

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2017/16



## ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	V4-1418
<b>Naslov projekta</b>	Določitev molekularnih parametrov za ohranjanje kranjske čebele Definition of molecular parameters for protection of Carniolan honeybee
<b>Vodja projekta</b>	5098 Peter Dovč
<b>Naziv težišča v okviru CRP</b>	2.02.03 Določitev molekularnega parametra kranjske čebele
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	787
<b>Cenovni razred</b>	F
<b>Trajanje projekta</b>	07.2014 - 12.2016
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	510 Univerza v Ljubljani 481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	106 Institut "Jožef Stefan" 401 Kmetijski inštitut Slovenije 3019 Grm Novo mesto - center biotehnike in turizma
<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 4.02 Znanosti o živalih in mlekarstvu

#### 2. Sofinancerji

	Sofinancerji	
1.	Naziv	Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS
	Naslov	Dunajska 22, 1000 Ljubljana

## B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

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

SLO

Populacijsko genetske raziskave vzorcev kranjske čebele iz Slovenije in sosednjih držav so pokazale, da je pestrost mitohondrijske DNA v populaciji kranjske čebele bistveno večja, kot so to kazale preliminarne raziskave. Sekvenčna analiza je pokazala sorazmerno širok nabor mitohondrijskih tipov, ki se pojavljajo v večini populacij. V nasprotju s pričakovanji smo pokazali, da ni za posamezno populacijo specifičnih mtDNA haplotipov. Analiza 24 mikrosatelitnih lokusov na 569 vzorcih kranjske čebele iz različnih območij Slovenije, Hrvaške, Avstrijske Koroške in obmejnega pasu z Italijo je pokazala, da sicer obstajajo populacijske razlike, vendar večina vzorcev tvori kompaktno skupino, ki se ne diferencira. Tako tvorijo vsi slovenski in vzorci z Avstrijske Koroške enotno gručo brez zaznavne diferenciacije po regijah. Vzorci iz Hrvaške se jasno ločijo od vzorcev iz Slovenije, vendar ne tvorijo zelo prepričljivo ločenih dveh gruč, kot bi glede na njihov izvor v celinskem in obalnem delu Hrvaške pričakovali. Vzorci iz Italije tvorijo razpršeno gručo, ki je jasno ločena od osrednje gruče slovenskih vzorcev, kar kaže na možnost, da gre za križance z *A.m.ligustica*.

Primerjalne analize matičnega mlečka različnih družin (matičnjakov) kranjske čebele iz dveh različnih slovenskih regij (Gorenjska in Dolenjska) izkazujejo razlike v njihovi proteinski sestavi, tako na ravni regij, kot na ravni različnih družin iz iste regije. Bolj kot razlike v sami sestavi so izrazite razlike v zastopanosti določenih proteinov.

Bioinformacijska analiza je pokazala, da so številni geni, ki so pomembni za obnašanje čebel so močno ohranjeni pri različnih socialnih žuželkah, razlike pa so v regulaciji teh genov. Ker so podvrste čebele podvržene različnim selekcijskim pritiskom, so možna spremenjena vezavna mesta za transkripcijske faktorje, ki so nastala z cis-regulatorno evolucijo, pogojena pa so bila s selekcijo za določene adaptivne lastnosti.

Z analizo morfoloških značilnosti smo obdelali dolžino tibije, dolžino rilčka in kubitalni indeks. Rezultati kažejo, da je dolžina rilčka korelirana z vrsto paše, ki jo čebele najpogosteje izkoriščajo.

Spremljali smo tudi gibanje kubitalnega indeksa in ugotovili, da je tipična vrednost tega fenotipskega parametra za kranjsko čebelo po letih sicer različna, vendar se vrednosti v zadnjih letih gibljejo med 2.6 in 2.7.

ANG

Population genetic studies in Carniolan bee from Slovenia and neighbor countries have shown significantly higher mitochondrial DNA diversity in the population of the Carniolan bee in Slovenia compared to results from preliminary research. Sequence analysis revealed a relatively wide range of mitochondrial types occurring in most populations. Contrary to expectations, we have shown that there is no specific mtDNA haplotype for a particular population. An analysis of 24 microsatellite loci in 569 samples of the Carniolan bee from different

areas of Slovenia, Croatia, Carinthia and the area along the border with Italy showed some differences between populations, but the majority of samples formed a compact cluster that can not be further differentiated. All Slovenian samples and samples from Carinthia formed a single cluster with no detectable variation among regions. Samples from Croatia are clearly distinguishable from those from Slovenia, but they do not form two separate clusters, which could be expected according to the continental and littoral origin of Croatian populations. Samples from Italy formed a dispersed cluster, clearly separated from the central Slovenian cluster indicating the possibility that this samples represent crosses with *A.m.ligustica*.

Comparative analysis of royal jelly of different families of Carniolan bees from two different Slovenian regions (Gorenjska and Dolenjska) exhibit differences in their protein composition, both at regional level and at the level of different families from the same region. Rather than differences in the composition itself are significant differences in the representation of certain proteins.

Bioinformatics analysis showed that many genes that are important for the behavior of bees are highly conserved among different social insects but there are differences in the regulation of these genes. Since subspecies of bees were subjected to different selection pressures, it is possible the binding sites for transcription factors, which are formed by cis-regulatory evolution were modified and so represent molecular basis for certain adaptive traits.

We analyzed three morphological traits, length of Tibia, the length of the proboscis and cubital index. The results indicate that the length of the proboscis is correlated with the type of grazing that is used by bees. We also monitored changes in cubital index and found that the typical value of this parameter for Carniolan bee in recent years ranged between 2.6 and 2.7.

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

##### **Molekularno genetske analize**

Populacijsko genetske raziskave vzorcev kranjske čebele iz Slovenije in sosednjih držav so pokazale, da je pestrost mitohondrijske DNA v populaciji kranjske čebele bistveno večja, kot so to kazale preliminarne raziskave. Sekvenčna analiza je pokazala sorazmerno širok nabor mitohondrijskih tipov, ki se pojavljajo v večini populacij. V nasprotju s pričakovanji smo pokazali, da ni za posamezno populacijo specifičnih mtDNA haplotipov. Analiza 24 mikrosatelitnih vzorcev na 569 vzorcih kranjske čebele iz različnih območij Slovenije, Hrvaške, Avstrijske Koroške in obmejnega pasu z Italijo je pokazala, da sicer obstajajo populacijske razlike, vendar večina vzorcev tvori kompaktno skupino, ki se ne diferencira. Tako tvorijo vsi slovenski in vzorci z Avstrijske Koroške enotno gručo brez zaznavne diferenciacije po regijah. Vzorci iz Hrvaške se jasno ločijo od vzorcev iz Slovenije, vendar ne tvorijo zelo prepričljivo ločenih dveh gruč, kot bi glede na njihov izvor v celiskem in obalnem delu Hrvaške pričakovali. Vzorci iz Italije tvorijo razpršeno gručo, ki je jasno ločena od osrednje gruče slovenskih vzorcev, kar kaže na možnost, da gre za križance z *A.m.ligustica*.

Analizirane populacije iz Avstrije, Hrvaške, Italije, Makedonije in Slovenije predstavljajo vzorec 569 čebel, od tega 371 iz Slovenije (pokrajine Gorenjska, Ljubljana, Štajerska, Primorska, Bovec, Dolenjska, Koroška, Prekmurje). Analiza z orodjem Genetix jasno loči vzorce iz Avstrije, Italije, Hrvaške in Slovenije. Slovenski vzorci zelo homogeni, brez vidne resolucije ločevanja med vzorci. Opazno je odstopanje od HWE pri hrvaških vzorcih, ki so tudi najbolj heterogeni. S statističnim programom Structure smo skušali oceniti populacijsko čistost posameznih

populacij. Najbolj verjetno število genetskih skupin je 3, ločeni sta populaciji iz Avstrije in Italije, ostale so si zelo podobne. Po verjetnosti sledi število skupin  $K=7$  in nato  $K=5$ . Pri teh dveh vrednostih je lažje biološko razložiti razdelitev v podpopulacije. Vidno je, da sta na Hrvaškem dve skupini, vendar je veliko tudi vzorcev s pripadnostjo obema skupinama, zato tudi ni opazne jasne ločenosti v Genetix grafu. Določena strukturanost opazna tudi pri slovenskih vzorcih, predvsem odstopa del vzorcev iz Gorenjske.

### Proteomska analiza

V skladu z načrtom dela smo metodologijo proteomske raziskave optimizirali za analize čebeljih vzorcev. Pogoje za izvedbo dvodimenzionalne poliakrilamidne gelske elektroforeze (2DE) smo optimizirali za analize čebeljih vzorcev: strupa, matičnega mlečka in hemolimfe. Ker strupa kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*) še nismo imeli smo si pomagali s trupom sorodne kavkaške čebele po poreklu iz Gruzije (*Apis mellifera caucasica*), ki smo ga dobili od kolegice iz podjetja Medex, d.o.o. Matični mleček in hemolimfa, ki smo ju analizirali sta bila od kranjske čebele.

**Sklep 1:** Pogoji ločbe, ki smo jih določili s testnimi čebeljimi vzorci, predstavljajo osnovo za primerjalno analizo strupa, matičnega mlečka in hemolimfe kranjske čebele iz različnih področij v Sloveniji.

V drugem delu projekta smo prejeli prve vzorce družin kranjske čebele. Prejeli smo vzorce (iz po treh matičnjakov oziroma družin) matičnega mlečka iz dveh krajev na Gorenjskem (vzorci B in K) in dveh krajev na Dolenjskem (vzorci R in S).

Z uporabo 2DE in RP-HPLC analiz smo izvedli primerjalne analize proteinske sestave vzorcev B1-B3 in K1-K3 matičnega mlečka iz Gorenjske regije in pa vzorcev R1-R3 in S1-S3 matičnega mlečka iz Dolenjske regije.

### Prikaz števila identificiranih proteinskih lis

Vzorec matičnega mlečka	Število proteinskih lis
B1	249
B2	230
B3	250
K1	252
K2	231
K3	271
R1	269
R2	269
R3	243

### Visokotlačna kromatografija na obrnjenih fazah (RP-HPLC)

Vzorci S iz Dolenjske regije smo analizirali in primerjali s RP-HPLC analizo na koloni PLRP-S.

Iz slike je razvidno, da imata vzorca S1 in S3 enak kromatografski profil, medtem ko se S2 od njiju razlikuje v medsebojnem razmerju površine/višine vrhov, ki se s kolone spereta pri času 26,4 in 27,1 min.

**Sklep 2:** Primerjalne analize matičnega mlečka različnih družin (matičnjakov) kranjske čebele iz dveh različnih slovenskih regij (Gorenjska in Dolenjska) jasno izkazujejo razlike v njihovi proteinski sestavi, tako na nivoju regij, kot na nivoju različnih družin iz iste regije. Bolj kot razlike v sami sestavi so izrazite razlike v zastopanosti določenih proteinov.

### Morfološka analiza

Poklutar (1992) je proučeval dolžino tibije delavk kot možen parameter raznolikosti: Milne et al. (1984) so predlagali, da bi velikost golenice poveča vnos cvetnega prahu (posredno izboljšanje medu žetvijo) zaradi večje površine corbicularnega območja. Slika 4A prikazuje porazdelitev dolžine golenice v 31 čebelnjakovih po vsej Sloveniji. Mediana dolžina golenice je 3,23 mm ( $n = 6470$ ). Dolžina rilčka pri *A. m. carnica* je 6,54 mm ( $n = 1387$ ) je daljša v primerjavi z nekaterimi drugimi podvrstami *A. m. mellifera* ( $\approx 6$  mm) in *A. m. ligustica* (6,3-6,6 mm), vendar je krajši v primerjavi z *A. m. caucasica* ( $\approx 7$  mm). Najbolj pogosto proučevana morfološka lastnost je kubitalni indeks (CI), razmerje med dolžino odsekov spodnje vene tretje kubitalne celice na krilih (označen kot Rk1 in RK 2 na sliki 3C zgoraj). CI pri rejcih v Sloveniji mora biti med 2,4 in 3,0. Slika 4C prikazuje porazdelitev CI 25 naključno izbranih čebelnjakov po vsej Sloveniji. CI skupaj z molekularnimi markerji predstavlja dober parameter za opredelitev populacij *A. m. carnica*.

### Bioinformacijska analiza

Pri kranjski čebeli zelo verjetno obstajajo razlike v izražanju določenih genov, ki so povezani z različnimi morfološkimi, vedenjskimi in proizvodnimi lastnostmi. Številni geni, ki so pomembni za obnašanje čebel so močno ohranjeni pri različnih socialnih žuželkah, vendar pa so nastale

razlike v regulaciji teh genov. Ker so podvrste čebele podvržene različnim selekcijskim pritiskom, so možna spremenjena vezavna mesta za transkripcijske faktorje, ki so nastala z cis-regulatorno evolucijo, pogojena pa so bila s selekcijo za določene adaptivne lastnosti.

#### **a) Analiza cis-regulatornih razlik v promotorskih regijah kandidatnih genov**

Cis-regulatorne razlike v promotorskih regijah kandidatnih genov smo v letu 2015 raziskali v genomih kranjske čebele. Celotno genomsko zaporedje je na voljo za italijansko čebelo (*Apis mellifera ligustica strain DH4*). Javno dostopni pa so trije delni genomi delavk kranjske čebele (na NCBI SRA Db: SRX339514 - SRX339516), ki pokrivajo od 30-40% referenčnega čebeljega genoma (Harpur et al. 2014), nukleotidna zaporedja pa so zelo kratka (dolga so le 50 bp). Zanimalo nas je, ali lahko na cis-regulatornem nivoju opazimo kakšne razlike med tema dvema najbližjima podvrstama čebele, ki spadata v haplotipsko skupino C. V genomih kranjske čebele smo iskali razlike v promotorskih regijah kandidatnih genov oz. genov, ki so dokazano odgovorni za vedenjske, proizvodne in morfološke značilnosti. Kandidatni geni, ki smo jih analizirali v delnih genomih kranjske čebele so bili vitelogenin, erk7, Mrjp4, dopaminski receptor (dop3), tiraminski receptor (TyrR), oktopaminski receptor (Oa1), cirkadiani protein period (Per), NMDA receptor 1 (Nmdar1), melitin, trehalaza in številni drugi geni. Za vsak kandidatni gen smo analizirali po 2000 do 2500 bp promotorskih regij. Ugotovili smo, da v preiskovanih genih na cis-regulatornem nivoju ne obstajajo razlike med kranjsko in italijansko podvrsto (oz. raso) čebel. Presenetilo nas je dejstvo, da na genomskem nivoju ni razlik niti v regulatornih niti v genskih regijah pri kandidatnih genih. Glede na to, da sta si kranjska in italijanska podvrsta čebele tako zelo podobni na genomskem nivoju, kaže na omejeno uporabo genomskih podatkov za primerjavo obeh podvrst. Glavni vzrok za tako podobnost genomov kranjske in italijanske čebele je dejstvo, da sta se ti dve podvrsti (rasi) ločili pred ~ 25.000 leti.

#### **b) Analiza kandidatnih genov v transkriptomih kranjske in italijanske čebele**

Za kranjsko in italijansko čebeljo so javno dostopni tudi številni transkriptomski podatki (na NCBI SRA, GEO ipd.). Ti podatki se ločijo po izvoru (kar nekaj je *carnice* iz Kitajske in Nemčije ter *ligustice* iz različnih držav), tkivu (npr. možgani), spolu in funkciji (matica, delavka in troti). Tako kot za genomske podatke velja, da so v NCBI SRA Db nukleotidna zaporedja zelo kratka (dolga so le 50 - 100 bp). Kandidatne gene (iste kot pri genomski analizi) smo uporabili za iskanje razlik med kranjsko in italijansko čebelo na nukleotidnem nivoju. Podobno kot na genomskem nivoju nam tudi analiza transkriptomskih podatkov ni pokazala nobenih razlik med transkripti kandidatnih genov.

#### **c) Epigenomski podatki za čebele**

Pri čebelah je le omejeno število genov odgovorno za določene lastnosti, zelo pogosto pa so številni geni epigenetsko modificirani (ponavadi so metilirani) oz. so vključeni v različna genska regulatorna omrežja ali v proteinsko-proteinske interakcije (PPI). Žal pa nam javno dostopni podatki za kranjsko čebelo ne omogočajo vpogleda v epigenetske modifikacije kandidatnih genov, ki naj bi bili odgovorni za vedenjske in fiziološke posebnosti čebele. Ravno tako niso dostopni epigenomski podatki za obe podvrsti (*carnica* in *ligustica*), ki bi nam lahko omogočili primerjavo razlik v epigenetskih modifikacijah kandidatnih genov.

#### **Etološki poskusi**

Pripravili smo poskus z opazovalnimi panji, da bi primerjali plese kranjske in italijanske čebele. Poskus je potekal na mejnem območju z italijansko čebelo. Uporabili smo 16 družin na dveh satih, po 4 domnevno izvora čisto kranjske čebel (matice iz osrednje Slovenije), 4 domnevno čiste italijanske (formirane iz družin v Italiji, ki so imeli italijanske matice), 4 naravno mešane (družine iz obmejnega območja s prisotnim večjim deležem čebel z rumeni obročki (vsaj 25%) in 4 umetno mešanih čebeljih družin iz čistih italijanskih in kranjskih družin. Sprav smo upali, da bomo umetno izvali drugo rojenje z matičniki, a je imela sezona prevelik vpliv. Tako smo v panjih opazovali čebelje plese pašnih čebel in jih tudi posneli. Želeli smo sicer vse družine rekrutirati na umetno krmišče, a smo bili zaradi prisotnosti medenja in visoke vročine neuspešni. Vseeno smo posneli več 100 plesov, ki jih bomo uporabili za preverjanje morebitne segregacije čebel.

V našem poskusu smo skušali določiti regresijski koeficient za parameter plesa in oddaljenost od vira hrane. Ugotovili smo, da kranjska čebela naredi več polnih obratov kot italijanska, kar velja za srednje razdalje od vira hrane. Opažene razlike med italijanskimi in kranjskimi čebelami lahko odražajo modifikacijo nevrottransmitterjev v centralnem živčnem sistemu in tako vplivajo na plesno sporočanje.

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

V projektu smo dosegli zastavljene raziskovalne cilje, ki so bili osredotočeni na genotipizacijo in analizo populacijskih podatkov za kranjsko čebelo v Sloveniji in sosednjih državah ter vzpostavitev baze vzorcev za boljše analize kandidatnih genov in SNP markerjev. V

tem sklopu še iščemo ustrezno varianto za genotipizacijo z večjim številom markerjev, ki pa trenutno še ni dosegljiva. Vzpostavljena in preizkušena je proteomska metodologija za analizo matičnega mlečka, hemolimfe in čebeljega strupa, kar nam omogoča tekoče analize v zadnjem letu izvajanja projekta. Imamo že nekaj preliminarnih rezultatov, ki kažejo na razlike med čebelami iz različnih okolij. Zasnovali smo tudi vedenjske poskuse (rezultate še obdelujemo), pri katerih bomo v naslednjem letu skušali odpraviti nekaj slabosti, ki so se pojavile v letošnjem poskusu. Z vzpostavitvijo družin z znanim izvorom smo pripravili odličen material za proteomske, morfološke in genetske analize, s katerim bomo lahko preverili resolucijsko sposobnost naših metod in ugotovili kakšen delež v celotni variabilnosti teh lastnosti lahko pripišemo genetskim dejavnikom. Vedenjske raziskave bodo osvetlile socialni aspekt pretoka genetskega materiala med populacijami in nam dale vpogled v specifično komuniciranje v posameznih populacijah. Bioinformacijske analize nam nakazujejo najbolj smiselno pot za nadaljevanje raziskav, hkrati pa nam omogočajo izkoriščanje javno dostopnih podatkov za namen naše študije.

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

Raziskovalni projekt je bil izveden v obsegu, kot je bilo predvideno v prijavi. Pokritost teritorija RS in sosednjih držav z vzorci čebel je v skladu s projektnim predlogom. Genetske analize so bile izvedene na mitohondrijski DNA s sekvenciranjem D-loop regije in na genomske DNA z genotipizacijo 22 mikrosatelitnih lokusov. V projektnem predlogu je bila sicer predvidena tudi genotipizacija manjšega števila vzorcev z mikročipom, kar pa zaradi tržne nedosegljivosti mikročipa za genotipizacijo čebel v formatu, ki bi ga projekt finančno še prenesel, ni bilo mogoče. V času izvajanja projekta je bil prej sicer dostopen 50k čip za manjše število vzorcev (12 ali 24) umaknjen iz prodaje in je bil dostopen samo format za 384 vzorcev, kar je bistveno presehalo finančni obseg tega projekta. Izpad tega dela genotipizacije smo nadomestili z bioinformacijsko analizo javno dostopnih genomskih zaporedij za kranjsko in druge rase čebel in na ta način ocenili stopnjo polimorfnosti kodogenih regij. Na področju proteomskih raziskav smo se optimirali postopek za analizo hemolimfe, matičnega mlečka in strupa čebel, pri čemer smo se predvsem osredotočili na analizo matičnega mlečka in v manjši meri na analizo strupa, ker je bilo pridobivanje večjih količin strupa kranjske čebele tehnično zelo zahtevno. V primerjavi s projektnim predlogom smo razširili bioinformacijski in etološki del projekta, slednjega tudi z eksperimentom, ki je bil dopolnjen še z genotipizacijo vzorcev. Tekom projekta se je sestava projektne skupine spremenila zaradi kadrovske spremembe na sodelujoči organizaciji Kmetijski inštitut Slovenije, kjer je dr. Prešern zamenjal dr. Aleša Gregorca v projektne skupini. Obseg skupine je tako ostal enak skozi celotno obdobje izvajanja projekta.

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

Znanstveni dosežek			
1.	COBISS ID	29771815	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Novi aspekti krakterizacije kranjske čebele ( <i>Apis mellifera carnica</i> , Pollmann 1879)
		ANG	Novel aspects in characterisation of Carniolan honey bee ( <i>Apis mellifera carnica</i> , Pollmann 1879)
			Članek povzema najnovejše raziskave populacije kranjske čebele z genetskimi, proteomskimi, bioinformacijskimi, morfometričnimi in etološkimi metodami. Populacijo kranjske čebele v Republiki Sloveniji umešča v kontekst sosednjih populacij <i>A.m.carnica</i> in jo primerja s



Opis	SLO	populacijami na Koroškem, v severni Italiji in na Hrvaškem. Genetski rezultati kažejo na sorazmerno veliko pestrost populacije, ki je ni mogoče strukturirati v ekotipe, s pa jasno loči od populacije A.m.carnica na Hrvaškem. Vedenjski parametri omogočajo ločevanje kranjske čebele od A.m.ligustica.
	ANG	The article summarizes the latest research on Carniolan bee population using genetic, proteomic, bioinformatics, morphometric and ethological approach. Carniolan bee population in the Republic of Slovenia is placed into the context of neighboring populations A.m.carnica in Carinthia, Northern Italy and Croatia. The genetic results indicate a relatively high diversity of the population, which can not be further structured in ecotypes, but is clearly separated from the population A.m.carnica in Croatia. Behavioral parameters allow the separation of the Carniolan bee from A.m.ligustica.
Objavljeno v	Biotechnical Faculty; Technology driven animal production; Acta agriculturae slovenica, Supplement, = Supplement; 2016; Suppl. 5; str. 18-25; Avtorji / Authors: Božič Janko, Kordiš Dušan, Križaj Igor, Leonardi Adrijana, Močnik Robert, Nakrst Mitja, Podgoršek Peter, Prešern Janez, Sušnik Bajec Simona, Zorc Minja, Zurc Jelena, Dovč Peter	
Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

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

Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	Vir: vpis v obrazec
Naslov	SLO	Aktualno stanje v populaciji kranjske čebele v Sloveniji
	ANG	Present situation in Slovenian Carnica population
Opis	SLO	V okviru vabljenega uvodnega predavanja na letnem srečanju nemške čebelarke zveze 13.03. 2016 v Triefnriedu je vodja projekta predstavil raziskovalne dosežke na področju populacijske genetike in rejskega dela. V predavanju z naslovom "Aktuelle Lage der Carnica-Population in Slowenien: Populationstruktur und züchterische Arbeit" so bili vključeni tudi rezultati proteomske, bioinformacijske in etološke analize.
	ANG	In the frame of invited keynote lecture at the Annual meeting of the German beekeepers association on March 13 2017 in Triefnried, the project leader presented research achievements in the field of population genetics and breeding of Carnica. In a lecture entitled "Aktuelle Lage der Carnica-Population and Slowenien: Populationstruktur und züchterische Arbeit" were also included in the results of proteomic, bioinformatic, and ethological analysis.
Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
Objavljeno v	Brez objave	
Tipologija	3.15 Prispevek na konferenci brez natisa	

### 9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>2</sup>

V skupini so se usposabljali diplomanti, magistranti in doktoranti. V okviru projekta so lahko poglobljali svoje znanje in aplicirali teoretično znanje pri reševanju praktičnih projektnih nalog. V okviru projekta je bilo izdelanih 7 diplomskih nalog, dve magistrski deli, en bolonjski magisterij pa je še v pripravi. V okviru projekta se je usposabljal tudi doktorska študentka Jelena Zurc, ki svojega usposabljanja še ni zaključila. Člani projektne skupine so predstavljali

delne rezultate projekta v številnih javnih nastopih in v okviru prireditev za čebelarje. Delni rezultati projekta s bili predstavljeni tudi sofinancerju, ki je spremljal potek projekta.

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

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

SLO

Prispevek projekta k razvoju znanosti je predvsem v kompleksnosti pristopa in povezovanju različnih znanstvenih disciplin za čim bolj kompleksno karakterizacijo populacij medonosne čebele. Ta pristop omogoča do sedaj najbolj popolno karakterizacijo populacije kranjske čebele in njeno primerjavo s sosednjimi populacijami. Posebnega pomena je vključitev bioinformacijskega pristopa, ki bo tudi v bodoče nepogrešljiv del vseh nadaljnjih populacijskih analiz. Sodelovanje raziskovalne skupine z dolgoletnimi izkušnjami na področju proteomskih analiz, še posebno na področju analiz strupov je omogočila nov vpogled v sestavo čebeljega strupa, ki bo v bodoče, ob izboljšani tehnologiji pridobivanja strupa čebel, pomembno orodje za opredelitev populacijske strukture. Ravno povezava proteomskih, genetskih in vedenjskih pristopov pri analizi populacije je bistvena novost naše raziskave in bo v bodoče predstavljala metodološki standard za nadaljnje raziskave. Kljub nakazani možnosti obstoja ekotipov, je naša raziskava pokazala, da je v majhni, geografsko omejeni populaciji, kjer ni omejitev za migracije znotraj populacije in kjer na distribucijo plemenskega materiala močno vpliva relativno majhno število vzrejevalcev matic, ni mogoče pričkovati obstoja regionalno specifične genetske strukture populacije.

ANG

Project's contribution to the development of science is mainly in the complexity of the approach and in integration of various scientific approaches for the complex characterization of the honeybee populations. This approach allowed until now the most complete characterisation of Carniolan bee population and its comparison with the neighboring populations. Of special importance is the inclusion of bioinformatics approach, which will continue to be an indispensable part of any subsequent population analysis. Cooperation with research group with long lasting experience in the field of proteomic analysis, especially in the field of analysis of toxins has allowed new insights into the composition of bee venom, which will be in the future, with improved extraction technology of bee venom, a novel tool for defining the population structure. Linking proteomic, genetic and behavioral approaches in the analysis of the population is essential novelty of our research and will in the future become the standard methodology for further research. Despite concerns over the existence of ecotypes, our research has shown that in a small, geographically limited population without any restrictions for migrations within the population and where the distribution of breeding material strongly depends on relatively small number of queen breeders, the existence of regional specific genetic population structure can not be expected.

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

SLO

Projektni rezultati so izjemno pomembni za slovensko čebelarstvo in za ohranjanje populacije kranjske čebele. Rezultati projekta kažejo na kompleksnost genetske strukture populacije kranjske čebele in to populacijo umeščajo v kontekst sosednjih populacij v Avstriji, Italiji in na Hrvaškem. Poznavanje genetske pestrosti znotraj populacije je izjemno pomembno za načrtovanje varstvenih ukrepov in za spremljanje poledic rejskega dela. Naši rezultati nakazujejo, da predlagana metodologija omogoča tudi identifikacijo vnosa genetskega materiala iz sosednjih populacij v populacijo kranjske čebele. Kompleksnost našega pristopa bo v bodoče omogočila raziskave v smeri epigenetskih in okoljsko pogojenih razlik v proteomu in fenotipu čebel, ki bi eventualno vodile do specifikacije posameznih ekotipov znotraj populacije kranjske čebele. Nadaljnja razširitev nabora analitskih orodij (sekvenciranje DNA in uporaba SNP čipov, ko bodo dostopni) bosta lahko bistveno doprinesla k načrtovanju in spremljanju rejskega dela na področju izboljševanja proizvodnih sposobnosti in zdravja kranjske čebele. Za Slovenijo je čebelarstvo in obstoj avtohtone populacije čebel izjemnega pomena iz zgodovinskega, naravoslovnega pa tudi ekonomskega vidika. V svetu so bile matice kranjske čebele vedno iskane, povpraševanje pa je vse bolj odvisno tudi od tega koliko raziskovalnega



dela je vloženega v to populacijo in kako dobro je opisan ta cenjen in tradicionalno pogosto uporabljen genski vir.

ANG

Project results are extremely important for the Slovenian beekeeping and preservation of Carniolan bee population. Project results show the complexity of the genetic structure of the Carniolan bee population and define it in the context of neighboring populations in Austria, Italy and Croatia. The information about genetic diversity within population is extremely important for planning of protective measures and to monitor the consequences of breeding work. Our results indicate that the proposed methodology allows the identification of introduction of genetic material from neighboring populations in the population of Carniolan bee. The complexity of our approach will in the future enable research towards epigenetic and environmental-related differences in bee phenotype and proteome, which would eventually lead to the specification of individual ecotypes within population of Carniolan bee. A further extension of the range of analysis tools (DNA sequencing and use SNP chips when they become available) will substantially contribute to the planning and monitoring of the breeding work for improvement of production and health traits of Carniolan bee. For Slovenia, beekeeping and the existence of native bee population is of great importance from a historical, biological as well as economic perspective. In a world where for the queens of Carniolan bees always was a demand, this increasingly also depends on how much research is invested in this population and how well this prized and often used traditional genetic resource is described.

## 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>

Velik interes za naše rezultate kaže krovna organizacija Čebelarstva zveza Slovenije, kjer smo naše rezultate tudi že predstavljali. Tudi čebelarji, neposredni upravljalci populacije kranjske čebele so zelo zainteresirani za naše delo in pozdravljajo možnost za nadzor nad populacijo in cenijo možnost odkrivanja nekontroliranih igracij v populacijo kranjske čebele. Posebej veliko je zanimanje za genetsko podporo v boju proti varo.

### 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 tujimi raziskovalnimi inštitucijami:**<sup>12</sup>

Projektna skupina je sodelovala pri pripravi EU projekta SustainaBee (KBBE.2013.1.3-02: Sustainable apiculture and conservation of honey bee genetic diversity), katerega zasnovno je koordinirala dr. Sara Botti s PTP, Lodi, Italija. Naša skupina je sodelovala pri pripravi genomskega dela projekta, ki je vključeval genotipizacijo, zbiranje bološkega materiala in bioinformacijsko analizo. Projektne predlog je bil pozitivno ocenjen tudi v drugi fazi, vendar ni bil izbran v financiranje.

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

Rezultat tega sodelovanja so povezave s člani konzorcija, ki je nastal tekom priprave

projektne predloge in možnost, da se bomo v bodoče lahko vključili v podobne projektne predloge na naslednjih razpisih. Pomemben je tudi kontakt z raziskovalnimi iniciativami znotraj EU, ki nam omogoča spremljanje novih raziskovalnih pristopov in njihovo vključevanje v naše raziskave.

**12. Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni**

Cilj		
<b>F.01</b>	<b>Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih <input type="text"/>
<b>F.02</b>	<b>Pridobitev novih znanstvenih spoznanj</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih <input type="text"/>
<b>F.03</b>	<b>Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="text"/>
<b>F.04</b>	<b>Dvig tehnološke ravni</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="text"/>
<b>F.05</b>	<b>Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih <input type="text"/>
<b>F.06</b>	<b>Razvoj novega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen <input type="text"/>
<b>F.07</b>	<b>Izboljšanje obstoječega izdelka</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen <input type="text"/>
<b>F.08</b>	<b>Razvoj in izdelava prototipa</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen <input type="text"/>

<b>F.09</b>	<b>Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Delno <input type="text"/>
<b>F.10</b>	<b>Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Delno <input type="text"/>
<b>F.11</b>	<b>Razvoj nove storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih <input type="text"/>
<b>F.12</b>	<b>Izboljšanje obstoječe storitve</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="text"/>
<b>F.13</b>	<b>Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen <input type="text"/>
<b>F.14</b>	<b>Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Delno <input type="text"/>
<b>F.15</b>	<b>Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen <input type="text"/>
<b>F.16</b>	<b>Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen <input type="text"/>
<b>F.17</b>	<b>Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="text"/>
<b>F.18</b>	<b>Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)</b>	

	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="text"/>
<b>F.19</b>	<b>Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen <input type="text"/>
<b>F.20</b>	<b>Ustanovitev novega podjetja ("spin off")</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen <input type="text"/>
<b>F.21</b>	<b>Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih <input type="text"/>
<b>F.22</b>	<b>Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	V celoti <input type="text"/>
<b>F.23</b>	<b>Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Delno <input type="text"/>
<b>F.24</b>	<b>Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Delno <input type="text"/>
<b>F.25</b>	<b>Razvoj novih organizacijskih in upravljaljskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen <input type="text"/>
<b>F.26</b>	<b>Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljaljskih rešitev</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen <input type="text"/>
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen <input type="text"/>
<b>F.27</b>	<b>Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE

	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
<b>F.28</b>	<b>Priprava/organizacija razstave</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
<b>F.29</b>	<b>Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
<b>F.30</b>	<b>Strokovna ocena stanja</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen
	Uporaba rezultatov	V celoti
<b>F.31</b>	<b>Razvoj standardov</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
<b>F.32</b>	<b>Mednarodni patent</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
<b>F.33</b>	<b>Patent v Sloveniji</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen
<b>F.34</b>	<b>Svetovalna dejavnost</b>	
	Zastavljen cilj	<input checked="" type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE
	Rezultat	Dosežen bo v naslednjih 3 letih
	Uporaba rezultatov	Uporabljen bo v naslednjih 3 letih
<b>F.35</b>	<b>Drugo</b>	
	Zastavljen cilj	<input type="radio"/> DA <input checked="" type="radio"/> NE
	Rezultat	Ni dosežen
	Uporaba rezultatov	Ni uporabljen

**Komentar**

Projekt je bil usmerjen k povezovanju različnih raziskovalnih pristopov za karakterizacijo populacije kranjske čebele in je na področju integracije rezultatov, razvoja metod in njihove prilagoditve za specifične aplikacije v okviru projekta. Na tem področju je projekt dosegel

zastavljene cilje, številni metodološki nastavki pa bodo uporabljeni tudi na nadaljevanju raziskav in jih bomo lahko v celoti implementirali šele v naslednjih 2-3 letih. Na drugi strani pa projekt ni bil namenjen razvoju tržnih aplikacij ali celo vzpostavitvi podjetja, ki bi lahko tržilo pridobljeno znanje. Zato tovrstnih ciljev nismo zasledovali. Glavni namen projekta je bil povezati obstoječo infrastrukturo in raziskovalne kompetence različnih raziskovalnih organizacij in jih v projektne kontekstu uporabiti za podporo monitoringa in upravljanja populacije avtohtone populacije medonosne čebele v RS.

### 13. Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
<b>G.01</b>	<b>Razvoj visokošolskega izobraževanja</b>					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.01.03.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.02</b>	<b>Gospodarski razvoj</b>					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.07.	Večji delež izvoza	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
G.02.08.	Povečanje dobička	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.09.	Nova delovna mesta	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.02.12.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.03</b>	<b>Tehnološki razvoj</b>					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.03.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.04</b>	<b>Družbeni razvoj</b>					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.04.06.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	



<b>G.05.</b>	<b>Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
<b>G.06.</b>	<b>Varovanje okolja in trajnostni razvoj</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	
<b>G.07</b>	<b>Razvoj družbene infrastrukture</b>					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.03.	Energetska infrastruktura	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
G.07.04.	Drugo:	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.08.</b>	<b>Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva</b>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
<b>G.09.</b>	<b>Drugo:</b>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	

### Komentar

Potencialni vpliv rezultatov tega projekta se odraža predvsem na področju izobraževanja in gradnje kompetenc projektne skupine. Skozi pedagoški proces in mentoriranje študentov smo raziskovalne rezultate neposredno prenašali v učne programe in na ta način posodabljali tako metodološke kot konceptualne vsebine učnih programov. Drugo pomembno področje, na katerega imajo vpliv projektni rezultati je ohranjanje naravne dediščine in biotske pestrosti skozi karakterizacijo in upravljanje s populacijo medonosne čebele v Sloveniji. Ker gre za avtohtono raso čebel, ki je značilna za Slovenijo in je tudi temelj tradicionalnega čebelarstva pri nas, je odgovornost za to populacijo še toliko večja in jo je mogoče izpolniti samo s stalnim izboljševanjem metod monitoringa in upravljanja s populacijo.

## 14. Izjemni dosežek v letu 2016<sup>14</sup>

### 14.1. Izjemni znanstveni dosežek

Kot znanstveni dosežek izpostavljamo osvetlitev populacijske strukture in sorodnosti populacije kranjske čebele v RS s sosednjimi populacijami. Medtem, ko analiza mtDNA kaže dokaj pestro strukturo in prisotnost relativno velikega števila mitohondrijskih haplotipov, je alelna pestrost genomske DNA omejena in predstavlja relativno kompaktno genetsko skupino, ki ne kaže notranje strukturiranosti. Zanimiva je jasna ločitev slovenske populacije od hrvaške, pa tudi od populacije *A.m.ligustica*, značilne za mejna območja Italije. Ti rezultati kažejo na kompleksnost genetske strukture slovenske populacije *A.m.carnica* in do neke mere odražajo tudi recentne vnose genotipov iz okoliških populacij. Tako težko govorimo o zanesljivih molekularnih markerjih, ki bi slovensko populacijo kranjske čebele jasno ločevali od sosednjih populacij. Ta interpretacija je relativno nova in problematizira predstave o geografsko strogo omejeni populaciji kranjske čebele.

### 14.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

Kot družbeno ekonomski dosežek izpostavljamo sodelovanje članov projektne skupine pri pripravi strokovnih podlag za novi Zakon o živinoreji, kjer se člani projektne skupine zavzemamo, da b bila čebela kot vrsta, ki je evropska Direktiva ne vključuje, zajeta n nacionalno zakonodajo. Menimo, da bi vključitev čebelarstva v Zakon o živinoreji omogočila napredek rejskega dela in razvoj strategije za ohranjanje te avtohtone populacije in izboljšanje njenih proizvodnih in zdravstvenih lastnosti. Na ta način bi zagotovili podporo rejskemu delu, ki je zajeto edino v zakonodaji s področja živinoreje, v okoljski zakonodaji, kjer se v večini držav čebelarstvo nahaja pa ta aspekt ni zajet.

## 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 zgoščenkah (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**

Datum:

14.3.2017

### Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2017/16

<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 cilje iz prijave projekta in napišite, ali so bili cilji projekta doseženi. 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 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](#)

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 2016 (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/>, predstavitve dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/> [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2017 v1.00

CB-25-DF-0D-94-6E-FE-9F-B6-B0-A1-E0-42-56-EC-3A-46-EA-62-E3

**Elaborat zaključnega poročila projekta V4-1418**  
**»Določitev molekularnih parametrov za ohranjanje kranjske čebele«**



**Kazalo**

<b>Izvleček</b>	<b>2</b>
<b>I. Molekularno genetske analize</b>	<b>3</b>
<b>II. Proteomska analiza</b>	<b>6</b>
<b>III. Morfološki parametri</b>	<b>11</b>
<b>IV. Bioinformacijska analiza</b>	<b>12</b>
<i>a) Analiza cis-regulatornih razlik v promotorskih regijah kandidatnih genov</i>	<b>12</b>
<i>b) Analiza kandidatnih genov v transkriptomih kranjske in italijanske čebele</i>	<b>12</b>
<i>c) Epigenomski podatki za čebele</i>	<b>12</b>
<i>d) Analiza RNA virusov pri čebelah oz. kožokrilcih</i>	<b>13</b>
<b>V. Vedenjski poskusi</b>	<b>13</b>
<b>VI. Zaključek</b>	<b>15</b>

### Izvleček

Populacijsko genetske raziskave vzorcev kranjske čebele iz Slovenije in sosednjih držav so pokazale, da je pestrost mitohondrijske DNA v populaciji kranjske čebele bistveno večja, kot so to kazale preliminarne raziskave. Sekvenčna analiza je pokazala sorazmerno širok nabor mitohondrijskih tipov, ki se pojavljajo v večini populacij. V nasprotju s pričakovanji smo pokazali, da ni za posamezno populacijo specifičnih mtDNA haplotipov. Analiza 24 mikrosatelitnih lokusov na 569 vzorcih kranjske čebele iz različnih območij Slovenije, Hrvaške, Avstrijske Koroške in obmejnega pasu z Italijo je pokazala, da sicer obstajajo populacijske razlike, vendar večina vzorcev tvori kompaktno skupino, ki se ne diferencira. Tako tvorijo vsi slovenski in vzorci z Avstrijske Koroške enotno gručo brez zaznavne diferenciacije po regijah. Vzorci iz Hrvaške se jasno ločijo od vzorcev iz Slovenije, vendar ne tvorijo zelo prepričljivo ločenih dveh gručk, kot bi glede na njihov izvor v celinskem in obalnem delu Hrvaške pričakovali. Vzorci iz Italije tvorijo razpršeno gručo, ki je jasno ločena od osrednje gruče slovenskih vzorcev, kar kaže na možnost, da gre za križance z *A.m.ligustica*. V skladu z načrtom dela smo vzpostavili metodologijo za proteomske analize čebeljih vzorcev. Pogoje za izvedbo dvodimenzionalne poliakrilamidne gelske elektroforeze (2DE), ki smo jih v predhodnem obdobju vzpostavili s pomočjo analize kompleksnega modrasovega strupa, smo optimizirali za analize čebeljih vzorcev. Največ pozornosti smo posvetili analizi matičnega mlečka in hemolimfe. Primerjalne analize matičnega mlečka različnih družin (matičnjakov) kranjske čebele iz dveh različnih slovenskih regij (Gorenjska in Dolenjska) jasno izkazujejo razlike v njihovi proteinski sestavi, tako na nivoju regij, kot na nivoju različnih družin iz iste regije. Bolj kot razlike v sami sestavi so izrazite razlike v zastopanosti določenih proteinov.

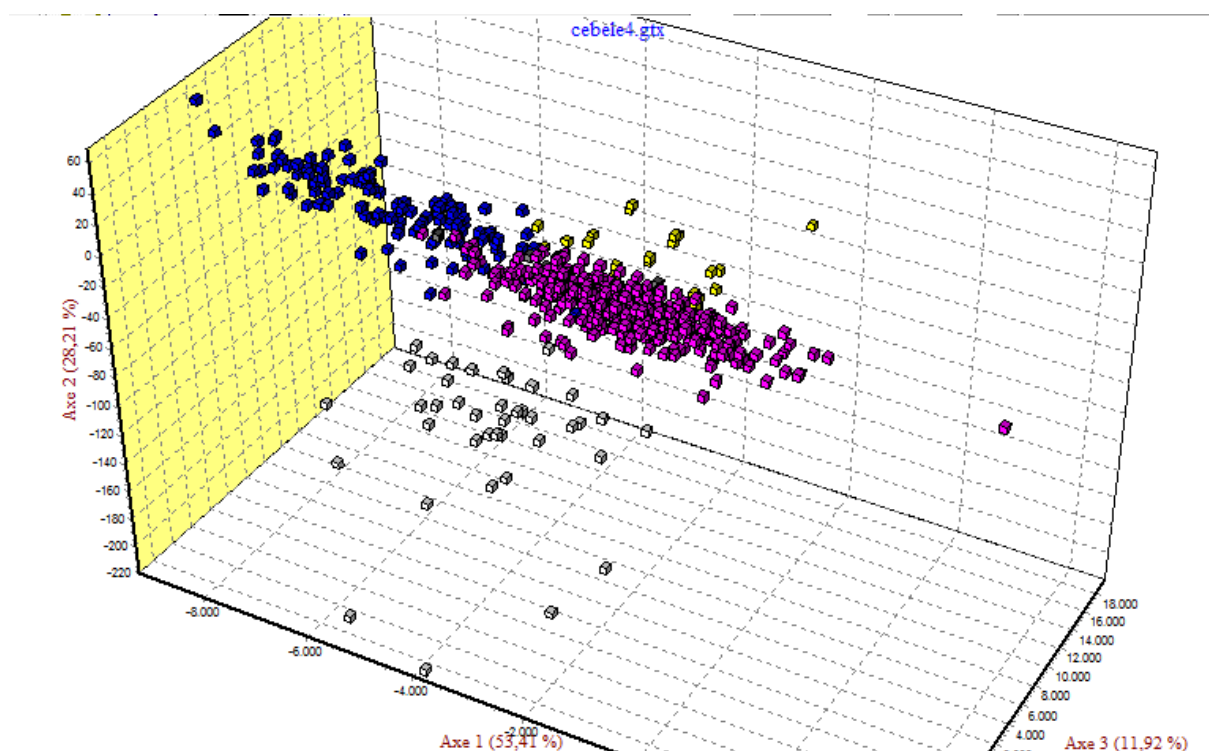
Pri kranjski čebeli zelo verjetno obstajajo razlike v izražanju določenih genov, ki so povezani z različnimi morfološkimi, vedenjskimi in proizvodnimi lastnostmi. Številni geni, ki so pomembni za obnašanje čebel so močno ohranjeni pri različnih socialnih žuželkah, vendar pa so nastale razlike v regulaciji teh genov. Ker so podvrste čebele podvržene različnim selekcijskim pritiskom, so možna spremenjena vezavna mesta za transkripcijske faktorje, ki so nastala z cis-regulatorno evolucijo, pogojena pa so bila s selekcijo za določene adaptivne lastnosti.

Z analizo morforloških značilnosti smo obdelali dolžino tibije, dolžino rilčka in kubitalni indeks. Rezultati kažejo, da je dolžina rilčka korelirana z vrsto paše, ki jo čebele najpogosteje izkoriščajo. Spremljali smo tudi gibanje kubitalnega indeksa in ugotovili, da je tipična vrednost tega fenotipskega parametra za kranjsko čebelo po letih sicer različna, vendar se vrednosti v zadnjih letih gibljejo med 2.6 in 2.7.

### I. Molekularno genetske analize

Populacijsko genetske raziskave vzorcev kranjske čebele iz Slovenije in sosednjih držav so pokazale, da je pestrost mitohondrijske DNA v populaciji kranjske čebele bistveno večja, kot so to kazale preliminarne raziskave. Sekvenčna analiza je pokazala sorazmerno širok nabor mitohondrijskih tipov, ki se pojavljajo v večini populacij. V nasprotju s pričakovanji smo pokazali, da ni za posamezno populacijo specifičnih mtDNA haplotipov. Analiza 24 mikrosatelitnih vzorcev na 569 vzorcih kranjske čebele iz različnih območij Slovenije, Hrvaške, Avstrijske Koroške in obmejnega pasu z Italijo je pokazala, da sicer obstajajo populacijske razlike, vendar večina vzorcev tvori kompaktno skupino, ki se ne diferencira. Tako tvorijo vsi slovenski in vzorci z Avstrijske Koroške enotno gručo brez zaznavne diferenciacije po regijah. Vzorci iz Hrvaške se jasno ločijo od vzorcev iz Slovenije, vendar ne tvorijo zelo prepričljivo ločenih dveh gručk, kot bi glede na njihov izvor v celiskem in obalnem delu Hrvaške pričakovali. Vzorci iz Italije tvorijo razpršeno gručo, ki je jasno ločena od osrednje gruče slovenskih vzorcev, kar kaže na možnost, da gre za križance z *A.m.ligustica*.

Analizirane populacije iz Avstrije, Hrvaške, Italije, Makedonije in Slovenije predstavljajo vzorec 569 čebel, od tega 371 iz Slovenije (pokrajine Gorenjska, Ljubljana, Štajerska, Primorska, Bovec, Dolenjska, Koroška, Prekmurje). Analiza z orodjem Genetix jasno loči vzorce iz Avstrije, Italije, Hrvaške in Slovenije. Slovenski vzorci zelo homogeni, brez vidne resolucije ločevanja med vzorci (graf 1). Tabela s frekvencami alelov, heterozigotnostjo, Fis vrednostmi in signifikantnostjo odstopanje Fis vrednosti od (test HWE) prikazuje značilnosti distribucije alelov. Opazno je odstopanje od HWE pri hrvaških vzorcih, ki so tudi najbolj heterogeni.



Slika 1: medpopulacijski odnosi *A.m.carnica* in *ligustica*.

Tabela 1: podatki o distribuciji alel in značilnostih populacij.



## Molekularni parametri za ohranjanje kranjske čebele

### ŠTEVILO ALELOV NA LOKUS NA POPULACIJO

number of alleles sampled :

	Avstrija	Hrvaška	Italija	Makedonija	Slovenija	SKUPAJ
A24	3	5	4	2	6	6
Ap273	3	5	2	1	4	5
A28	5	5	5	3	7	8
A43	6	7	4	5	14	16
A8	6	13	12	5	14	15
A88	5	9	6	4	12	12
A107	13	17	16	6	19	22
A14	5	9	11	3	12	14
A35	6	12	7	2	10	16
A7	6	18	8	7	18	25
A113	7	10	8	2	12	15
Ap55	6	12	13	2	20	21
Ap81	3	8	5	3	8	11
Ap226	3	9	7	4	8	11
A(B)12	7	11	7	6	16	18
A79	8	10	10	6	10	14
Ac306	5	9	8	3	9	12
Ap43	6	11	9	3	13	17
Ap53	18	25	18	7	29	32
A29	14	25	21	9	26	27
Ap289	6	13	6	4	15	20
Ap33	11	16	11	5	14	17
Ap36	12	10	9	2	20	24

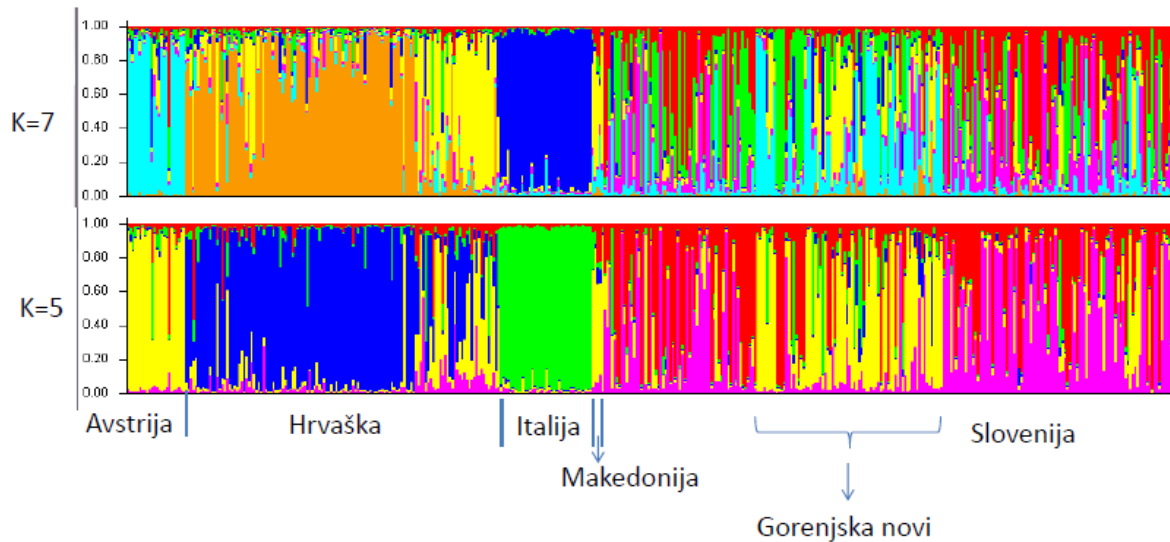
### FIS IN ODKLON OD HWE

Fis Per population :

A24	0.068	0.096	-0.009	0.143	-0.033
Ap273	-0.011	-0.205	-0.013	NA	0.055
A28	-0.422	-0.745	-0.059	-0.750	-0.743
A43	-0.386	-0.022	-0.556	0.118	0.212
A8	0.051	0.018	0.085	0.284	0.010
A88	0.101	0.109	0.046	0.357	-0.029
A107	0.080	0.083	0.017	-0.167	-0.001
A14	-0.105	0.121	0.196	-0.125	0.074
A35	0.101	0.165	0.080	0.750	0.008
A7	-0.057	-0.088	0.151	0.040	0.016
A113	-0.035	0.132	0.039	-0.091	0.013
Ap55	0.176	-0.169	-0.026	0.727	0.087
Ap81	-0.087	-0.206	-0.128	0.489	0.109
Ap226	-0.134	-0.195	-0.014	-0.220	-0.044
A(B)12	-0.233	0.034	0.392	0.189	0.018
A79	0.008	0.003	0.047	-0.091	-0.016
Ac306	0.212	-0.027	0.147	-0.125	-0.013
Ap43	0.065	0.028	0.046	0.100	-0.069
Ap53	0.362	0.375	-0.000	0.118	0.373
A29	-0.121	0.008	0.021	-0.077	0.015
Ap289	0.131	-0.222	0.405	-0.171	-0.033
Ap33	0.016	0.018	-0.006	0.273	0.020
Ap36	-0.017	-0.491	0.438	0.000	0.034
All	-0.005	-0.033	0.045	0.087	0.012

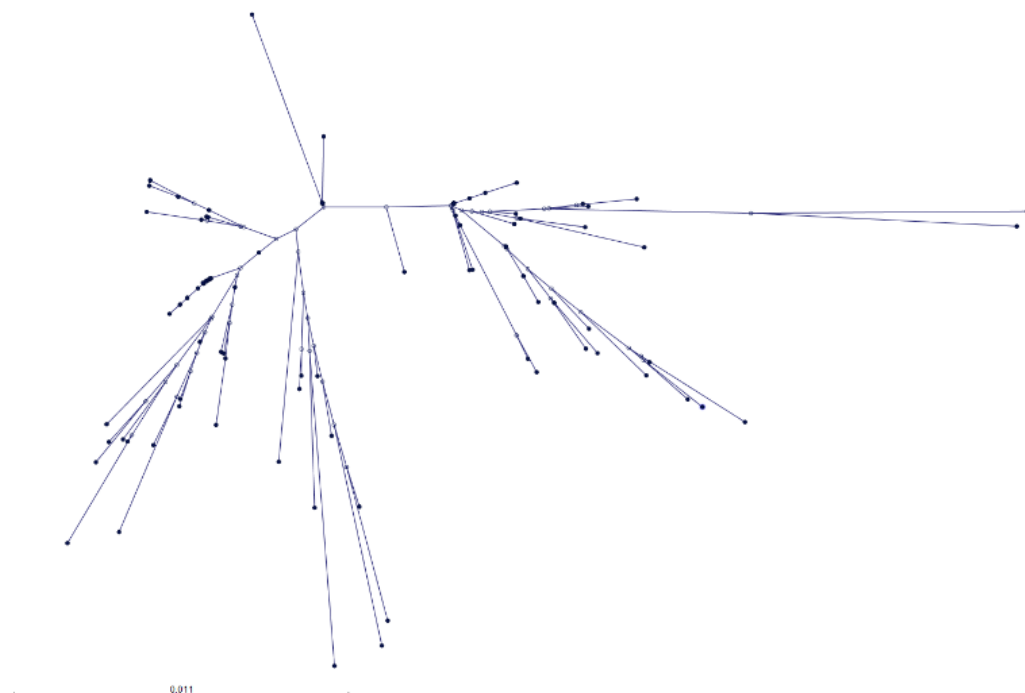
## Molekularni parametri za ohranjanje kranjske čebele

S statističnim programom Structure smo skušali oceniti populacijsko čistost posameznih populacij. Najbolj verjetno število genetskih skupin je 3, ločeni sta populaciji iz Avstrije in Italije, ostale so si zelo podobne. Po verjetnosti sledi število skupin  $K=7$  in nato  $K=5$ . Pri teh dveh vrednostih je lažje biološko razložiti razdelitev, zato sta ti dve tudi prikazani.



Slika 2: STRUCTURE analiza populacij *A.m.carnica*

Vidno je, da sta na Hrvaškem dve skupini, vendar je veliko tudi vzorcev s pripadnostjo obema skupinama, zato tudi ni opazne jasne ločenosti v Genetix grafu. Določena strukturanost opazna tudi pri slovenskih vzorcih, predvsem odstopa del vzorcev iz Gorenjske.



**Slika 3:** Kladogram predstavlja odnose med mtDNA haplotipi v slovenski, avstrijski in hrvaški populaciji *A.m.carnica* in *A.m.ligustica*.

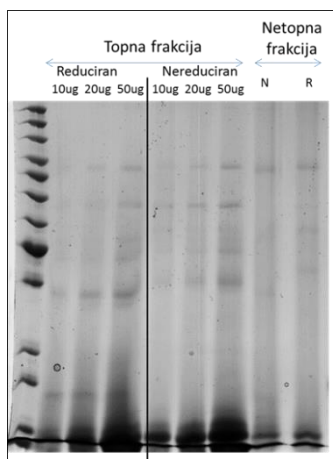
### II. Proteomska analiza

V skladu z načrtom dela smo metodologijo proteomske raziskave optimizirali za analize čebeljih vzorcev. Pogoje za izvedbo dvodimenzionalne poliakrilamidne gelske elektroforeze (2DE), ki smo jih v predhodnem obdobju vzpostavili s pomočjo analize kompleksnega modrasovega strupa, smo optimizirali za analize čebeljih vzorcev: strupa, matičnega mlečka in hemolimfe. Ker strupa kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*) še nismo imeli smo si pomagali s trupom sorodne kavkaške čebele po poreklu iz Gruzije (*Apis mellifera caucasica*), ki smo ga dobili od kolegice iz podjetja Medex, d.o.o. Matični mleček in hemolimfa, ki smo ju analizirali sta bila od kranjske čebele.

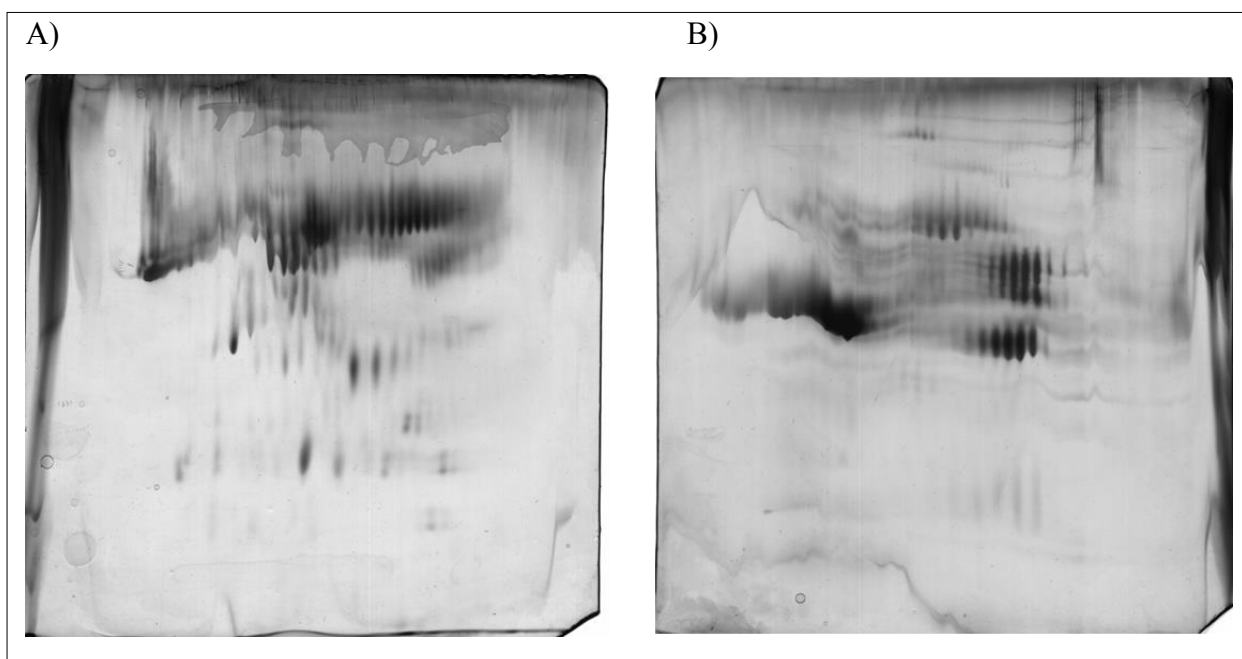
Kot smo predvidevali je bila izbira modrasovega strupa, kot referenčnega strupa, zelo primerna za vzpostavitev dobrih pogojev za analizo manj kompleksnih čebeljih vzorcev.

#### Optimizacija 2DE analize

V prvi dimenziji, izoelektrično fokusiranje (IEF), smo vzorce razdvajali na 7 cm trakovih z imobiliziranim nelinearnim gradientom pH 3-11. IEF smo izvedli na aparaturi Ettan IPGphor II pri 20 °C, z omejitvijo toka na 50 µA/trak ni v električnem polju, ki se je spreminjal po slededem programu: 300 V, 45 min; 1000 V, 30 min; 5000 V, 80 min; 5000 V do 6000 Vh celotne jakosti električnega toka, ki je pretekel skozi trak. Fokusirane IPG trakove smo reducirali z DTT in alkilirali z iodoacetamidom pred analizo v drugi dimenziji. Sestavo pufru za pripravo vzorcev in izvedbo IEF smo optimizirali s pomočjo modificirane Taguchijeve metode (Khoudoli in sod. *Proteome Sci.* 2004; 2: 6, doi:10.1186/1477-5956-2-6), ki omogoča enostavno optimizacijo večkomponentnih sistemov. Pufer je vseboval standardne komponente: 7 M urea, 2 M tiourea, 30 mM Tris pufer, 0.002% (m/v) barvilo Bromfenol modro in 12 µL/mL DeStreak reagent. Poleg njih pa še dva detergenta (CHAPS i ASB-14) in amfolite, katerih koncentracije je bilo potrebno optimizirati. Klasični postopek optimizacije bi zahteval evaluacijo vseh možnih kombinacij teh treh komponent. To pomeni, da bi za kombinacijo treh različnih koncentracij vsakega izmed reagentov potrebovali 27 2DE analiz ( $3^3$ ). S pomočjo ortogonalne Taguchijeve matrike (tabela 1) smo najboljše pogoje za IEF določili z izvedbo samo devet 2DE analiz (slika 1). V drugi dimenziji, poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti Na-dodecil sulfata (NaDS-PAGE), smo namesto klasičnega pufru Tris/glicin uporabili pufer Tris/taurin, ki omogoča ločevanje proteinov v širokem razponu molekulskih mas (5 - 250 kDa) na istem gelu (Tastet in sod. *Electrophoresis* 2003; 24: 1787-94). 2DE gele smo po analizi barvali s koloidnim srebrom, posneli z aparaturo Image Scanner z uporabo računalniškega programa LabScan 5 in analizirali s programom Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare Life Sciences). Uspešnost razdvajanja proteinov u različnih pogojih, smo ocenili glede na število proteinskih lis, ki smo jih detektirali na posameznem 2DE gelu (tabela 1). Optimizirani rehidracijski pufer (ORP) je tako poleg standardnih komponent vseboval: 2.5% (m/v) CHAPS, 0,25% (m/v) ASB-14 in 1% (v/v) amfolite. V teh pogojih smo modrasov trup ločili na 215 proteinskih lis (slika 2).



**Slika 4.** Enodimenzionalna analiza strupa kavkaške čebele. Strup smo raztopili v vodi, centrifugirali in posebej analizirali topni in netopni del. Obe frakciji smo topili v NaDS PAGE puftru z dodanim reducentom (DTT) ali brez. Poliakrilamidni gel z 10% T smo pripravili v Tris puftru s teoretično izračunanim pH 7.75 (110 g/l Tris/0.6 M HCl). NaDS-PAGE smo izvedli z uporabo anodnega Tris/glicin in katodnega Tris/taurin puftra. Gele smo pobarvali z barvilom PageBlue, slikali in analizirali s računarskim programom.



**Slika 5.** 2DE separacija matičnega mlečka in hemolimfe kranjske čebele. (A) 30 µg matičnega mlečka oziroma (B) 95 µg hemolimfe (vsebuje ~50 µg proteinov) kranjske čebele smo raztopili v rehidracijskem puftru za IEF in analizo izvedli na IPG trakovih (7 cm, nelinearni gradient pH 3-11) s skupnim tokom 6000 Vh/trak. Proteine smo pred drugo dimenzijo reducirali z DTT in alkilirali z iodoacetamidom. Poliakrilamidni gel z 10% T smo pripravili v Tris puftru s teoretično izračunanim pH 7.75 (110 g/l Tris/0.6 M HCl). NaDS-PAGE smo izvedli z uporabo anodnega Tris/glicin in katodnega Tris/taurin puftra. 2DE gele smo pobarvali s srebrom, slikali in analizirali s računarskim programom.

## Molekularni parametri za ohranjanje kranjske čebele

**Sklep 1:** Pogoji ločbe, ki smo jih določili s testnimi čebeljimi vzorci, predstavljajo osnovo za primerjalno analizo strupa, matičnega mlečka in hemolimfe kranjske čebele iz različnih področij v Sloveniji.

V drugi polovici leta 2015 smo prejeli prve vzorce družin kranjske čebele. Prejeli smo vzorce (iz po treh matičnjakov oziroma družin) matičnega mlečka iz dveh krajev na Gorenjskem (vzorci B in K) in dveh krajev na Dolenjskem (vzorci R in S).

Z uporabo 2DE in RP-HPLC analiz smo izvedli primerjalne analize proteinske sestave vzorcev B1-B3 in K1-K3 matičnega mlečka iz Gorenjske regije in pa vzorcev R1-R3 in S1-S3 matičnega mlečka iz Dolenjske regije.

Del vsakega vzorca smo prenesli v čisto, predhodno stehtano 1,5 mL mikrocentrifugirko. S tehtanjem smo določili količino posameznega vzorca in ga nato raztopili v pufri za 2DE (30 mM Tris, 7 M urea, 2 mM tiourea, 2,5% (m/v) CHAPS in 0,25% (m/v) ASB-14) tako, da je končna proteinska koncentracija bila 250 µg/µl. Podatek o vsebnosti proteinov v matičnem mlečku smo vzeli iz literature in znaša 56,6%. Vzorce smo pustili čez noč v hladilniku in jih potem analizirali z 2DE ali HPLC analizo na obrnjeni fazi (»reversed phase«).

### 2DE analiza

#### *Prva dimenzija – izoelektrično fokusiranje (IEF)*

7-cm elektroforetski trak z imobiliziranim nelinearnim gradientom pH 3–11 v gelu (IPG) smo v rehidracijskem pladnju čez noč inkubirali v pufri (30 mM Tris, 7 M urea, 2 M tiourea, 0,002 % (m/v) bromfenol modro, 2,5 % (m/v) CHAPS, 0,25 % (m/v) ABS-14 (alkilamidofosforbetain-14), 1 % (v/v) amfoliti (pH 3–11), 1,2 % (v/v) DeStreak Reagent (spremeni tiolne skupine v stabilne disulfide in s tem prepreči nespecifično oksidacijo proteinov)), ki smo mu dodali 50 µg matičnega mlečka. IPG trak smo prekrili z mineralnim oljem ter tako preprečili izhlapevanje vode in kristalizacijo uree. Po končani rehidraciji smo IPG-trak sprali z vodo, ga vpeli med elektrodi in izvedli IEF na aparaturi Ettan IPGphor (GE Healthcare Life Sciences, ZDA). IEF je potekal pri 20 °C, omejitvi toka 50 µA/trak in v električnem polju, ki smo ga spreminjali po naslednjem programu: 45 min pri 300 V, 30 min pri 1000 V ter 80 min pri 5000 V. Četrta faza IEF je potekala pri 5000 V toliko časa, da je celokupna moč električnega toka, ki je stekel skozi trakove, dosegla 6000 Vh.

#### *Druga dimenzija – NaDS-PAGE*

IPG trak smo najprej pri sobni temperaturi 15 min reducirali s 65 mM DTT v ekvilibracijskem pufri v prisotnosti NaDS (6 M urea, 75 mM Tris/HCl, pH 7,5, 30 % (v/v) glicerol, 4 % (m/v) NaDS, 0,002 % (m/v) bromfenol modro) ter nato še 15 min alkilirali s 135 mM jodoacetamidom (IAA), raztopljenim v enakem pufri. IPG-trak smo nato položili na 10 % (m/v) PA-gel in ga zalili s 0,5 % (m/v) agarozno raztopino. Katodni pufer je vseboval 50 mM Tris, 0,1 % (m/v) NaDS in 200 mM glicin, anodni pa namesto glicina 200 mM taurin. Elektroforeza je potekala pri stalnem toku 10 mA/gel. Po končani elektroforezi smo proteine v gelu obarvali z AgNO<sub>3</sub>.

Pobarvane gele smo digitalizirali z Image Scanner-jem s pomočjo računalniškega programa LabScan 5 (GE Healthcare, Amersham Biosciences) ter slike analizirali in primerjali med seboj z računalniškim programom Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare, Amersham Biosciences) (slika 3). V posameznih gelih smo določili število proteinskih lis (zbrano v Tabeli 1).

Opažene razlike v številu proteinskih lis gredo v glavnem na račun proteinov, prisotnih v nizkih množinah. Število intenzivnih lis se med posameznimi geli zelo malo razlikuje.

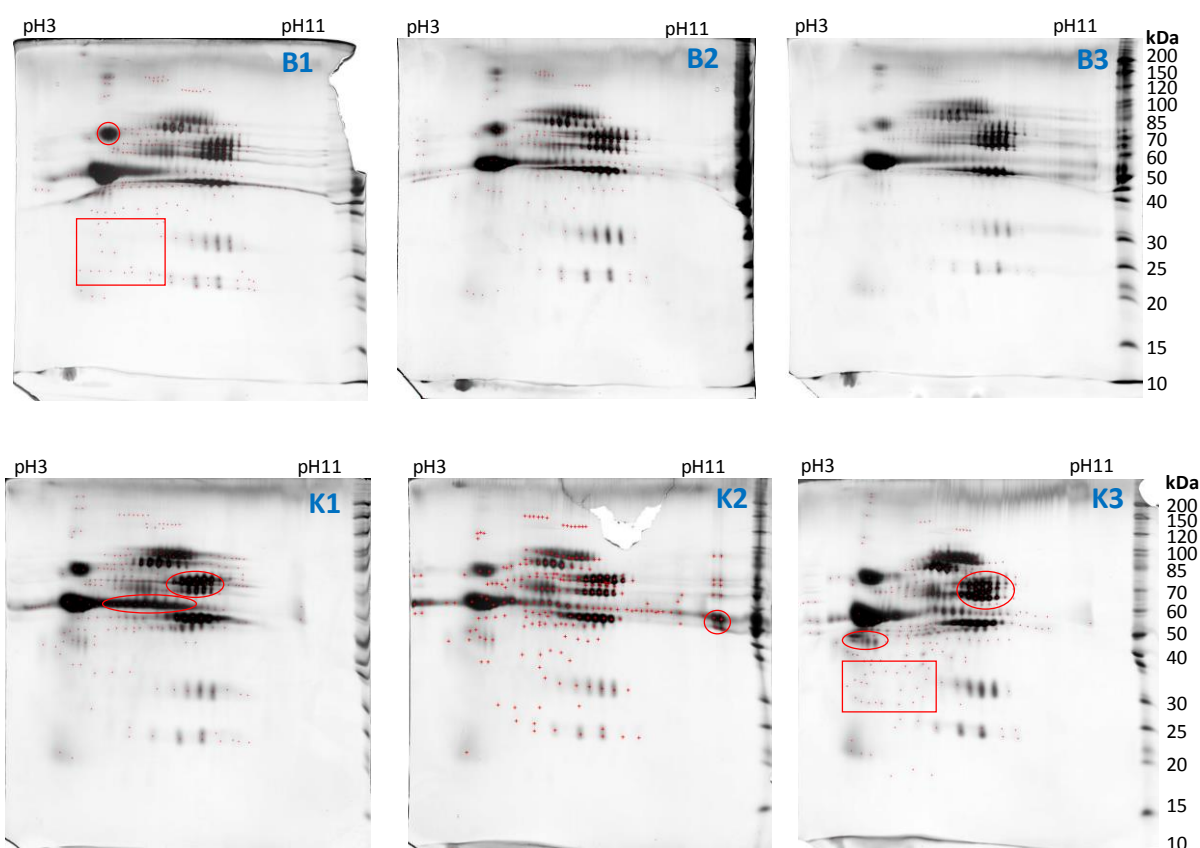
## Molekularni parametri za ohranjanje kranjske čebele

Najmanj so se med seboj razlikovali vzorci matičnega mlečka B1-3 iz Gorenjske regije, kjer smo v vzorcu B1 v primerjavi z ostalimi opazili več proteinskih lis med proteini, ki so prisotni v nizki koncentraciji (okvirjeni z rdečim kvadratom) in bolj intenzivno liso v kislem pH območju pri 80 kDa.

Glede na razporeditev in intenziteto določenih proteinskih lis (obkroženi rdeče na sliki 3) v vzorcih K je le-te možno med seboj jasno razlikovati. Prav tako se razlikujejo od vzorcev B. Tudi med vzorci R iz Dolenjske regije so jasno opazne specifične razlike, ki jih ločijo med seboj kot tudi od vzorcev iz Gorenjske regije.

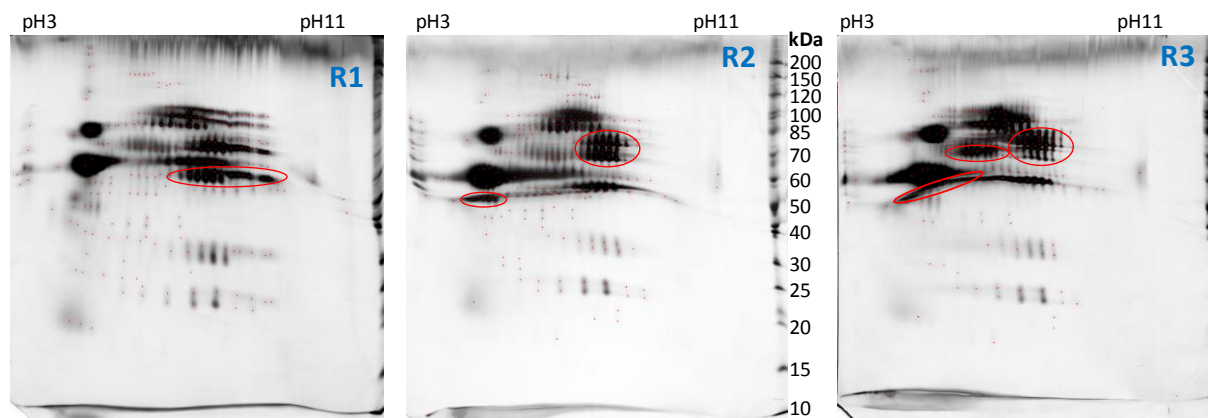
**Tabela 1.**

Vzorec matičnega mlečka	Število proteinskih lis
B1	249
B2	230
B3	250
K1	252
K2	231
K3	271
R1	269
R2	269
R3	243





## Molekularni parametri za ohranjanje kranjske čebele



**Slika 6.** Primerjava proteinske sestave vzorcev matičnega mlečka kranjske čebele iz Gorenjske regije (B1-3, K1-3) in iz Dolenjske regije (R1-3). Z rdečim so obkrožene skupine proteinov, ki se izrazito razlikujejo med posameznimi vzorci.

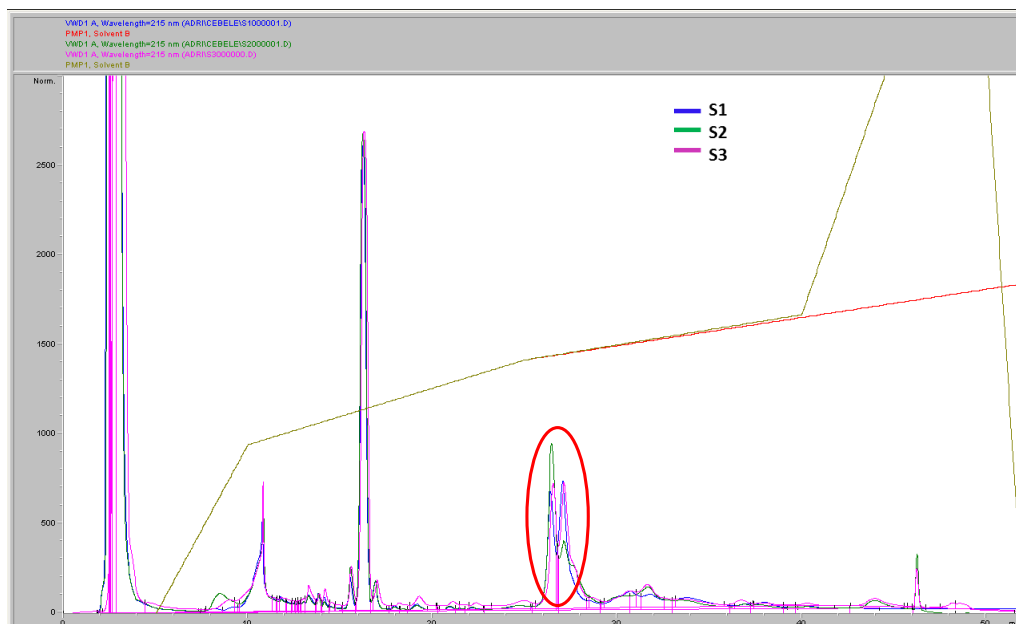
### Visokotlačna kromatografija na obrnjenih fazah (RP-HPLC)

Vzorci S iz Dolenjske regije smo analizirali in primerjali s RP-HPLC analizo na koloni PLRP-S.

Kromatografijo smo izvajali na HPLC-sistemu 1100 (Hewlett Packard, ZDA). Kolono smo uravnotežili s topilom A, 0,1 % (v/v) TFA v vodi. Vzorec matičnega mlečka (10  $\mu$ l), ki smo ga predhodno pripravili v pufru za 2DE, smo razredčili v topilu A do 500  $\mu$ l, centrifugirali 5 minut pri 14000xg. Vzeli smo 200  $\mu$ l vzorca (vsebuje 1 mg proteinov), ga redčili do 500  $\mu$ l in nanесли na kolono pri pretoku 1 ml/min. Po spiranju nevezanih proteinov s kolone s topilom A, smo vezane proteine eluirali pri pretoku 1 ml/min z gradientom topila B, 90 % (v/v) acetonitril, ki je vseboval 0,1 % (v/v) TFA v vodi, na naslednji način:

- vzorec S1: 0-30% B v 5 minutah, 30-45% B v 15 minutah, 45-70% B v 50 minutah in 70-100% B v 5 minutah,
- vzorca S2 in S3: 0-30% B v 5 minutah, 30-45% B v 15 minutah, 45-53% B v 15 minutah in 53-100% B v 5 minutah.

Iz slike 4 vidimo, da imata vzorca S1 in S3 enak kromatografski profil, medtem ko se S2 od njiju razlikuje v medsebojnem razmerju površine/višine vrhov, ki se s kolone spereta pri času 26,4 in 27,1 min (obkroženo z rdečim).

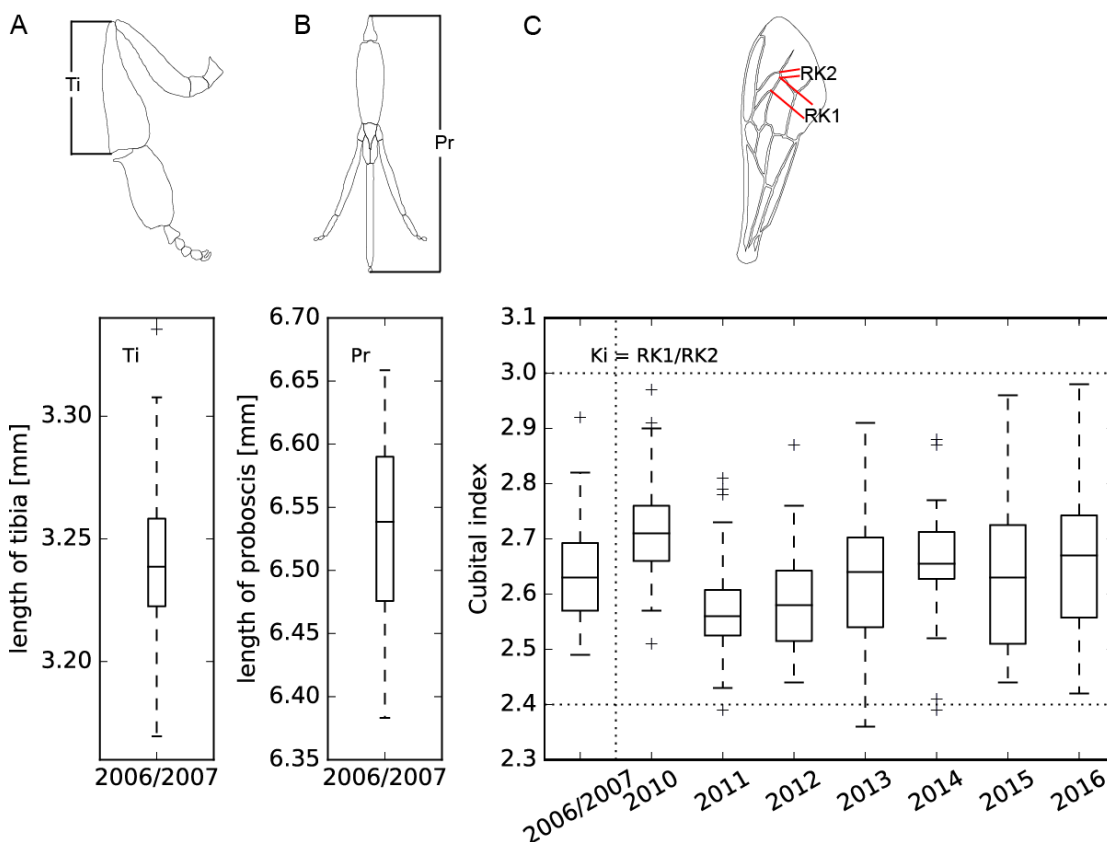


**Slika 7.** Primerjava PR-HPLC profilov vzorcev matičnega mlečka iz treh različnih družin kranjske čebele (S1-S3) iz Dolenjske regije. Analiza je bila izvedena na koloni PLRP-S.

**Sklep 2:** Primerjalne analize matičnega mlečka različnih družin (matičnjakov) kranjske čebele iz dveh različnih slovenskih regij (Gorenjska in Dolenjska) jasno izkazujejo razlike v njihovi proteinski sestavi, tako na nivoju regij, kot na nivoju različnih družin iz iste regije. Bolj kot razlike v sami sestavi so izrazite razlike v zastopanosti določenih proteinov.

### III. Morfološki parametri

Poklukar (1992) je proučeval dolžino tibije delavk kot možen parameter raznolikosti: Milne et al. (1984) so predlagali, da bi velikost golenice poveča vnos cvetnega prahu (posredno izboljšanje medu žetvijo) zaradi večje površine corbicularnega območja. Slika 8A prikazuje porazdelitev dolžine golenice v 31 čebelnjakih po vsej Sloveniji. Mediana dolžina golenice je 3,23 mm (n = 6470). Dolžina rilčka pri *A. m. carnica* je 6,54 mm (n = 1387) je daljša v primerjavi z nekaterimi drugimi podvrstami *A. m. mellifera* ( $\approx 6$  mm) in *A. m. ligustica* (6,3-6,6 mm), vendar je krajši v primerjavi z *A. m. caucasica* ( $\approx 7$  mm). Najbolj pogosto proučevana morfološka lastnost je kubitalni indeks (CI), razmerje med dolžino odsekov spodnje vene tretje kubitalne celice na krilih (označen kot Rk1 in RK 2 na sliki 3C zgoraj). CI pri rejcih v Sloveniji mora biti med 2,4 in 3,0. Slika 8C prikazuje porazdelitev CI 25 naključno izbranih čebelnjakov po vsej Sloveniji. CI skupaj z molekularnimi markerji predstavlja dober parameter za opredelitev populacij *A.m. carnica*.



**Slika 8.** Dolžine tibije in rilčka ter kubitalni indeks skozi zadnjih 10 let.

### IV. Bioinformacijska analiza

## **Molekularni parametri za ohranjanje kranjske čebele**

Pri kranjski čebeli zelo verjetno obstajajo razlike v izražanju določenih genov, ki so povezani z različnimi morfološkimi, vedenjskimi in proizvodnimi lastnostmi. Številni geni, ki so pomembni za obnašanje čebel so močno ohranjeni pri različnih socialnih žuželkah, vendar pa so nastale razlike v regulaciji teh genov. Ker so podvrste čebele podvržene različnim selekcijskim pritiskom, so možna spremenjena vezavna mesta za transkripcijske faktorje, ki so nastala z cis-regulatorno evolucijo, pogojena pa so bila s selekcijo za določene adaptivne lastnosti.

### **a) Analiza cis-regulatornih razlik v promotorskih regijah kandidatnih genov**

Cis-regulatorne razlike v promotorskih regijah kandidatnih genov smo v letu 2015 raziskali v genomih kranjske čebele. Celotno genomsko zaporedje je na voljo za italijansko čebelo (*Apis mellifera ligustica strain DH4*). Javno dostopni pa so trije delni genomi delavk kranjske čebele (na NCBI SRA Db: SRX339514 - SRX339516), ki pokrivajo od 30-40% referenčnega čebeljega genoma (Harpur et al. 2014), nukleotidna zaporedja pa so zelo kratka (dolga so le 50 bp). Zanimalo nas je, ali lahko na cis-regulatornem nivoju opazimo kakšne razlike med tema dvema najbližjima podvrstama čebele, ki spadata v haplotipsko skupino C. V genomih kranjske čebele smo iskali razlike v promotorskih regijah kandidatnih genov oz. genov, ki so dokazano odgovorni za vedenjske, proizvodne in morfološke značilnosti. Kandidatni geni, ki smo jih analizirali v delnih genomih kranjske čebele so bili vitelogenin, erk7, Mrjp4, dopaminski receptor (dop3), tiraminski receptor (TyrR), oktopaminski receptor (Oa1), cirkadiani protein period (Per), NMDA receptor 1 (Nmdar1), melitin, trehalaza in številni drugi geni. Za vsak kandidatni gen smo analizirali po 2000 do 2500 bp promotorskih regij. Ugotovili smo, da v preiskovanih genih na cis-regulatornem nivoju ne obstajajo razlike med kranjsko in italijansko podvrsto (oz. raso) čebel. Presenetilo nas je dejstvo, da na genomskem nivoju ni razlik niti v regulatornih niti v genskih regijah pri kandidatnih genih. Glede na to, da sta si kranjska in italijanska podvrsta čebele tako zelo podobni na genomskem nivoju, kaže na omejeno uporabo genomskih podatkov za primerjavo obeh podvrst. Glavni vzrok za tako podobnost genomov kranjske in italijanske čebele je dejstvo, da sta se ti dve podvrsti (rasi) ločili pred ~ 25.000 leti.

### **b) Analiza kandidatnih genov v transkriptomih kranjske in italijanske čebele**

Za kranjsko in italijansko čebeljo so javno dostopni tudi številni transkriptomski podatki (na NCBI SRA, GEO ipd.). Ti podatki se ločijo po izvoru (kar nekaj je *carnice* iz Kitajske in Nemčije ter *ligustice* iz različnih držav), tkivu (npr. možgani), spolu in funkciji (matica, delavka in troti). Tako kot za genomske podatke velja, da so v NCBI SRA Db nukleotidna zaporedja zelo kratka (dolga so le 50 – 100 bp). Kandidatne gene (iste kot pri genomski analizi) smo uporabili za iskanje razlik med kranjsko in italijansko čebelo na nukleotidnem nivoju. Podobno kot na genomskem nivoju nam tudi analiza transkriptomskih podatkov ni pokazala nobenih razlik med transkripti kandidatnih genov.

### **c) Epigenomski podatki za čebele**

Pri čebelah je le omejeno število genov odgovorno za določene lastnosti, zelo pogosto pa so številni geni epigenetsko modificirani (ponavadi so metilirani) oz. so vključeni v različna genska regulatorna omrežja ali v proteinsko-proteinske interakcije (PPI). Žal pa nam javno dostopni podatki za kranjsko čebelo ne omogočajo vpogleda v epigenetske modifikacije kandidatnih genov, ki naj bi bili odgovorni za vedenjske in fiziološke posebnosti čebele. Ravno tako niso dostopni epigenomski podatki za obe podvrsti (*carnica* in *ligustica*), ki bi nam lahko omogočili primerjavo razlik v epigenetskih modifikacijah kandidatnih genov.

### **d) Analiza RNA virusov pri čebelah oz. kožokrilcih**

## Molekularni parametri za ohranjanje kranjske čebele

Glede na to, da obstajajo številni RNA virusi, ki povzročajo kronične infekcije čebel smo preverili ali so prisotni tudi kakšni doslej neznan RNA virusi v trenutno dostopnih transkriptomih in genomih čebel ter ostalih kožokrilcev (os in mravelj). Prisotnost različnih RNA virusov pri čebelah oz. kožokrilcih smo analizirali v številnih NCBI WGS genomih ter v NCBI TSA transkriptomih. Ugotovili smo veliko raznolikost RNA virusov pri kožokrilcih, presenetljivo pa je, da imajo čebele najmanj raznolik repertoar. Analiza RNA virusov v genomih kožokrilcev je pokazala, da je nekaj RNA virusov endogeniziranih, oz. prisotnih v genomu.

Genom virusa motnih kril (Cloudy wing virus – CWV) doslej še ni bil znan, ampak obstaja le zelo kratek košček RNA polimeraze. Ravno tako ni bilo znano, kam spada ta virus in kako velik je. V NCBI TSA podatkovni bazi smo uspeli najti celoten genom tega virusa, ki je dolg 9500 bp. Struktura genoma je zanimiva, saj vsebuje kar 4 ORFje (zapise za proteine). Na nukleotidnem nivoju je najbolj podoben Kashmir bee virusu (KBV) saj sta si kar 95% identična, obstaja pa le 26 aminokislinskih razlik med njima. Celoten genom CWVja je torej potrdil, da ta RNA virus spada med pikornaviruse in sicer v Dicistroviridae in rod Aparavirus (tako kot KBV virus ter še dva čebelja virusa ABPV in IAPV). Kljub tako majhnemu številu nukleotidnih oz. aminokislinskih razlik, pa so le te povzročile spremembo v strukturi organizaciji genoma. ORF1 KBVja namreč ustreza trem ORFjem (1-3) pri CWV, ORF2 in 4 sta si praktično identična (kodirata kapsido). Rešili smo torej uganko virusa motnih kril in ga pravilno klasificirali. CWV torej spada med enoverižne RNA viruse z pozitivno polarno verigo (ssRNA positive-strand viruses); Picornavirales, Dicistroviridae in rod Apavirus. V virusni klasifikaciji (po ICTV taksonomiji) namreč CWV še vedno vodijo kot neklasificiran virus (niti kot DNA oz. RNA virus).

Analiza dvoverižnih RNA virusov (dsRNA viruses) je pokazala, da so prisotni tudi pri čebeli (*A. mellifera*), in sicer predstavnik družine Partitiviridae. Nekatere čebele (ne pa *A. mellifera*) imajo prisotne tudi viruse iz družine Reoviridae. V trenutno dostopnih transkriptomih in genomih čebel ne najdemo predstavnikov Totiviridae in Birnaviridae dsRNA virusov. Analiza enoverižnih RNA virusov z negativno polarno verigo je pokazala, da čebele teh virusov nimajo, čeprav smo jih našli pri mravljah (Bunyaviridae, Mononegavirales (družini Rhabdoviridae in Nyaminiviridae) ter osah (Orthomyxoviridae). Enoverižni RNA virusi z pozitivno polarno verigo so precej raznoliki pri kožokrilcih, saj najdemo pri njih kar 11 družin teh virusov. V genomu čebele listorezke (Megachile) smo našli precej endogeniziranih flavivirusov (družina Flaviviridae). Čeprav *A. mellifera* vsebuje le 3 družine ssRNA (+) virusov (Dicistroviridae, Iflaviridae in Lake Sinai/CBPV viruse) pa smo pri drugih čebeli našli predstavnike vsaj 6 družin ssRNA (+) virusov. Pri osah in mravljah pa smo našli predstavnike vsaj 8 oz. 6 družin ssRNA (+) virusov. Analiza RNA virusov pri kožokrilcih je pokazala, da imajo v celoti dokaj raznolik nabor RNA virusov, ki pa je manjši od repertoarja celotnih žuželk. Ugotovili smo, da so pri kožokrilcih RNA virusi bolj pogosti pri mravljah in osah. Čeprav imajo čebele (družina Apidae) še kar bogat nabor RNA virusov (sicer bistveno bolj reven od os in mravelj) pa pri čebeli *Apis mellifera* najdemo zelo omejen nabor RNA virusov, kjer prevladujejo pikornavirusi (Dicistroviridae in Iflaviridae). S pomočjo analize RNA virusov pri kožokrilcih smo pridobili več delnih in celotnih virusnih genomov, ki doslej še niso bili znani pri kožokrilcih.

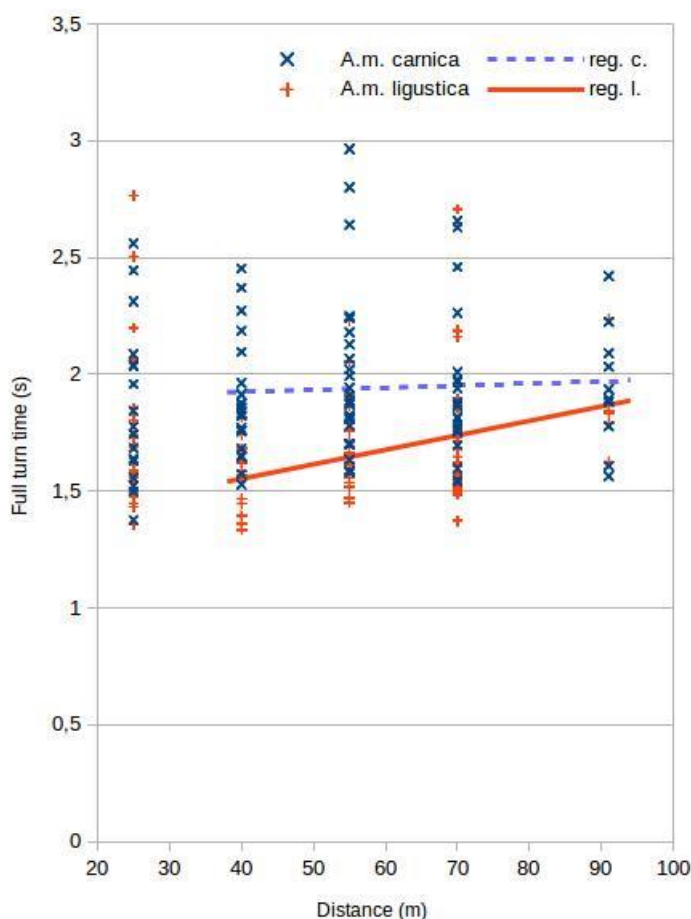
## V. Vedenjski poskusi

Pripravili smo poskus z opazovalnimi panji, da bi primerjali plese kranjske in italijanske čebele. Poskus je potekal na mejnem območju z italijansko čebelo. Uporabili smo 16 družin na dveh satih, po 4 domnevno izvora čisto kranjske čebel (matice iz osrednje Slovenije), 4

## Molekularni parametri za ohranjanje kranjske čebele

domnevno čiste italijanske (formirane iz družin v Italiji, ki so imeli italijanske matice), 4 naravno mešane (družine iz obmejnega območja s prisotnim večjim deležem čebel z rumeni obročki (vsaj 25%) in 4 umetno mešanih čebeljih družin iz čistih italijanskih in kranjskih družin. Sprav smo upali, da bomo umetno izvali drugo rojenje z matičniki, a je imela sezona prevelik vpliv. Tako smo v panjih opazovali čebelje plesne pašnih čebel in jih tudi posneli. Želeli smo sicer vse družine rekrutirati na umetno krmišče, a smo bili zaradi prisotnosti medenja in visoke vročine neuspešni. Vseeno smo posneli več 100 plesov, ki jih bomo uporabili za preverjanje morebitne segregacije čebel.

V našem poskusu smo skušali določiti regresijski koeficient za parameter plesa in oddaljenost od vira hrane. Ugotovili smo, da kranjska čebela naredi več polnih obratov kot italijanska, kar velja za srednje razdalje od vira hrane. Opažene razlike med italijanskimi in kranjskimi čebelami lahko odražajo modifikacijo nevrotansmitterjev v centralnem živčnem sistemu in tako vplivajo na plesno sporočanje.



Slika 9: odvisnost oblike plesa od genetskega ozadja pri kranjski čebeli (*A.m. carnica*) in italijanski čebeli (*A.m. ligustica*)

## **VII. Zaključek**

V projektu smo dosegli zastavljene raziskovalne cilje, ki so bili osredotočeni na genotipizacijo in analizo populacijskih podatkov za kranjsko čebelo v Sloveniji in sosednjih državah ter vzpostavitev baze vzorcev za detajlnejše analize kandidatnih genov in SNP markerjev. V tem sklopu še iščemo ustrezno varianto za genotipizacijo z večjim številom markerjev, ki pa trenutno še ni dosegljiva.

Vzpostavljena in preizkušena je proteomska metodologija za analizo matičnega mlečka, hemolimfe in čebeljega strupa, kar nam omogoča tekoče analize v zadnjem letu izvajanja projekta. Imamo že nekaj preliminarnih rezultatov, ki kažejo na razlike med čebelami iz različnih okolij. Zasnovali smo tudi vedenjske poskuse (rezultate še obdelujemo), pri katerih bomo v naslednjem letu skušali odpraviti nekaj slabosti, ki so se pojavile v letošnjem poskusu. Z vzpostavitvijo družin z znanim izvorom smo pripravili odličen material za proteomske, morfološke in genetske analize, s katerim bomo lahko preverili resolucijsko sposobnost naših metod in ugotovili kakšen delež v celotni variabilnosti teh lastnosti lahko pripišemo genetskim dejavnikom.

Vedenjske raziskave bodo osvetlile socialni aspekt pretoka genetskega materiala med populacijami in nam dale vpogled v specifično komuniciranje v posameznih populacijah. Bioinformacijske analize nam nakazujejo najbolj smiselno pot za nadaljevanje raziskav, hkrati pa nam omogočajo izkoriščanje javno dostopnih podatkov za namen naše študije.



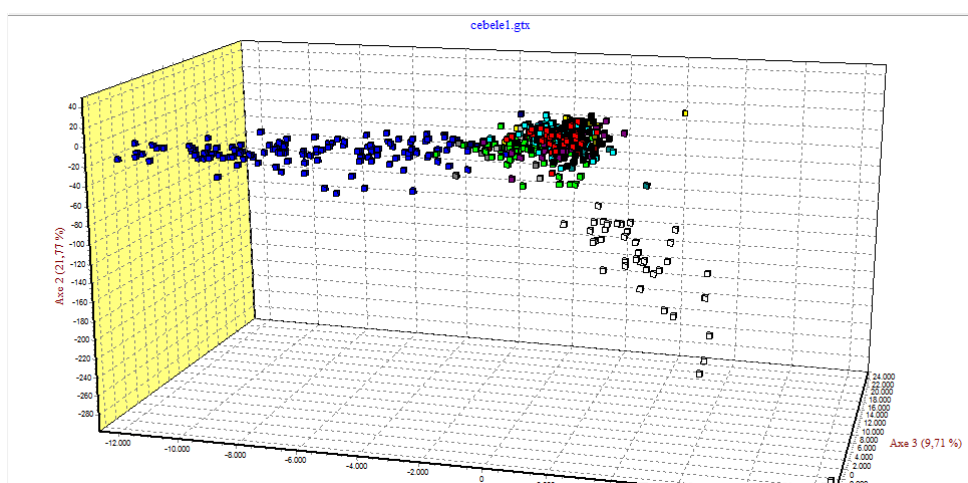
# VEDA: BIOTEHNIKA

Področje: 4.02.01 Živalska proizvodnja: genetika in selekcija

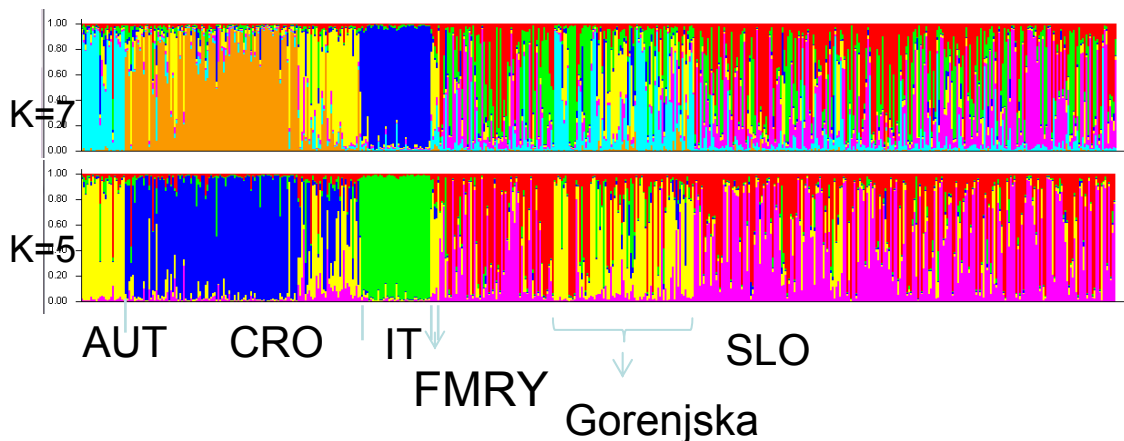
## Dosežek 1: Genetska struktura populacije kranjske čebele

Vir: BOŽIČ, Janko, KORDIŠ, Dušan, KRIŽAJ, Igor, LEONARDI, Adrijana, MOČNIK, Robert, NAKRST, Mitja, PODGORŠEK, Peter, PREŠERN, Janez, SUŠNIK BAJEC, Simona, ZORC, Minja, ZURC, Jelena, DOVČ, Peter. Novel aspects in characterisation of Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica*, Pollmann 1879). V: DOVČ, Peter (ur.). *Technology driven animal production*, 24th International Symposium Animal Science Days, Ptuj, September 21st-23rd, 2016, (Acta agriculturae slovenica, ISSN 1854-4800, Supplement, 2016

A



B



A: Diferenciacija populacij čebel na območju severno-zahodnega Balkana. Jasno se od osrednje gruče ločuje populacija na Hrvaškem (zgoraj levo) in v Italiji (spodaj desno)

B: STRUCTURE analiza 23 MS lokusov kaže relativno visoko stopnjo pestrosti v slovenski populaciji in relativno homogenost hrvaške in italijanske populacije. Opazna je introgresija avstrijskih linij v gorenjski populaciji