

OPREDELITEV POPULACIJ KRANJSKE ČEBELE (*Apis mellifera carnica* Pollman) NA OSNOVI ANALIZE MITOHONDRIJSKE DNK*

Peter KOZMUS^{a)}, Simona SUŠNIK^{b)}, Janez POKLUKAR^{c)} in Vladimir MEGLIČ^{b)}

^{a)} Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za zootehniko, Groblje 3, SI-1230 Domžale, Slovenija.

^{b)} Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, dr.

^{c)} Isti naslov kot ^{b)}, doc., dr.

Delo je prispelo 07. oktobra 2002, sprejeto 15. novembra 2002.

Received October 07, 2002, accepted November 15, 2002.

IZVLEČEK

Kranjska čebela (*Apis mellifera carnica* Pollman 1879) je glede na morfologijo uvrščena v jugovzhodno evropsko skupino čebel in je druga najbolj razširjena podvrsta čebel na svetu. Glede na morfologijo pa tudi glede na razlike v mitohondrijski DNK (mtDNK), so čebelje podvrste razdeljene v tri glavne filogenetske linije. Filogenetska linija C, kamor sodi tudi *A. m. carnica*, je genetsko slabše proučena, zato smo želeli okarakterizirati kranjsko čebelo na podlagi mtDNK. Pregledali smo 56 vzorcev čebel iz Slovenije in 55 vzorcev čebel iz Hrvaške, Češke in nekaterih selekcioniranih linij. Variabilno regijo med citokrom oksidazo I (COI) in citokrom oksidazo II (COII) v mtDNK smo pomnožili s polimerazno verižno reakcijo (PCR). Variabilnost nukleotidnega zaporedja smo proučevali z restrikcijsko analizo regije COI-COII in s sekvenciranjem nukleotidnega zaporedja med tRNK^{leu} in COII geni. Določili smo pet različnih haplotipov, od katerih vsi razen enega pripadajo filogenetski liniji C. Za kranjsko čebelo je bil značilen specifičen haplotip C2C. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da razen pri selekcioniranih linijah pri ostalih analiziranih populacijah ni prišlo do vnosa čebeljih matic drugih filogenetskih linij.

Ključne besede: čebela / kranjska čebela / *Apis mellifera carnica* / molekularna genetika / mitohondrijska DNK / COI-II. regija / Slovenija

CARNIOLAN BEE (*Apis mellifera carnica* Pollman) POPULATION DEFINITION AS BASED ON MITOCHONDRIAL DNA[†]

ABSTRACT

According to morphology, the carniolan bee (*Apis mellifera carnica* Pollman) is placed in South-Eastern European honey-bee group. All honey-bee subspecies are with regard to morphology and mtDNA variability divided into three main phylogenetic lineages. *A. m. carnica* and C phylogenetic lineage as a whole, is genetically poorly studied, therefore, carniolan bee has been characterised on the basis of mtDNA polymorphism. Fifty-six samples from Slovenia and 55 samples from other countries and selected lines were surveyed. Variable intergenic region between cytochrome-oxidase I (COI) and cytochrome-oxidase II (COII) in mtDNA was

* Prispevek je del diplomskega dela Petra Kozmusa 'Molekularna karakterizacija populacij kranjske čebele (*Apis mellifera carnica* Pollman) na osnovi analize mitohondrijske DNA', mentor doc. dr. Janez Poklukar, somentorica dr. Simona Sušnik.

[†] The article is a part of graduation thesis 'Molecular characterisation of carniolan bee population (*Apis mellifera carnica* Pollman) as based on mitochondrial DNA', issued by Peter Kozmus, supervisor ass.prof. Janez Poklukar, Ph.D., co-advisor Simona Sušnik, Ph.D.

amplified. Polymorphism search was based on RFLP profiles and sequence analysis of this region. Five different haplotypes were determined, four of them being of C phylogenetic lineage origin. According to the results we can conclude that except in some selected lines, all populations analysed, including Slovenian ones, were not affected by introduction of non-native queen honey-bees.

Key words: bees / Carniolan bee / *Apis mellifera carnica* / molecular genetics / mitochondrial DNA / COI-II. region / Slovenia

UVOD

Medonosna čebela *Apis mellifera* je prvotno naseljevala Afriko, Evropo in Bližnji ter Srednji vzhod. Med populacijami so se izoblikovale velike morfološke razlike zaradi raznolikosti okolja, ki so ga naseljevale. 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 (A), severno zahodnoevropsko (M) in jugo-vzhodnoevropsko (C) (pregl. 1).

Preglednica 1. Podvrste vrste *Apis mellifera*
Table 1. *Apis mellifera* subspecies

Centralno sredozemska in jugovzhodna evropska skupina (C)	Bližnjevzhodna skupina (O)	Zahodno sredozemska in severozahodno evropska skupina (M)	Afriška skupina (A)
<i>sicula</i>	<i>adami</i>	<i>iberica</i>	<i>adansonii</i>
<i>ligustica</i>	<i>anatoliaca</i>	<i>intermissa</i>	<i>capensis</i>
<i>cecropia</i>	<i>armeniaca</i>	<i>mellifera</i>	<i>lamarckii</i>
<i>macedonica</i>	<i>caucasica</i>	<i>sahariensis</i>	<i>litorea</i>
<i>carnica</i>	<i>cypria</i>		<i>monticola</i>
	<i>meda</i>		<i>scuteliata</i>
	<i>syriaca</i>		<i>unicolor</i>
			<i>yemeniticia</i>

Poleg prej omenjenih treh filogenetskih linij čebel Arias in Sheppard (1996), Franck in sod. (2000b) ter Palmer in sod. (2000) opisujejo tudi linijo O, ki naj bi bila prisotna na Bližnjem in Srednjem vzhodu in vključuje podvrste *A. m. syriaca*, *A. m. caucasica*, *A. m. armeniaca*, *A. m. meda*, *A. m. cypria* in *A. m. adami*. Poleg linij A, C, M in O se po navedbah Francka in sod. (2001) pojavlja tudi linija Y, ki se razprostira na območju Etiopije, vendar o njej še ni veliko znanega.

Kranjska čebela

Kranjsko čebelo oz. kranjsko sivko (*Apis mellifera carnica* Pollman 1879) uvrščamo v jugovzhodno-evropsko skupino čebel. Je druga najbolj razširjena podvrsta čebel na svetu takoj za italijansko čebelo *A. m. ligustica*. Njeno izvorno območje so predeli severno in južno od Karavank, na obeh straneh meje med Avstrijo in Slovenijo (Ruttner, 1988). Podvrsta se je oblikovala po koncu zadnje ledene dobe, pred približno 10.000 leti. Celotna populacija kranjske čebele je razdeljena na tri večje skupine:

- alpsko (Slovenija, Avstrija, Slovaška),
- panonsko (Podonavje) in
- mediteransko (Hrvaška, Bosna in Hercegovina, Zvezna republika Jugoslavija; Ruttner in Hänel, 1992).

A. m. carnica je čebela z izrazito dolgim rilčkom. V primerjavi z drugimi čebeljimi podvrstami je precej temna, ima rjavkaste dlačice na oprsju. Zadkovi obročki so usnjeno rjave barve z včasih nakazanimi svetlejšimi pegami na prvem in drugem obročku. Glavna odlika kranjske čebele je njena mirnost. Poleg tega se odlikuje tudi po delavnosti, dolgoživosti, izkoriščanju paše, dobrem prezimovanju in navsezadnje po skromni porabi zimske zaloge hrane. V primerjavi z drugimi podvrstami zelo dobro izkoristi pelodno pašo (Ruttner, 1988). Zaradi svojih lastnosti je kranjska čebela med čebelarji zelo priljubljena in velikokrat uporabljena pri selekcioniranju novih linij čebel.

Mitohondrijska DNK

Kot zelo primerna za opredelitev pasem in populacij čebel se je izkazala variabilna regija med genoma za citokrom oksidazo I (COI) in citokrom oksidazo II (COII) v mtDNK (Cornuet in Garnery, 1991). Ta regija vsebuje gen za tRNK^{leu} in nekodirajoča zaporedja. Dolžina regije variira od 200 bp do 1.000 bp in vsebuje dve kombinaciji sekvenc, P (P: 54 oz. Po: 67 bp) in Q (194–196 bp) (Cornuet in Garnery, 1991; Cornuet in sod., 1991). Na odseku med genoma COI in COII je opisanih devet kombinacij sekvenc P in Q: Q, PQ, PQQ, PQQQ, PQQQQ, PoQ, PoQQ, PoQQQ in PoQQQQ. Ena sama kopija odseka Q brez odseka P, je značilna za mtDNK čebel iz filogenetske linije C, kamor uvrščamo tudi kranjsko čebelo (Garnery in sod., 1993; Cornuet in sod., 1991). Poleg razlik v dolžini regije se haplotipi razlikujejo tudi v nukleotidnem zaporedju. Garnery s sod. (1993) je razvil hiter test za določevanje haplotipov regije COI-COII pri čebelah. Test vključuje PCR metodo in restrikcijsko analizo z encimom *DraI*, ki prepozna nukleotidno zaporedje in na točno določenem mestu, kjer verigo nukleotidov tudi prereže. Na ta način dobimo različno dolge odseke nukleotidnih zaporedij. Njihove dolžine lahko določimo s pomočjo elektroforeze in na ta način identificiramo večino znanih haplotipov. Pri nekaterih haplotipih so dolžine razrezanih fragmentov zelo podobne, zato moramo s pomočjo sekvenčne analize regij določiti natančno nukleotidno zaporedje.

Na osnovi analize mtDNK je mogoče podvrste *Apis mellifera* razvrstiti v 3 različne skupine mtDNK haplotipov, ki se ujemajo z glavnimi filogenetskimi linijami čebel (Garnery in sod., 1992; Smith, 1991). Znotraj filogenetske linije A so odkrili kar 23 mtDNK haplotipov, v liniji M 10 in liniji C dva haplotipa (haplotip C1 naj bi bil značilen za italijansko čebelo *A. m. ligustica*, C2 haplotip pa za makedonsko čebelo *A. m. macedonica*), linijo O sestavlja pet in linijo Y dva haplotipa (Franck in sod., 2001; pregl. 1;). Kranjsko čebelo po morfoloških lastnostih uvrščajo v filogenetsko linijo C medonosne čebele, ki pa je molekularno slabše proučena. Za filogenetske raziskave *A. mellifera* se je uveljavilo proučevanje variabilne regije COI-COII v mtDNK. Za haplotipe filogenetske linije C je značilno, da se ne razlikujejo v dolžini te regije, saj le-ta vsebuje le en Q odsek, nima pa P ali Po odseka. Zaradi te značilnosti dolžina regije variira le na manjšem številu nukleotidnih mest in jih zato med sabo ne moremo ločiti na podlagi analize RFLP. Za določanje posameznih haplotipov znotraj C filogenetske linije je torej potrebna sekvenčna analiza.

Mitohondrijska DNK se deduje maternalno in je primerna za genetske študije čebel predvsem zaradi dveh razlogov:

- vse čebele v panju so potomke ene matice, zato je njihova mtDNK enaka. Iz enega panja torej ni potrebno analizirati več kot en vzorec. Če matica umre ali odide z rojem, čebele delavke vzredijo novo matico, ki zopet nosi identično mtDNK.
- v kolonizacijskem procesu so matice igrale odločilno vlogo, ker so se na nova ozemlja širile z rojenjem in ne s troti (Garnery in sod., 1992). To nam omogoča spremljanje čebelje populacije v svetovnem merilu.

Želeli smo proučiti genetsko strukturo populacije kranjske čebele *A. m. carnica* v Sloveniji na osnovi polimorfizma v regiji citokrom oksidaza I (COI)-citokrom oksidaza II (COII) v

mitohondrijski DNK (mtDNK). Območje Slovenije je namreč izvorno območje *podvrste* *A. m. carnica*, ki pa se je v svoji prvotni obliki ali kot selekcionirana linija razširila po celem svetu.

V raziskavo smo poleg vzorcev čebel iz Slovenije vključili tudi vzorce drugih populacij *A. m. carnica*, nekaterih selekcioniranih linij kranjske čebele in populacijo *A. m. macedonica* iz Grčije.

MATERIAL IN METODE

Material

V raziskavo smo vključili 56 vzorcev čebel iz Slovenije (pregl. 2). Za primerjavo in razvrstitev so nam služili vzorci s Hrvaške, Grčije, Češke, ter selekcionirane linije kranjske čebele iz Poljske, Avstrije, Nemčije in Francije (pregl. 2). Na vseh vzorcih smo opravili restriksijsko analizo regije COI-COII v mtDNK, v sekvenčno analizo pa smo vključili manjše število vzorcev iz vsake skupine (pregl. 2). Vzorci so bili zbrani v letu 2001 in so bili do pričetka analize shranjeni na temperaturi -80°C oz. v 96 % etanolu.

Metode

Izolacija DNK iz čebel

DNK smo izolirali po modificirani metodi Beye in Raeder (1993). Celoten postopek (razen lize celic ob dodatku encima RN-aza) je potekal pri sobni temperaturi. Čebelam smo odstranili zadek in jih s pomočjo tekočega dušika zdrobili v terilnici. Homogenizatu smo dodali 800 μl pufra (100 mM Tris-HCl, pH = 8,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 1 % SDS) in vse skupaj predstavili v 1,5 ml reagenčne posodice in dodali 0,7 μl RN-aze (500 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Boehringer Mannheim). Suspenzijo smo inkubirali 20 minut na 37°C . Proteine in nerazgrajeno tkivo smo odstranili s fenol-kloroformsko ekstrakcijo. DNK je precipitirala ob dodatku alkohola izopropanola. Po 5 min centrifugiranju na maksimalni hitrosti smo DNK sprali s 70 % etanolom. Etanol smo odpipetirali, oborino (DNK) pa 10 minut sušili na zraku in raztopili v 25 μl bidestilirane vode.

Verižna reakcija s polimerazo

Za pomnoževanje regije COI-COII v mtDNK čebel smo uporabljali naslednja začetna oligonukleotida, opisana v Garnery in sod. (1991).

E2: 5'- GGCAGAATAAGTGCATTG-3'

H2: 5'- CAATATCATTGATGACC- 3'

V 200 μl reagenčnih posodicah smo pripravili reakcijsko mešanico s končnim volumnom 20 μl , ki je vsebovala 100 ng DNK, 1 μM vsakega od začetnih oligonukleotidov, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl_2 , 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,5 enote Taq polimeraze (PE Applied Biosystems) in bidestilirano vodo do končnega volumna. Pomnoževanje odsekov mtDNK smo izvedli v cikličnem termostatu Gene Amp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems). Časovno – temperaturni program je bil sestavljen iz začetne denaturacije DNK pri 94°C 5 min, sledilo je 30 ciklov z denaturacijo pri 94°C 45seks, prileganjem pri 57°C 30sek in sintezo pri 72°C 60 sekund. Na koncu smo dodali še podaljšano polimerizacijo pri 72°C 5min.

Analiza regije COI-COII z RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Namnožene fragmente Regije COI-COII smo cepili z restriksijskim encimom *DraI*. V sterilnih 500 μl reagenčnih posodicah smo pripravili 15 μl restriksijske reakcije, ki so vsebovale

0,5 μl restrikcijskega encima *DraI* (10enot μl^{-1} , Gibco), 1,5 μl ustreznega $10\times$ reakcijskega pufra, 10,0 μl PCR produkta (regija COI-COII) in 3,0 μl H_2O . Vzorce smo 3 ure inkubirali pri 37 °C v vodnem inkubatorju. Po končani inkubaciji smo vzorce in velikostni standard nanesli na 2 % agarozni gel.

Preglednica 2. Lokacije vzorčenja in število analiziranih vzorcev na posamezno lokacijo (1 – število vzorcev vključenih v analizo RFLP; 2 – število vzorcev z določenim nukleotidnim zaporedjem)

Table 2. Sampling locations and the number of analysed honeybees (1 – number of samples analysed with RFLP; 2 – number of sequenced samples)

Podvrsta / Subspecies	Lokacija vzorčenja Sampling locations	Št. vzorcev-1 No. of samples-1	Št. vzorcev-2 No. of samples-2
<i>A. m. carnica</i>	Slovenija	56	6
	Prekmurje	6	
	Štajerska	14	
	Dolejska	8	
	Koroška	3	
	Notranjska	11	
	Gorenjska	5	
	Primorska	9	
<i>A. m. carnica</i>	Hrvaška	10	2
<i>A. m. macedonica</i>	Grčija	10	2
<i>A. m. carnica</i>	Češka	9	4
Selekcionirane linije kranjske čebele	Hohen Neuendorf (Nemčija)	5	2
	Buckfast J (Nemčija)	5	3
	Polen (Poljska)	5	3
	K 111 (Avstrija)	5	2
	Toulouse (Francija)	5	2

Določanje nukleotidnega zaporedja regije COI-COII

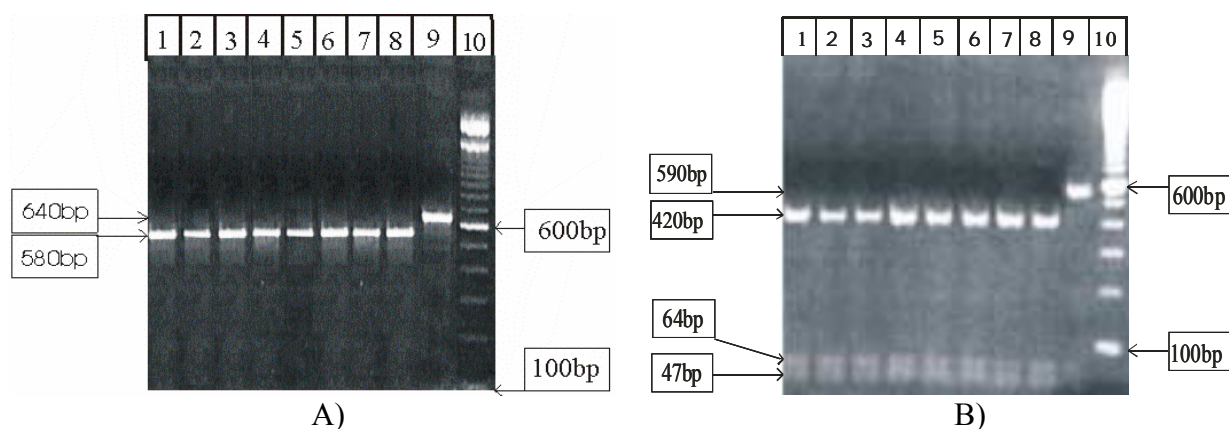
Za določitev nukleotidnega zaporedja smo najprej s komercialnim kitom (High Pure PCR Product Purification Kit; Roche) izolirali produkt PCR (regija COI-COII) iz agaroznega gela. Petnajst μl sekvenčne reakcije smo pripravili z BigDye Terminator Ready Reaction Mix (PE Applied Biosystems) po navodilih proizvajalca. Za sekvenciranje 3'-konca smo uporabljali začetni oligonukleotid E2, za sekvenciranje 5'-konca pa H2. Sekvenčna reakcija je tekla v cikličnem termostatu GeneAmp PCR sistemu 9700 (PE Applied Biosystems). Po sekvenčni reakciji smo s precipitacijo z natrijevim acetatom in etanolom odstranili neuporabljene fluorescenčno označene dideoksinukleotide in začetne oligonukleotide. Očiščenim produktom sekvenčne reakcije smo dodali 12 μl TSR (Template Supression Reagent, PE Applied Biosystems). Pred analizo sekvenc smo vzorce denaturirali 2 min na 94 °C in ohladili na ledu. Za določitev nukleotidnega zaporedja v regiji COI-COII smo uporabili sekvenator ABI PRISM 310 (PE Applied Biosystems). Uporabili smo 47 cm dolgo kapilaro in računalniški program Sequencing Analysis Software 3.0 (PE Applied Biosystems).

Nukleotidna zaporedja regije COI-COII smo primerjali z zaporedji vseh do sedaj opisanih haplotipov pri čebeli (Franck in sod., 2001). Za poravnavo sekvenc in ugotavljanje polimorfnihih mest smo uporabljali računalniški program Clustal X (Verzija 1.8; Thompson in sod., 1997). Sorodnosti med haplotipi smo predstavili na osnovi metode največje zanesljivosti ("Maximum Likelihood") z računalniškim programom TREE-PUZZLE 4.0 (Strimmer in Haesler, 1996). Program TREE-PUZZLE uporablja poenostavljen, sorazmerno hiter algoritem iskanja najboljših

filogenetskih dreves na osnovi sestavljanja kvartetov. Podpora notranjim vejitvam v drevesu temelji na 1.000 ponovitvah. Za grafično predstavitev topologije drevesa pa smo uporabili program TREEVIEW (Page, 1996).

REZULTATI

Polimerazna verižna reakcija je potekala specifično, brez pomnoževanja nespecifičnih regij (slika 1). Glede na velikostni standard (100 bp Gibco) smo ocenili velikost pomnožene regije na 580 in 640 bp (slika 1). Na podlagi dobljenih rezultatov smo sklepali, da vzorci čebel iz selekcionirane linije iz Francije sodijo v filogenetsko linijo A, vsi ostali pa v linijo C.



Slika 1. A) Pomnožene regije, B) restrikcijski fragmenti COI-COII v mtDNK na 1 % agaroznem gelu. Proga 10 je 100 bp velikostni standard, proge od 1–9 so pomnoženi odseki regij COI-COII. (Proga 1 je vzorec iz Slovenije, proga 2 s Hrvaške, proga 3 iz Grčije, proga 4 s Češke, progi 5 in 6 sta vzorca iz selekcionirane linije iz Nemčije, proga 7 s Poljske, proga 8 iz Avstrije in proga 9 vzorec iz selekcionirane linije iz Francije.)

Figure 1. A) Amplification products, B) restriction fragments of mtDNA COI-COII region, separated on 1 % agarose gel. Line 10 is 100bp size standard, lines 1–9 are amplified regions of COI-COII (samples from 1 – Slovenia, 2 – Croatia, 3 – Greece, 4 – Czech republic, 5,6 – selected lines from Germany, 7 – Polen, 8 – Toulouse).

Na osnovi restrikcijske analize fragmentov regije COI-COII in znanih velikosti restrikcijskih fragmentov (Franck in sod., 2001; pregl. 3) smo lahko z gotovostjo sklepali, da vsi vzorci čebel, razen vzorcev iz Francije, sodijo v filogenetsko linijo C. Za vzorce čebel iz Francije smo na podlagi restrikcijske analize sklepali, da sodijo v filogenetsko linijo A. Rezultati restrikcijske analize so vidni na sliki 1 in v preglednici 2.

Na osnovi sekvenčne analize smo pri vzorcih, ki so odražali filogenetsko linijo C, odkrili 5 že znanih polimorfnih mest, ki so označena na sliki 2 in opisana v preglednici 4.

Pri vzorcih čebel iz selekcionirane linije Toulouse smo odkrili še druge razlike v zaporedju nukleotidov (5 substitucij ter 67, 17 in en nukleotid dolge delecije). Na podlagi le-teh smo vzorce teh čebel uvrstili v filogenetsko linijo A in haplotip A8, vsi ostali vzorci čebel so kazali značilnosti skupine mtDNA haplotipov C. Na osnovi opisanih haplotipov (Franck in sod., 2000) in sestavi nukleotidov na teh polimorfnihih mestih smo vzorce razvrstili v posamezne haplotipe. Odkrili smo 2 haplotipa, ki še nista bila opisana in poimenovana (pregl. 4). Zaradi insercije citozina (označenem v tabeli s številko 1), in na podlagi že opisanih in poimenovanih nukleotidov, smo novo odkrita haplotipa označili s C2C in C2D.

Preglednica 3. Rezultati restrikcijske analize
Table 3. Results of RFLP analysis

Območje vzorčenja oz. selekcionirana linija čebel Location, selected line	Dolžine fragmentov (bp) Fragment length	mtDNK linija in haplotip mtDNA lineage and haplotype
Slovenija, Hrvaška, Grčija, Češka, Hohen Neuendorf, Buckfast J, K 111	40* ali 41*, 47*, 64, 420	C (C1 ali C2)
Toulouse	47,592	A (A8)

* = fragmentov dolžine 40, 41 in 47 bp na gelu nismo ločili. Velikosti fragmentov so navedeni kot v literaturi (Cornuet in Garnery, 1991)

---- tRNA ^{leu} ----		1	-----Q1--		
GTATTTTAA	ACTTTTATTA	AAATT <u>CCCC</u>	ACTTAATTCA	TATTAATTTA	50
	2				
AAAATAAATT	AATAA <u>CA</u> AATT	TTTAATAAAA	TAAATAATTA	ATTTTATTTT	100
-----Q2----	3				
TATATTGAAT	TT <u>T</u> AAATTC	ATCTTAAAGA	TTTAATCTTT	TTATTAAAAT	150
-		---	Q3 ---		
TAATAAATTA	ATATAAAATA	AAACAAAATA	TAACAGAATA	TATTTATAAT	200
	5' COII----	4			
AATTTAATTT	ATTAATAATTT	CCACATGATT	<u>T</u> TATATTATA	TTCAAGAAT	250
CAAATTCATA	TTATGCTGAT	AATTTAATTT	CATTCATAA	TATAGTTATA	300
ATAATTATTA	TTATAATTT	AACATTAAC	GTATATATTA	TTTGTAGATT	350
	5				
TTTATAACA	AAT <u>T</u> CTCAA	TTTATTTT	TTAAAAATC	ATAATATTGA	400
AATTATTGA	ACAATTATTC	CAATTATTAT	TCTATTAATT	ATTGTTTTTC	450
--COII 3'					
CATCATTA	AATTTTATAT	TTAATTGATG	AAATTGTA		488

Slika 2. Sekvenca nukleotidnega zaporedja haplotipa C1 odseka regije COI-COII v mtDNK, z označenimi posameznimi odseki. Polimorfna mesta so označena s številkami od 1 do 5 in s poudarjenimi in podčrtanimi črkami.

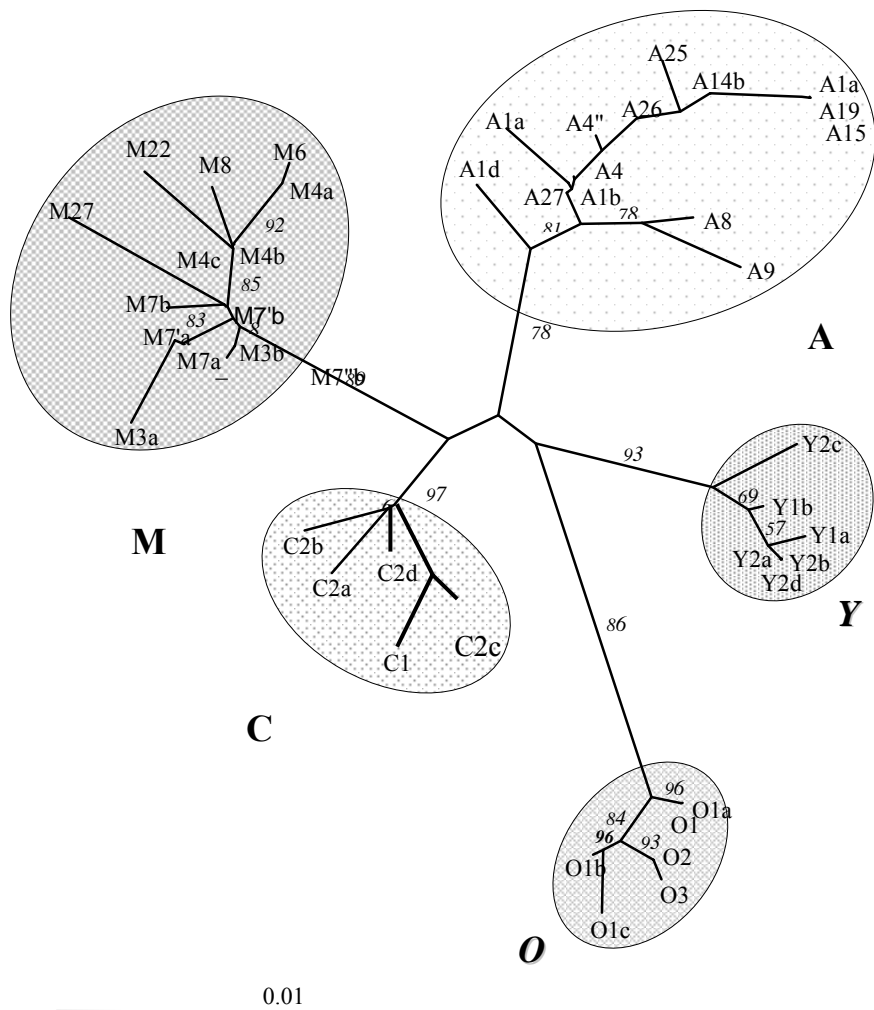
Figure 2. Nucleotide sequence of mtDNK COI-COII region of haplotype C1. Variable sites are indicated with numbers 1–5, and underlined.

Preglednica 4. Nukleotidi na polimorfnih mestih od 1 do 5. ("-" pomeni delecijo nukleotida)
Table 4. Variable nucleotides on positions 1–5 («-» indicates a deletion)

	Oznaka haplotipa Haplotype designation	Polimorfno mest Polymorphic nucleotides				
		1	2	3	4	5
Znani haplotipi filogenetske linije C (Franck s sod, 2001; J.-M. Cornuet, pers. com.)	C1	CCCC	C	T	T	C
	C2A	CCC-	A	T	C	T
	C2B	CCC-	C	A	C	T
	Haplotipi, določeni v pričujoči raziskavi					
<i>A. m. carnica</i> (Slo, Cro), "Polen", „Hohen Neuendorf“	C2C	CCC-	C	T	T	C
<i>A. m. macedonica</i> ; "Buckfast J"	C2D	CCC-	C	T	C	T
"K 111"	C1	CCCC	C	T	T	C

Za vzorce čebel iz Slovenije, Hrvaške in Poljske je značilen le en mtDNK haplotip, ki smo ga poimenovali C2C (pregl. 4). Haplotip C2C, ki se od objavljenega haplotipa C1 razlikuje le v deleciji enega nukleotida na odseku regije COI-COII, smo določili tudi pri vzorcih čebel iz Berlina (Nemčija) in nekaterih vzorcih s Češke. Haplotip, ki se je pojavljal pri vzorcih čebel iz Grčije in pri selekcionirani liniji Buckfast iz Nemčije, smo poimenovali C2D. Ta haplotip se od prejšnjega (C2C) razlikuje v zaporedju dveh nukleotidov. Že objavljen C1 haplotip je bil najden pri vzorcih čebel iz Avstrije in pri ostalih vzorcih čebel s Češke (pregl. 4).

Na sliki 3 so prikazani filogenetski odnosi med posameznimi haplotipi vseh filogenetskih linij čebel, z že vključenima novima haplotipoma (C2C in C2D).



Slika 3. Drevo prikazuje filogenetske odnose med 44 haplotipi regije COI-COII pri čebelah (*Apis mellifera*), predstavljene z metodo največje zanesljivosti (program PUZZLE). Številke ob vejitvah predstavljajo odstotne vrednosti pojavljanja vejitve.

Figure 3. Phylogenetic relationships among 44 haplotypes of COI-COII region in honeybees (*Apis mellifera*). Maximum likelihood method in PUZZLE program was used for tree construction.

RAZPRAVA IN SKLEPI

Na podlagi analize RFLP smo v naši raziskavi za vse vzorce čebel, razen za vzorce iz Francije, ugotovili, da sodijo v filogenetsko linijo C. Vzorci čebel iz Francije pa so pokazali

značilnosti filogenetske linije A. Ker z analizo RFLP nismo mogli razlikovati med haplotipi znotraj filogenetske linije C, smo regiji COI-COII določili tudi nukleotidno zaporedje. Na podlagi sekvenčne analize smo našli pet polimorfnih mest, s katerimi smo lahko haplotipe filogenetske linije C ločili med sabo. Na teh polimorfnih mestih so se pojavile štiri substitucije in ena delecija. Poskus je bil naravnan predvsem na populacijo čebel iz Slovenije, ker smo želeli okarakterizirati populacijo kranjske čebele na tem področju. Od tu je bilo zato največ analiziranih vzorcev čebel. Od že znanega C1 haplotipa se dobljeno nukleotidno zaporedje, značilno za kranjsko čebelo, razlikuje v deleciji oz. inserciji enega nukleotida. Nov haplotip smo poimenovali C2C. Na podlagi te delecije/insercije je možno ločiti italijansko čebelo *A. m. ligustica* od kranjske čebele. Populacija kranjske čebele v Sloveniji se je izkazala kot zelo homogena, saj med vzorci nismo odkrili nobene variabilnosti v proučevanem odseku mtDNK. Na podlagi teh rezultatov lahko domnevamo, da je kranjska čebela na območju Slovenije obdržala svojo avtohtonost in čistost.

Do enakih rezultatov sekvenčne analize smo prišli pri vzorcih čebel s Hrvaške in s Poljske. Haplotip C2C se je pojavljal v vseh vzorcih čebel iz teh držav. Čebele iz Hrvaške in iz selekcionirane linije s Poljske lahko torej glede na mtDNK uvrstimo med čisto podvrsto kranjske čebele. Tudi pri vzorcih čebel s Češke in iz Nemčije smo zasledili haplotip C2C, ki pa ni bil edini haplotip, značilen za te linije čebel. Pri vzorcih čebel s Češke se je poleg haplotipa C2C pojavljal še haplotip C1, ki je bil opisan pri italijanski čebeli (Franck in sod., 2001). V tej državi selekcionirana linija kranjske čebele torej ni več čista. Češki čebelarji čebelarijo povečini s kranjsko čebelo avstrijskega in slovenskega izvora in z deželno čebelo, ki je vmesna oblika med kranjsko čebelo in avtohtono temno čebelo. Zaradi teh ugotovitev lahko razlagamo prisotnost dveh haplotipov v tej državi. V tej državi imajo tudi inštitut, ki skrbi za čistost kranjske čebele na Češkem (Poklukar, 1999; Sheppard in McPherson, 1986).

Pri vzorcih čebel iz Nemčije se je poleg haplotipa C2C pojavljal še haplotip C2D. Tudi pri tej filogenetski liniji čebel je torej še viden vpliv kranjske čebele, pri selekcioniranju pa je verjetno prišlo tudi do križanja z drugimi linijami. Nekateri slovenski trgovci so v obdobju velike trgovine s čebelami v Nemčijo prodali več družin kranjske čebele, zato je ta podvrsta čebel danes prisotna na tem območju (Zaletel, 1998), kjer je sicer značilna podvrsta *A. m. mellifera*. Znano je, da so nemški čebelarji veliko eksperimentirali s podvrstami čebel in so jih zato tudi precej uvozili. Zaradi tega je danes njihova populacija čebel sestavljena iz več pasem.

Pri vzorcih čebel iz Avstrije smo našli že opisan haplotip C1. Značilen je za italijansko čebelo *A. m. ligustica*. Ta haplotip je razširjen na območju celotne Italije in v manjšem delu južne Avstrije (Franck in sod., 1998). Dobljen rezultat se torej sklada s prejšnjimi ugotovitvami, lahko pa je tudi pobuda za obširnejšo raziskavo pasem čebel v tej državi. Zanimivo bi bilo ugotoviti, kje v Avstriji je meja med haplotipoma C1 in C2C, torej med podvrstama *A. m. ligustica* in *A. m. carnica*. Poklukar (1999) opisuje, da češki čebelarji čebelarijo tudi s kranjsko čebelo avstrijskega porekla, kar lahko razloži prisotnost C1 haplotipa na Češkem.

Haplotip, ki se je pojavil pri vzorcih čebel iz Grčije in pri nekaterih vzorcih iz Nemčije, smo poimenovali s C2D. Za ta haplotip sklepamo, da je značilen za podvrsto čebel *A. m. macedonica*, ker se je pojavljal homogeno pri vseh vzorcih čebel iz Grčije. Franck in sod. (2001) navajajo, da je za *A. m. macedonica* značilen haplotip C2, ki se od C2D haplotipa razlikuje v substituciji enega nukleotida. Tudi pri nekaterih vzorcih čebel selekcionirane linije iz Nemčije se je pojavil haplotip C2D. Iz tega lahko sklepamo, da so nemški čebelarji uvažali tudi čebele te podvrste, in jo križali s kranjsko čebelo. Ta rezultat in prisotnost več haplotipov filogenetske linije C pri selekcioniranih linijah čebel v Nemčiji, je lahko pobuda za obširnejšo raziskavo o pasmah čebel v Nemčiji.

Prisotnost haplotipa A8 pri vzorcih selekcionirane linije čebel iz Francije je presenetljiva. Ta haplotip je značilen za filogenetsko linijo A v Afriki. Franck in sod. (1998) opisujejo, da je haplotip A8 prisoten tudi v Evropi, zlasti na Pirenejskem polotoku. Ta vzorec čebel iz Francije je

iz selekcionirane linije, za katero ne vemo točnega porekla, zato lahko iz dobljenih rezultatov sklepamo, da so pri oblikovanju te linije sodelovale matice afriškega izvora.

Glede na rezultate molekularne analize lahko zaključimo, da je slovenska populacija kranjske čebele čista in da še vedno predstavlja enega glavnih virov izvirnega genetskega materiala kranjske čebele. Prizadevanja za ohranitev kranjske čebele v Sloveniji že potekajo in bodo prispevala k ohranjanju lokalne populacije čebele in njene prvotne genetske sestave.

SUMMARY

Apis mellifera is a highly polytypic species. Based on morphometrics, 24 recognised subspecies in the Old World can be grouped in three evolutionary lineages. Carniolan honey bee, *Apis mellifera carnica* Pollmann, is one of the subspecies of the C phylogenetic lineage (group of north Mediterranean subspecies). It is native to Slovenia, former Yugoslavia region, Austria south of the Alps, and parts of Hungary, Rumania, and Bulgaria.

Populations of Carniolan bee (*Apis mellifera carnica*) from Slovenia were analysed in this study. Fifty-six samples from Slovenia and 55 samples from other countries or selected lines (Croatia, Greece, Czech Republic, selected lines from Germany, Austria, Poland and France), all collected in 2001, were surveyed. Phenol extraction and iso-propranol precipitation was used for DNA isolation. Variable intergenic region between cytochrome-oxidase I (COI) and cytochrome-oxidase II (COII) in mtDNA was amplified. Polymorphism search was based on RFLP profiles and sequence analysis of the region. Except for the samples from the selected line "Toulouse", characterised with haplotype A8, all other determined sequences were of the C phylogenetic lineage, differing in only five already known polymorphic sites. Nevertheless, all haplotypes could not be defined according to already published ones. The haplotypes found in *A. m. carnica* are characterised with newly found haplotype, designated as C2C and differing from already described haplotype C1 in deletion of one nucleotide. Both haplotypes were found in the Czech population. Samples of the *A. m. macedonica* subspecies were found to be monomorphic for haplotype C2D.

VIRI

- Arias, M.C./ Sheppard, W.S. Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA sequence. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 5(1996), 557–566.
- Beye, M./ Raeder, U. Rapid DNA Preparation from bees and %GC fractionation. *Biotechniques*, 14(1993), 372–374.
- Cornuet, J./ Garnery, L. Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications. *Apidologie*, 22(1991), 627–642.
- Cornuet, J./ Garnery, L./ Solignac, M. Putative origin and function of the COI-COII intergenic region of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA. *Genetics*, 128(1991), 393–403.
- Franck, P./ Garnery, L./ Loiseau, A./ Oldroyd, P./ Helburn, H.R./ Solignac, M./ Cornuet, J.M. Genetic diversity of the honeybee in Africa: Microsatellite and mitochondrial data. *Heredity*, 86(2001), 420–430.
- Franck, P./ Garnery, L./ Solignac, M./ Cornuet, J.M. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East: Taxonomy and evolutionary biology of the honeybees. *Apidologie*, 31(2000b), 167–180.
- Franck, P./ Garnery, L./ Solignac, M./ Cornuet, J.M. The origin of West European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data. *Evolution*, 52(1998), 1119–1134.
- Garnery, L./ Cornuet, J.M./ Solignac, M. Evolutionary history of the honey bee *Apis mellifera* inferred from mitochondrial DNA analysis. *Molecular ecology*, 1(1992), 145–154.
- Page, R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12(1996), 357–358.
- Palmer, M.R./ Smith, D.R./ Kaftanoglu, O. Turkish honeybees: genetic variation and evidence for a fourth lineage of *Apis mellifera* mtDNA. *The Journal of Heredity*, 91(2000), 42–46.
- Poklukar, J. Kranjska čebela je osvojila Češko. *Slovenski čebelar*, 10(1999), 277–278.
- Ruttner, F. *Biogeography and taxonomy of honeybees*. Berlin, Springer-Verlag, 1988, 251–257.

- Ruttner, F./ Tassencourt, L./ Louveau, J. Biometrical – statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera*. *Apidologie*, 9(1978), 363–381.
- Shepard, W.S./ McPherson, A. Genetic variation in honey bees from an area of racial hybridization in western Czechoslovakia. *Apidologie*, 17(1986), 21–31.
- Smith, D.R./ Palopoli, M.F./ Taylor, B.R./ Garnery, L./ Cornuet, J.M./ Solignac, M./ Brown, M. Geographical overlap of two mitochondrial genomes in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*). *Journal of Heredity*, 82(1991), 96–100.
- Strimmer, K./ A. von Haeseler. Quartet puzzling: A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular biology evolution*, 13(1996), 964–969.
- Thompson, J.D./ Gibson, T.J./ Plewniak, F./ Jeanmougin, F./ Higgins, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24(1997), 4876–4882.
- Zaletel, P. Zgodovina slovenskega čebelarstva in čebelarske organizacije. *Slovenski čebelar*, 12(1998), 317–337.