STRUCTURE nismo uspeli ločiti posameznih podpopulacij iz populacije kranjske čebele ob predpostavki obstoja različnih podpopulacij. Na ta način smo skušali preveriti, če so razlike med populacijsko strukturo z različnih geografskih območij dovolj velike, da bi te geografsko grupirane vzorce lahko ločevali tudi na osnovi genetskih parametrov. Izkaže se, da so komponente različnih genetskih skupin prisotne tako rekoč v vseh vzorcih, da doprinos različnih genotipov sicer med vzorci variira, vendar razlike niso dovolj značilne, da bi lahko govorili o geografsko ločenih genetskih entitetah.

A



Slika 5. Strukturiranost populacije kranjske čebele: A: ob predpostavki obstoja treh različnih genetskih skupin, B: ob predpostavki petih različnih genetskih skupin. Podatki so bili obdelani s programom STRUCTURE.

### 3. Ekotipi

Domneve o obstoju različnih ekotipov KČ izvirajo iz morfoloških opažanj (Poklukar, 2004), ki pa jih je bilo težko, oziroma nemogoče potrditi v novejših študijah (Kozmus, 2008). V okviru pričujočega projekta smo se lotili proučevanja razlik med čebelami različnega geografskega porekla na osnovi molekularno biološke analize strukture črevesne mikrobiote iz prebavnega trakta KČ (medeni želodček, tanko črevo, rektum). Ker je sestava mikrobiote odvisna od prehrane, v določeni meri pa tudi od imunskega sistema gostitelja, je utemeljeno pričakovanje, da bi se ekotipi morali razlikovati po sestavi mikrobiote, kar je vsaj delno lahko posledica genotipskih razlik.

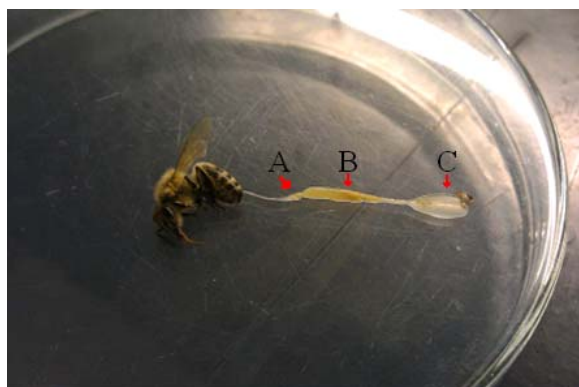
V poskusu smo želeli z molekularnim profiliranjem mikrobni združb pokazati morebitne razlike v sestavi črevesne mikrobiote iz prebavnega trakta kranjske čebele glede na lokacijo in posledično različno vrsto paše čebeljih družin (Preglednica 1).



Preglednica 1: Seznam vzorčenja čebeljih družin v različnih krajih v Sloveniji.

Datum vzorčenja	Kraj bivanja čebelje družine	Vrsta paše	Oznaka vzorca
3/7/2013	Večna pot, Ljubljana (Biotehniška fakulteta)	Sadno drevje, javorji, divji in pravi kostanj, lipa, smreka.	K
24/7/2013	Čretež pri Krškem	Divja češnja, gorski javor, navadna robinija, pravi kostanj.	Č
24/7/2013	Dolenja vas v Ribnici	Jelka, javorji.	R
24/7/2013	Dolenja vas v Ribnici in dva tedna Čretež pri Krškem	Divja češnja, gorski javor, navadna robinija, pravi kostanj in dva tedna jelka, javorji.	ČR
24/7/2013	Sužid pri Kobaridu, Primorska	Lipa, navadna robinija.	P

Vzorci za analizo smo odvzeli 3/7 oz. 24/7/2013. Pred odvzemom smo čebele ohladili na  $-20^{\circ}\text{C}$  in nato s kirurškim priborom odprli čebelji zadek in izvlekli čebelji prebavni trakt, ki smo ga nato razdelili na segmente: A-medeni želodček, B-tanko črevo in C-rektum (Slika ). Vsak segment posebej smo do analize zamrznili pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .



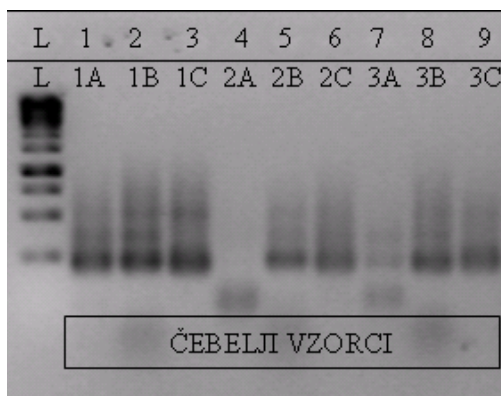
Slika 6: Prebavni trakt kranjske čebele, ki smo ga razdelili po segmentih na A-medeni želodček, B-tanko črevo in C-rektum.

Skupno mikrobno DNK smo osamili s postopkom, ki vključuje fizikalno razbijanje celic z ultrazvokom in kemijsko čiščenje (CTAB, fenol-kloroform). Ribosomske gene (16S rDNK) smo pomnožili v verižni reakciji s polimerazo, pri tem smo uporabili začetne

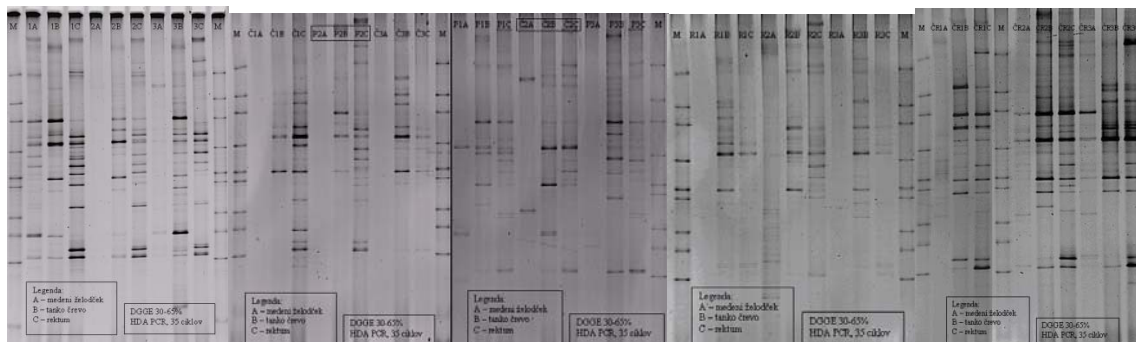
oligonukleotide HDA1-GC in HDA2. Uspeh pomnoževanja smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo, uspešno namnožene produkte PCR pa smo analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v denaturirajočem polju (DGGE). Pri analizi rezultatov se je pokazalo, da je pri vzorcih medenega želodčka količina bakterij tako majhna, da DNK le-teh s standardnimi mikrobiološkimi postopki nismo mogli osamiti in pomnožiti pri vseh vzorcih, zato rezultatov teh vzorcev nismo vključili v nadaljnjo analizo. Pri vzorcih čebeljega tankega črevesa in čebeljega rektuma smo uspeli osamiti in pomnožiti bakterijsko DNK pri vseh vzorcih, rezultate pa smo predstavili z drevesi podobnosti (

Slika in

Slika ). Pri tem smo uporabili Pearsonov koeficient podobnosti.

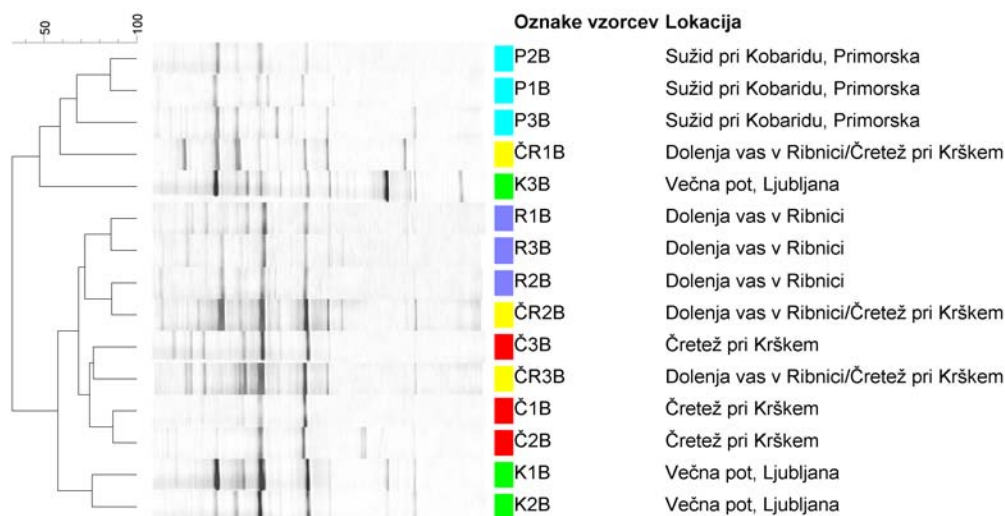


Slika 7: Pomnožitev izolirane mikrobne DNK pri vzorcih čebel iz Ljubljane v verižni reakciji s polimerazo (PCR) z uporabo začetnih oligonukleotidov HDA1-GC in HDA2. Pričakovan pomnožek je dolg okrog 200bp.



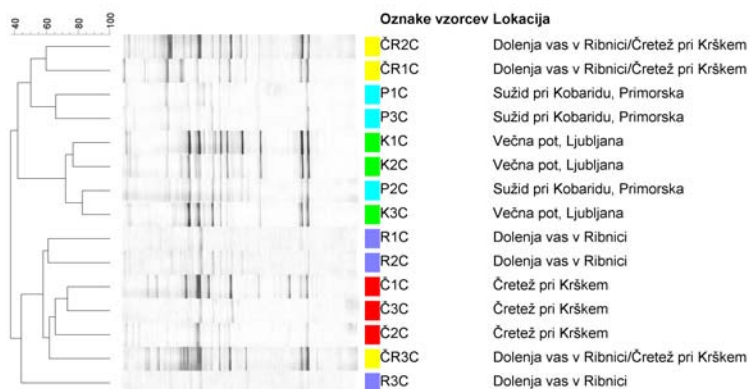
Slika 8: DGGE profil vzorcev čebelje družine iz Ljubljane, Čreteža pri Krškem, Sužida pri Kobaridu, Dolenje vasi pri Ribnici in iz Dolenje vasi pri Ribnici, ki je nato dva tedna bivala in se pasla v Čretežu pri Krškem.

Pearson correlation (Opt:0.70%) [7.2%-100.0%]  
 DGGE\_HDA\_30-65 DGGE\_HDA\_30-65



Slika 9: Drevo podobnosti med molekularnimi profili mikrobnih združb v vzorcih čebeljega tankega črevesa.

Pearson correlation (Opt:0.70%) [7.2%-100.0%]  
 DGGE\_HDA\_30-65 DGGE\_HDA\_30-65



Slika 10. Drevo podobnosti med molekularnimi profili mikrobnih združb v vzorcih čebeljega rektuma.

Drevo podobnosti za vzorce čebeljega tankega črevesa kaže, da se vzorci čebel iz Ribnice in Čreteža, z izjemo vzorca ČR1B, uvrstijo skupaj. Pri tem vzorci iz Ribnice, kjer je značilna gozdna paša (jelka, javorji), tvorijo svojo gručo, medtem ko vzorci iz Čreteža, kjer je značilna cvetlična paša (divja češnja, navadna robinija...), tvorijo svojo. Izkaže se, da se vzorca ČR2B in ČR3B uvrstita k vzorcem iz Ribnice oz. k vzorcem iz Čreteža. To je bilo pričakovano, saj so čebele iz te družine najprej živele in se hranile v Ribnici, nato pa dva tedna v Čretežu. Od te gruče se ločita vzorca

čebel iz Ljubljane, kjer so se čebele pasle na javorjih, sadnem drevju in divjem kostanj. Značilno se od preostalih vzorcev ločijo vzorci čebel s Primorske, kjer je čebelji družini glavno pašo predstavljala lipa in navadna robinija (

Slika ).

Podobno kot pri vzorcih čebeljega tankega črevesa, se tudi pri vzorcih čebeljega rektuma pokaže, da se vzorci čebel iz Čreteža in Ribnice uvrstijo v svojo gručo. Zraven se uvrsti tudi vzorec ČR3C, kjer so čebele živele na obeh krajih, medtem ko se preostala vzorca ČR2C in ČR1C iz te čebelje družine uvrstita posebej (

Slika ). Vzrok za takšno uvrstitev je lahko v tem, da se je mikrobna združba v rektumu teh dveh čebel, zaradi spremembe okolja in posledično druge hrane, spremenila toliko, da ni več podobna mikrobni združbi v rektumu čebel iz Čreteža, medtem ko sprememba ni bila tolikšna, da bi bila sedaj mikrobna združba podobna tisti v rektumu čebel iz Ribnice.

Uvrstitev vzorcev čebeljega tankega črevesa in čebeljega rektuma v drevesih podobnosti kaže na to, da v večini primerov vzorci čebel iz različnih geografskih območij Slovenije tvorijo lastne gruče. Te gruče se, glede na geografsko območje, uvrstijo vsaka zase. Vzrok za takšno razporeditev vzorcev v drevesu podobnosti je lahko različna paša na teh območjih, ki lahko nadalje pogojuje sestavo mikrobne združbe v prebavnem traktu kranjske čebele. Kolikšen je pri tem vpliv genotipskih razlik pa bo treba preveriti v prihodnosti.

#### 4. Morfološke značilnosti

Morfološke značilnosti so pomembne za razločevanje različnih ekotipov čebel, vendar je za uspešnost teh postopkov odločilnega pomena izbor ustreznih morfoloških znakov. V okviru projekta smo pregledali nabor morfoloških znakov, ki se najpogosteje uporabljajo za ločevanje med geografsko ločenimi populacijami – ekotipi- in med njimi posebej izpostavili ožiljenost kril.

Medonosna čebela (*Apis mellifera*) je prvotno naseljevala Afriko, Evropo in Bližnji ter Srednji vzhod. Med populacijami so se izoblikovale velike morfološke razlike predvsem zaradi raznolikosti okolja, ki so ga naseljevale. Za ločevanje podvrst čebel je bila najprej uveljavljena barva čebel, ki je najbolj prepoznavna lastnost. Uvedba morfometričnih metod je omogočila merjenje določenih morfoloških lastnosti, s tem pa natančnejše razvrščanje podvrst čebel. Analizo ožiljenosti kril je vpeljal Goetze (1940), pristop pa je še danes pogosto uporabljen v večini vzrejnih in ohranitvenih programov za posamezne podvrste čebel (Leclercq, 1999). Na osnovi morfoloških raziskav je Ruttner s sod. (1978) in Ruttner (1988) opisal 24 podvrst, ki jih je glede na njihov izvor uvrstil v tri različne filogenetske linije: afriško, severno zahodnoevropsko in jugo-vzhodnoevropsko. Na krilih lahko merimo in izračunavamo številne lastnosti, med katerimi so najbolj informativne in največkrat uporabljene: 10 kotov na žilnem sistemu (A4, B4, D7, E9, G18, J10, J16, K19, L13, O26), razdalje a, b, c, d, kubitalni indeks ter širina in dolžina prednjih kril (Kauhausen-Keller, 1994; Nazzi, 1992). Poleg

njih so za razločevanje podvrst čebel uveljavljene še naslednje morfološke karakteristike: dolžina rilčka, dolžina dlačic, dolžina in širina goleni, dolžina stegna ter dolžina in širina tretjega hrbtnega obročka (Preglednica 2).

Preglednica 2: nabor morfoloških metod, ki se uporabljajo za opis geografsko ločenih populacij.

	Trait		Trait
1	cubital index	11	Angle E9
2	tongue length	12	Angle G18
3	length of hair on tergite	13	Angle J10
4	metatarsus length	14	Angle J16
5	metatarsus width	15	Angle K19
6	femur length	16	Angle L13
7	third tergite length	17	Angle N23
8	third tergite width	18	Angle O26
9	Angle B4	19	fore wing width
10	Angle D7	20	fore wing length

Na podlagi ožiljenosti kril je bila v letu 2007 opravljena analiza populacije kranjske sivke v Sloveniji, ki pa znotraj populacije ni ugotovila razlik, ki bi nakazovala obstoj ekotipov (Kozmus 2008).

#### 5. Epigenetski dejavniki uravnavanja genskega izražanja

Genetska variabilnost znotraj genov za nekodirajoče RNA predstavlja vir potencialnih bioznačevalcev za fenotipske lastnosti. Med ncRNA je zelo dobro raziskan razred mikro RNA (miRNA). V zadnji izdaji podatkovne zbirke miRBase je navedenih 218 genov za miRNA. V predhodnih raziskavah smo izdelali bioinformacijsko orodje microRNA SNIPer, s katerim je možno prekriti informacije o genih za mikroRNA (miRNA) in genetskimi polimorfizmi pri vrstah živali, za katere je genom že anotiran in na razpolago v genomskem brskalniku Ensembl (Zorc et al., 2012; Jevšinek Skok in sod., 2013). V prvih verzijah razvoja orodja teh informacij za čebelo ni bilo možno pridobiti, saj verziji zbirk Ensembl in miRBase nista bili usklajeni. Z objavo Ensembl verzija 72 (09/2013) je bilo možno to orodje razviti tudi za genom čebele. Na ta način bomo lahko izdelali katalog polimorfizmov in regulatornih elementov, ki se nahajajo v genih za miRNA v genomu čebele.

Še posebej pomembne za razvoj bioznačevalcev so ncRNA, ki se nahajajo znotraj gostiteljskih proteina-kodirajočih genov (Godnič in sod. 2013). Rezultati kažejo, da se okoli 50% genov za miRNA nahaja znotraj gostiteljskih genov. Trenutno zaključujemo in silico analizo na ravni celotnega genoma (GWISS), s katero bomo identificirali intragenske miRNA v genomu čebele.

#### 6. Vedenjske značilnosti

Čebele imajo v naravi posebno funkcijo, saj pomagajo pri oprahčevanju samoniklih in gojenih rastlin in veliko prispevajo k pridelavi hrane. Čebela kot sama je nesposobna živeti samostojno, zato živi v čebelji družini, ki je sestavljena iz čistilk, krmilk, gradilk, stražarjev in čebel delavk. Čebele same po sebi niso agresivne živali, napadejo le, ko se počutijo ogrožene ali ko je ogrožen njihov panj. Po napadalnosti se najbolj razlikujeta rasi evropskih medonosnih čebel (EHB) in afrikanizirane čebele (AHB). Na obrambno vedenje vplivajo tri QTL regije: sting-1, sting-2 in guard QTL. Te QTL regije kodirajo gene, katerih proteini sodelujejo pri delovanju centralnega živčnega sistema, njihove homologe pa lahko najdemo tudi v modelnem organizmu *Drosophila melanogaster*. Na napadalnost naj bi direktno vplival juvenilni hormon, ki pri čebelah uravnava pojav t. i. starostnega polietizma. Glede na količino juvenilnega hormona v telesu, ki se spreminja s starostjo, bo čebela opravljala določeno funkcijo v panju. Stražarji imajo najvišjo koncentracijo juvenilnega hormona v sebi. Juvenilni hormona esteraza je encim, ki razgrajuje juvenilni hormon in tako pomaga pri nadzoru količine hormona v hemolimfi. Medvrstna primerjava aminokislinskega zaporedja je pokazala, da je ta encim in s tem juvenilni hormon značilen le za žuželke.

Za potrditev opisanih razlik v plesnem sporazumevanju (K. vonFrisch 1967) smo pripravili mešano družino z dodajanjem delavk italijanskih čebel v družino kranjske čebele. Italijanske čebele delavke (pazili smo, da nismo prinesli trotoev, poleg tega pa poskus izvedli v septembru, ko ni več prahe matic) smo dodali v opazovalni panj s kranjsko matico in kranjskimi čebelami. Čebele smo privadili na krmišče na oddaljenosti 56 m, kjer se najbolj zanesljivo vidijo razlike v plesnem sporazumevanju (Johnson in sod., 2002). Kranjske čebele so plesale v večjem številu in več krogov zapored, italijanske pa le redko in večinoma le z enim zibanjem. Kljub temu, da je bilo težko prepoznati dejansko obliko plesa (kroženje in osmičenje), je bila jasna razlika v trajanju potresavanja zadka med plesom. Italijanke so kazale dolgotrajnejše potresavanje kot kranjske čebele.

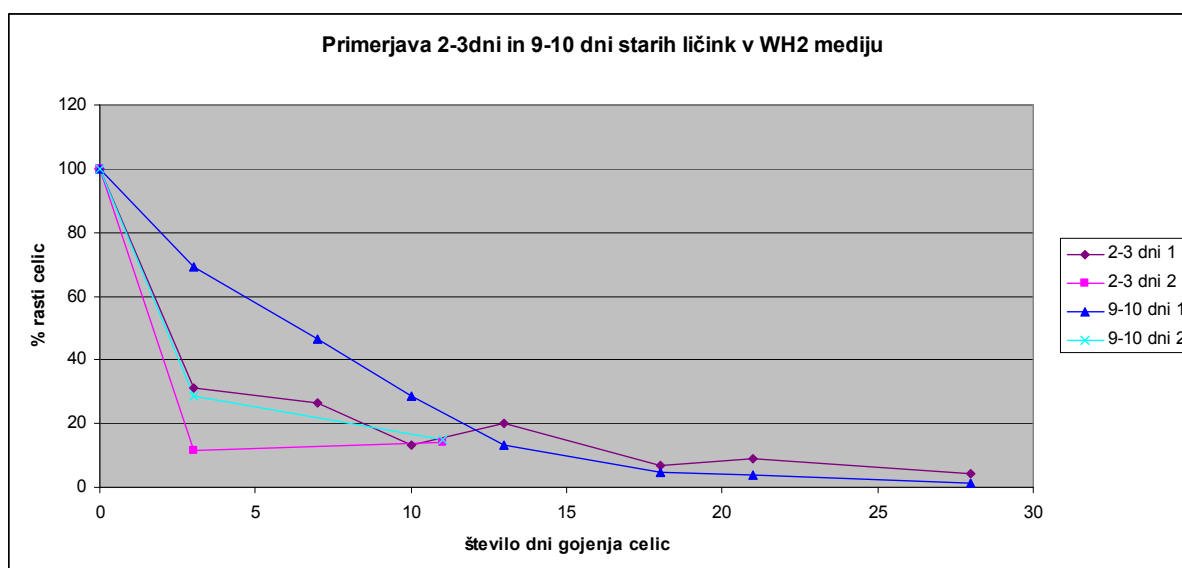
## 7. Celična kultura

Za preverjanje učinka fitofarmaceutskih sredstev na čebele smo začeli z razvojem celičnega modela, ki temelji na primarni celični kulturi celic, ki smo jih pridobili iz ličink, starih 2-3 in ličink 9-10 dni ter iz jajčec. Čebelja jajčeca in ličinke smo nabirali 4.5.2012, 8.6.2012, 27.7.2012 in 25.9.2012. Nabrana jajčeca in ličinke smo spravili v 0,9% fiziološko raztopino sobne temperature z dodatkom fungizona. V 5ml fiziološke raztopine smo dodali 500 $\mu$ l fungizona. Pri prvem poskusu smo uporabili 0,9% fiziološko raztopino brez dodatka fungizona, nato pa smo v vseh ostalih ponovitvah dodajali fungizon, da bi preprečili prenos okužbe v kulturo celic. V laboratoriju smo jajčeca in ličinke prenesli na ločene membrane BD Falcon cell strainer 40 $\mu$ m nylon, pod njih pa postavili petrijevko. Nato smo jajčeca in ličinke čebel sterilizirali s 70% etanolom, v katerem smo jih pustili približno 1 minuto. Sledilo je 2-3x spiranje s PBS. Na membrano z jajčeci in ličinkami smo dodali 1 ml Grace insect medija in nato nežno z batom inekcijske igle zdrobili jajčeca in ličinke ob sprotnem spiranju z



medijem. Dobljene celice smo centrifugirali, odstranili supernatant in resuspendirali pelet v ustrezni količini medija. Pelet celic jajčec smo resuspendirali v 150 $\mu$ l, pelet celic ličink starih 2-3 dni v 1ml, pelet celic ličink starih 9-10 dni, kjer smo dobili večjo količino celic pa smo resuspendirali v 2ml medija. Rast celic smo spremljali z rednim vzorčenjem in štetjem celic pod mikroskopom. Preverjali smo učinek gojišča, temperature inkubacije, starosti celic ter dodatka antibiotikov in vitaminov v gojišče.

Primerjava rasti celic ličink starih 2-3dni in 9-10 dni v Grace insect mediju je pokazala da celice ličink starih 2-3 dni rastejo boljše. Opazno je bilo, da celice ličink starih 2-3 dni, najprej narastejo nato pa njihova vrednost pade pod vrednost ličink starih 9-10 dni, vendar po 13. dnevu naraste nad vrednost ličink starih 9-10 dni. Pri celicah gojene v Grace insect medium z 10x koncentracijo smo opazili, da v začetku gojenja celic boljše uspevajo celice 9-10 dni starih ličink, kljub vmesnemu vrhu celic 2-3 dni starih ličink, ki hitro pade na nizko vrednost, vendar se med 13 in 18 dnevom gojenja celic dvigne nad vrednost ličink starih 9-10 dni. Pri celicah gojenih v L-15 mediju lahko opazimo boljšo rast celic ličink starih 9-10 dni, z izjemo meritve 18. dne, ko naraste vrednost ličink starih 2-3 dni in vrednost ličink starih 9-10 dni pade. Pri 10x koncentraciji antibiotikov imamo ponovno boljšo rast ličink starih 9-10 dni. Pri WH2 gojišču z normalno koncentracijo antibiotikov je prišlo do najboljše rasti pri ličinkah starih 9-10 dni, vendar le do 13. dne meritev, nato pa celice stare 9-10 dni padejo pod vrednosti ličink starih 2-3 dni. Pri celicah starih 2-3 dni smo lahko opazili rast po 13. dnevu. Pri celicah gojenih v WH2 mediju in 10x koncentraciji antibiotikov lahko vidimo, da je ponovno v začetku gojenja boljša rast celic ličink starih 9-10 dni, ponovno se zgodi preobrat okoli 13 dneva, ko vrednost ličink starih 9-10 dni pade pod vrednost ličink starih 2-3 dni. Za ilustracijo prikazujemo potek rasti celic v WH2 mediju (slika 11).



Slika 11: Primerjava rasti celic v WH2 mediju.

## Razprava

Rezultati naše raziskave so pokazali, da je v populaciji kranjske čebele prisotna bistveno večja genetska pestrost kot je bilo sprva pričakovano. Pred desetimi leti predlagan specifičen tip mitohondrijske DNA C2c (Kozmus in sod., 2004) ni edini haplotip v populaciji kranjske čebele in tudi ne absolutno prevladujoči tip. Poleg njega se v populaciji s podobno pogostnostjo pojavljata še tipa C1a in C2j. Na osnovi naših podatkov bi težko trdili, da je C1a iz Italije izhajajoči haplotip, posebej zato, ker to ni edini haplotip, ki ga najdemo v italijanski populaciji čebel. Še bolj nejasen je možen izvor haplotipa C2j, ki še ni bil opisan v nobeni drugi populaciji, je pa podoben haplotipu, ki so ga našli pri makedonski čebeli. S proučevanjem zgodovinskih zapisov o žlahtnjenju kranjske čebele smo prišli do informacije, da so bile makedonske čebele uvožene v Slovenijo v obdobju po drugi svetovni vojni in so jih uporabljali za križanja s kranjsko čebelo. Ker je uvoz matic relativno enostaven postopek, bi lahko domnevali, da je prisotnost haplotipa C2j posledica uvoza makedonskih matic pred približno pol stoletja. Oba haplotipa (C1a in C2j) sta dokaj enakomerno razporejena po celi Sloveniji, torej bi lahko predstavljala del naravne variabilnosti slovenske populacije čebel (poleg haplotipa C2c), oziroma pričata o dolgotrajnem in enakomernem vnosu ter hibridizaciji čebel po celi Sloveniji. Haplotip C2c (predhodno pojmovan kot karakterističen za kranjsko čebelo) je dejansko bolj pogost na Kranjskem (torej Gorenjska, osrednja Slovenija in Notranjska) in bolj redek na Štajerskem, v Prekmurju in na Primorskem. Med manj pogostimi haplotipi izstopa C2d, ki je bolj pogost na Koroškem in Celjskem, medtem ko drugi manj pogosti haplotipi večinoma nastopajo razpršeno, brez zaznavnega geografskega vzorca.

S preverjanjem genetske skladnosti haplotipov matic pri matičarjih v zaporednih letih smo potrdili primernost uporabe DNA sekvenciranja za preverjanje porekla matic. Ker je populacijska struktura mtDNA dokaj pestra, je ujemanje haplotipov v različnih generacijah dober pokazatelj porekla, saj je v populaciji kranjske čebele prisotnih deset različnih haplotipov, ki se pojavljajo z različno pogostnostjo. Seveda ta metoda ne preprečuje zamenjav znotraj istega haplotipa, tako da je treba informacijo o mtDNA haplotipu še dopolniti z jedrnimi markerji, za enkrat so mikrosateliti dovolj informativni za dodatno preverjanje porekla matic.

Stare dileme o obstoju ekotipov čebel, ki jih v preteklosti niso mogli potrditi z analizo fenotipskih značilnosti (kubitalni indeks), s konvencionalnim pristopom analize genetskih markerjev v delih populacije iz različnih geografskih območij nismo mogli potrditi. Strukturiranost populacije je premalo izrazita, da bi jo lahko zaznali bodisi z mtDNA ali za analizo mikrosatelitskih lokusov. Zato smo skušali ugotoviti, če lahko na

osnovi analize mikrobiote iz prebavil čebel ločimo populacije iz različnih geografskih predelov Slovenije. Jasno je, da je sestava mikrobiote predvsem pogojena s trenutno pašo, ki jo imajo čebele in se v glavnem spreminja z vegetacijo. Delno pa je seveda mikrobiota odvisna od interakcije med genotipom gostitelja in mikrofloro v okolju, kjer čebele živijo. Zato je treba naše rezultate interpretirati kot metodološki doprinos, ki kaže na možnost diferenciacije mikrobiote z različnih območij, vendar bi morali poskus še dopolniti s primeri, ko bi analizirali mikrobioto iste družine po prestavitvi na drugo lokacijo, oziroma med genetsko sorodnimi družinami iz ene lokacije, ki bi jih preselili na različne lokacije. S takim eksperimentom bi v prihodnosti lahko iskali tisti del genetske variabilnosti gostitelja, ki vpliva na večjo podobnost mikrobiote med sorodnimi osebki.

S pregledom morfoloških znakov, ki bi jih lahko uporabili za karakterizacijo kranjske čebele smo ugotovili, da so podatki, ki jih imamo na voljo dokaj omejeni (večinoma gre za analizo kubitalnega indeksa) in da so bili ti znaki v preteklosti nezadostni za identifikacijo ekotipov. Z razširitvijo nabora znakov in analizo večjega števila osebkov z različnih območij, bi lahko izboljšali občutljivost metode in mogoče pokazali fenotipske razlike v najbolj ekstremnih okoljih (Primorska, Prekmurje, Gorenjska). Diskrepanca med pričakovanim obstoje ekotipov v preteklosti in njihovo vsaj navidezno odsotnostjo danes vsaj delno izvira tudi iz razširitve prevoznega čebelarstva v zadnjih desetletjih. Ta vpliv je namreč dvojen: če so ekotipi nekoč obstajali, so se zaradi prevoznega čebelarstva lahko izgubili zaradi reprodukcijskega kontakta s čebelami v različnih okoljih, z genetskega vidika je učinek podoben migracijam, ki zmanjšujejo razlike med podpopulacijami in zaradi selekcijskega pritiska v smeri večje prilagodljivosti na različne okoljske razmere. Drugi dejavnik bi namreč povzročil favoriziranje robustnega tipa čebele, ki se je sposobna prilagoditi različnim okoljskim razmeram, posledica tega pa bi bilo izginjanje genotipov, ki so bolj prilagojeni na specifično okolje. V kontekst preverjanja obstoja ekotipov gredo tudi proučevanja epigenetskih mehanizmov in vedenjskih značilnosti.

Vzpostavitev primerne celične kulture pomeni prvi korak na poti razvoja in vitro biološkega sistema za testiranje učinkov fitofarmaceutskih sredstev in zaščitnih sredstev za zatiranje škodljivcev na čebelah. Za enkrat lahko primarne celične kulture vzdržujemo le omejen čas in celice se v kulturi večinoma ne delijo. To zelo omejuje čas trajanja kulture in s tem čas, ki je na voljo za testiranja. Z nadaljnjo optimizacijo pogojev gojenja celic si obetamo podaljšanje časa preživetja, z imortalizacijo celičnih kultur pa bomo skušali pridobiti trajne kulture, ki jih bomo lahko uporabljali kot laboratorijsko orodje za preizkušanje različnih učinkovin.

## Zaključki in priporočila naročniku

- Na osnovi raziskav mtDNA ugotavljamo, da je v populaciji kranjske čebele prisotnih več mtDNA haplotipov in tako ne moremo govoriti o haplotipu, ki bi bil specifičen za to populacijo. Prevladujejo trije haplotipi (C2c, C2j in C1a), poleg njih pa se pojavlja še več (4-7) redkeje zastopanih haplotipov. Menimo, da gre za dlje časa prisotno genetsko pestrost, ki ni izključno posledica nekontroliranega vnosa tujerodnih čebel v populacijo kranjske čebele v zadnjem desetletju.
  - *Priporočilo: Inventarizacijo mtDNA haplotipov je smotrno uporabiti za karakterizacijo posameznih linij, na osnovi frekvenc posameznih haplotipov pa se je treba odločiti, če je smiselno enako ohranjati vse haplotipe.*
- Mitohondrijska DNA je tej situaciji primerno orodje za preverjanje porekla matic, vendar je primerno analize dopolniti tudi z analizo mikrosatelitnih lokusov, verjetno bi zadoščal že izbor manjšega števila lokusov.
  - *Priporočilo: Sekvenciranje DNA in analizo osnovnega seta mikrosatelitov lahko zanesljivo uporabljamo kot orodje za preverjanje porekla matic.*
- Obstoja ekotipov ni mogoče pokazati na osnovi mtDNA in mikrosatelitov. Statistična obdelava podatkov ni pokazala jasne ločitve populacij čebel z različnih lokacij v Sloveniji, je pa pokazala diferenciacijo vzorcev iz Avstrije in obmejnega območja z Italijo. Proučevanje mikrobiote v prebavilih čebel je sicer pokazalo razlike med geografsko opredeljenimi vzorci, ni pa mogoče določiti v kolikšni meri je to posledica različnega okolja (mikroflora iz okolja v prebavilih čebel) in genotipa gostitelja (selekcija mikrobiote kot rezultat delovanje gostiteljskega genoma).
  - *Priporočilo: Poleg uporabljenih genetskih označevalcev bi bilo smotrno nadaljevati raziskave z uporabo bolj zmogljivih orodij (bio čipi), kar bi na ta način lahko odkrili bolj subtilne razlike med populacijami iz različnih okolij, ki jih z orodji, ki smo jih uporabili v tej študiji, nismo mogli. Obsežnejši poskus karakterizacije mikrobiote bi lahko podprl obstoj ekotipov.*
- Razvoj celičnih linij odpira velik potencial za in vitro testiranje različnih fitofarmaceutskih sredstev in zaščitnih sredstev za čebele, vendar je treba pogoje gojenja celi še optimirati in podaljšati dobo kultivacije.
  - *Priporočilo: Nadaljnje delo na optimizaciji kultivacije celic bo omogočilo dolgotrajnejšo kultivacijo, posebej pa bi lahko preživetje celic v kulturi podaljšali z imortalizacijo celic in etabliranjem trajne celične kulture.*

## Refernce, povezane z izvedbo projekta:

1. BLATNIK, Eva. *Bioinformacijska analiza kandidatnih genov v genomu čebel : diplomski seminar = Bioinformatic analysis of candidate genes in the honey bee genome : B. Sc. thesis*, (Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomski seminar univerzitetni študij - 1. stopnja, 86). Ljubljana: [E. Blatnik], 2012. VI, 21 f., [10] f. pril., ilustr., preglednice. [COBISS.SI-ID [7173241](#)]
2. BOUGA, Maria, GREGORC, Aleš, KOZMUS, Peter. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping = Revisión de los métodos para discriminar las poblaciones de abejas aplicados en la apicultura europea. *J. Apic. Res.*, 2011, vol. 50, no. 1, str. 51-84, doi: [10.3896/IBRA.1.50.1.06](#). [COBISS.SI-ID [3494504](#)]
3. BOŽIČ, Janko, GLAVAN, Gordana, TERGLAV, Anka. Beekeepers as promoters of biodiversity - how and why? = Pčelari kao promotori biološke raznovrsnosti - kako i zašto?. V: ŽIVADINOVIĆ, Rodoljub (ur.). *Uticaj tehnike pčelarenja, zdravstvene zaštite pčela i prirodne sredine na kvalitet pčelinjih proizvoda* : [zbornik radova]. Novi Beograd: Savez pčelarskih organizacija Srbije, 2012, str. 124-125, 122-123. [COBISS.SI-ID [265076480](#)]
4. DOVČ, Peter. The impact of genetics in the concept of sustainable agriculture. V: International Conference "Role of research in sustainable development of agriculture and rural areas", Podgorica, May 23-24, 2012. *Role of research in sustainable development of agriculture and rural areas*, (Poljoprivreda i šumarstvo, vol. 57, iss. 1-4, 2012). Podgorica: Biotechnical faculty, University of Montenegro, 2012, no. 2, str. 57-68. <http://www.agricultforest.ac.me/data/20130327-04%20Dovc%20Vol%2057%20Iss%202.pdf>. [COBISS.SI-ID [3215752](#)]
5. GLAVAN, Gordana, BOŽIČ, Janko. The synergy of xenobiotics in honey bee *Apis mellifera* : mechanisms and effects = Sinergizem ksenobiotikov v medonosni čebeli *Apis mellifera* : mehanizmi in učinki. *Acta biol. slov.*. [Tiskana izd.], 2013, vol. 56, no. 1, str. 11-27. [COBISS.SI-ID [2867023](#)]
6. GODNIČ, Irena, ZORC, Minja, JEVŠINEK SKOK, Daša, CALIN, George Adrian, HORVAT, Simon, DOVČ, Peter, KOVAČ, Milena, KUNEJ, Tanja. Genome-wide and species-wide in silico screening for intragenic microRNAs in human, mouse and chicken. *PloS one*, 2013, vol. 8, no. 6, str. 1-14, e-65165.
7. JEVŠINEK SKOK, Daša, GODNIČ, Irena, ZORC, Minja, HORVAT, Simon, DOVČ, Peter, KOVAČ, Milena, KUNEJ, Tanja. Genome-wide in silico screening for microRNA genetic variability in livestock species. *Anim. genet.*, 2013, in press,. [COBISS.SI-ID [3249544](#)], [JCR, Scopus do 18. 9. 2013: št. citatov (TC): 1, čistih citatov (CI): 1, normirano št. čistih citatov (NC): 1]

8. KOZMUS, Peter, SUŠNIK BAJEC, Simona, RAZPET, Andrej, MEGLIČ, Vladimir, DOVČ, Peter. The Genetic characterization of *Apis mellifera carnica* = Opredelitev genetskih značilnosti čebele *Apis mellifera carnica*. V: AUGUŠTIN, Vladimir (ur.), KANDOLF, Andreja (ur.), SENIČ, Lidija (ur.), KOZMUS, Peter (ur.). *Api Slovenija : [zbornik]*. Brdo pri Lukovici: Čebelarska zveza Slovenije, 2012, str. 15. [COBISS.SI-ID [3806568](#)]
9. KOZMUS, Peter, SUŠNIK BAJEC, Simona, RAZPET, Andrej, MEGLIČ, Vladimir, DOVČ, Peter. The Genetic characterization of *Apis mellifera carnica* = Opredelitev genetskih značilnosti čebele *Apis mellifera carnica*. V: AUGUŠTIN, Vladimir (ur.), KANDOLF, Andreja (ur.), SENIČ, Lidija (ur.), KOZMUS, Peter (ur.). *Api Slovenija : [zbornik]*. Brdo pri Lukovici: Čebelarska zveza Slovenije, 2012, str. 15. [COBISS.SI-ID [3806568](#)]
10. KOZMUS, Peter, SUŠNIK BAJEC, Simona, RAZPET, Andrej, MEGLIČ, Vladimir, DOVČ, Peter. The Genetic characterization of *Apis mellifera carnica* = Opredelitev genetskih značilnosti čebele *Apis mellifera carnica*. V: AUGUŠTIN, Vladimir (ur.), KANDOLF, Andreja (ur.), SENIČ, Lidija (ur.), KOZMUS, Peter (ur.). *Api Slovenija : [zbornik]*. Brdo pri Lukovici: Čebelarska zveza Slovenije, 2012, str. 15. [COBISS.SI-ID [3806568](#)]
11. KOZMUS, Peter, VERBIČ, Jože, SIMONČIČ, Andrej, GREGORČIČ, Ana, ČERGAN, Zoran, GREGORC, Aleš. Monitoring the level of pesticide residues in the pollen of different agricultural production areas and its influence on development of carniolan honeybee (*Apis mellifera carnica*). V: *Apimondia 2011 : posters*. Buenos Aires: Apimondia, 2011, [1] str. [COBISS.SI-ID [3687784](#)]
12. KOZMUS, Peter, VERBIČ, Jože, SIMONČIČ, Andrej, GREGORČIČ, Ana, ČERGAN, Zoran, GREGORC, Aleš. Spremljanje vpliva kmetijsko-pridelovalnih območij na pojavljanje ostankov fitofarmaceutskih sredstev v cvetnem prahu in njihov vpliv na razvoj družin kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*) = The influence of different agricultural production areas on the level of pesticide residues in the pollen and its influence on development of Carniolan honeybee (*Apis mellifera carnica*). V: MAČEK, Jože (ur.), TRDAN, Stanislav (ur.). *Izvillečki referatov*. Ljubljana: Društvo za varstvo rastlin Slovenije: = Plant Protection Society of Slovenia, 2011, str. 79-80. [COBISS.SI-ID [3524456](#)]
13. KOZMUS, Peter, VIRANT-DOBERLET, Meta, MEGLIČ, Vladimir, DOVČ, Peter. Identification of *Bombus* species based on wing venation structure. *Apidologie*, 2011, vol. 42, str. 472-480, doi: [10.1007/s13592-011-0037-5](https://doi.org/10.1007/s13592-011-0037-5). [COBISS.SI-ID [3630696](#)]
14. KOZMUS, Peter, VIRANT-DOBERLET, Meta, MEGLIČ, Vladimir, DOVČ, Peter. Identification of *Bombus* species based on wing venation structure. *Apidologie*, 2011, vol. 42, str. 472-480, doi: [10.1007/s13592-011-0037-5](https://doi.org/10.1007/s13592-011-0037-5). [COBISS.SI-ID [3630696](#)]
15. KOZMUS, Peter. Breeding and selection activities of *Apis mellifera carnica* in Slovenia = Vzreja in odbira kranjske čebele (*A. mellifera carnica*) v Sloveniji. V: AUGUŠTIN, Vladimir (ur.), KANDOLF, Andreja (ur.), SENIČ, Lidija (ur.), KOZMUS,

- Peter (ur.). *Api Slovenija : [zbornik]*. Brdo pri Lukovici: Čebelarstva zveza Slovenije, 2012, str. 12, 45. [COBISS.SI-ID [3805800](#)]
16. KOZMUS, Peter. Breeding and selection activities of *Apis mellifera carnica* in Slovenia = Vzreja in odbira kranjske čebele (*A. mellifera carnica*) v Sloveniji. V: AUGUŠTIN, Vladimir (ur.), KANDOLF, Andreja (ur.), SENIČ, Lidija (ur.), KOZMUS, Peter (ur.). *ApiSlovenija : [zbornik]*. Brdo pri Lukovici: Čebelarstva zveza Slovenije, 2012, str. 12, 45. [COBISS.SI-ID [3805800](#)]
17. KOZMUS, Peter. Čebelarjem bo razdeljenih 2000 brezplačnih matic. *Slov. čebel.*, maj 2011, letn. 113, št. 6, str. 202. [COBISS.SI-ID [3608936](#)]
18. KOZMUS, Peter. Dejavnosti KIS v letu 2011 - iz Rejskega programa za kranjsko čebelo 2011-2015. *Slov. čebel.*, maj 2012, letn. 114, št. 5, str. 161-163, grafi. [COBISS.SI-ID [3843432](#)]
19. KOZMUS, Peter. Izvajanje osnovne odbire. V: AUGUŠTIN, Vladimir (ur.), PREINFALK, Borut. *ApiSlovenija : [zbornik]*. Lukovica: Čebelarstva zveza Slovenije, Javna svetovalna služba v čebelarstvu, 2013, str. 39-43. [COBISS.SI-ID [4122472](#)]
20. KOZMUS, Peter. Menjava čebeljih matic v letu 2011. *Slov. čebel.*, okt. 2011, letn. 113, št. 10, str. 311. [COBISS.SI-ID [3682920](#)]
21. KOZMUS, Peter. Menjava čebeljih matic v letu 2011. *Slov. čebel.*, okt. 2011, letn. 113, št. 10, str. 311. [COBISS.SI-ID [3682920](#)]
22. KOZMUS, Peter. Menjava čebeljih matic v letu 2012. *Slov. čebel.*, nov. 2012, letn. 114, št. 11, str. 346-347. [COBISS.SI-ID [3945576](#)]
23. Kozmus, Peter. Menjava čebeljih matic v letu 2013 in ohranjanje kranjice. *Slov. čebel.*, maj 2013, letn. 115, št. 5, str. 162. [COBISS.SI-ID [4178024](#)]
24. KOZMUS, Peter. *Nacionalni program zaščite kranjske čebele v Sloveniji*. 28. feb. 2012; Ljubljana: Radio ognjišče, Slovenska dežela. [COBISS.SI-ID [3791720](#)]
25. KOZMUS, Peter. Osnovna odbira kranjske čebele v okviru Rejskega programa 2011-2015. *Kmeč. glas*, 6. apr. 2011, letn. 68, št. 14, str. 10, fotogr. [COBISS.SI-ID [3563368](#)]
26. KOZMUS, Peter. Osnovna odbira v Rejskem programu za kranjsko čebelo 2011-2015. *Slov. čebel.*, mar. 2011, letn. 113, št. 3, str. 80-81. [COBISS.SI-ID [3518056](#)]
27. KOZMUS, Peter. Pomen redovniške vzreje matic v Sloveniji. V: AUGUŠTIN, Vladimir (ur.), PREINFALK, Borut. *ApiSlovenija : [zbornik]*. Lukovica: Čebelarstva zveza Slovenije, Javna svetovalna služba v čebelarstvu, 2013, str. 45-47. [COBISS.SI-ID [4122728](#)]
28. KOZMUS, Peter. Predhodna analiza uspešnosti prezimitve čebeljih družin v letu 2012. *Slov. čebel.*, maj 2012, letn. 114, št. 5, str. 160-161. [COBISS.SI-ID [3843176](#)]

29. KOZMUS, Peter. Pridelovalci lahko grožnjo zmanjšajo na minimum : varovanje čebel in FFS. *Sad (Krško)*, 2012, letn. 23, št. 5, str. 10-11, ilustr. [COBISS.SI-ID [3844200](#)]
30. KOZMUS, Peter. Problematika čebelarstva v Evropski uniji. *Slov. čebel.*, sep. 2013, letn. 115, št. 9, str. 274-275. [COBISS.SI-ID [4300904](#)]
31. KOZMUS, Peter. Program zaščite kranjske čebele v Sloveniji. *Slov. čebel.*, jul.-avg. 2011, letn. 113, št. 7/8, str. 257. [COBISS.SI-ID [3646312](#)]
32. KOZMUS, Peter. Simpozij o kranjski čebeli v okviru ApiSlovenije. *Slov. čebel.*, maj 2012, letn. 114, št. 5, str. 176-177. [COBISS.SI-ID [3855208](#)]
33. KOZMUS, Peter. Ugotavljanje odstotka čebel z rumenimi obročki na zadku na območju Slovenije. *Slov. čebel.*, apr. 2011, letn. 113, št. 4, str. 122-123, ilustr. [COBISS.SI-ID [3559016](#)]
34. KOZMUS, Peter. Ugotavljanje stopnje hibridizacije populacije kranjske čebele (*Apis mellifera carnica* Pollman) v Sloveniji na podlagi obarvanosti obročkov na zadku = Population of Carniolan bees (*Apis mellifera carnica* Pollman) in Slovenia and its hybridization with other subspecies nased on colour of abdomen. *Acta agric. Slov.*. [Tiskana izd.], 2011, letn. 98, št. 2, str. 159-166. <http://aas.bf.uni-lj.si/zootehnika/98-2011/PDF/98-2011-2-159-166.pdf>. [COBISS.SI-ID [3735656](#)]
35. KOZMUS, Peter. Ugotavljanje stopnje hibridizacije populacije kranjske čebele (*Apis mellifera carnica* Pollman) v Sloveniji na podlagi obarvanosti obročkov na zadku. *Acta agric. Slov.*. [Tiskana izd.], 2011, letn. 98, št. 2, str. 159-166, ilustr. <http://aas.bf.uni-lj.si/zootehnika/98-2011/PDF/98-2011-2-159-166.pdf>. [COBISS.SI-ID [3735656](#)]
36. TONE, Sabina. Pregled funkcionalne anotacije genoma čebele : diplomski projekt. Ljubljana: [S. Tone], 2012. III, 15 f., ilustr. [COBISS.SI-ID [3106952](#)]
37. ZORC, Minja, JEVŠINEK SKOK, Daša, GODNIČ, Irena, CALIN, George Adrian, HORVAT, Simon, JIANG, Zhihua, DOVČ, Peter, KUNEJ, Tanja. Catalog of MicroRNA seed polymorphisms in vertebrates. *PloS one*, 2012, vol. 7, no. 1, str. 1-8, e30737.