

IZOLACIJA DEDNINE IZ NEINVAZIVNIH BIOLOŠKIH VIROV PRI MATICAH KRANJSKE ČEBELE (*Apis mellifera carnica*)

MOŠKRIČ A.¹, MOLE K.², DOVČ P.³, PREŠERN J.¹

Izvleček

Tudi v vzreji in selekciji čebel se postopoma razvijajo metode, ki vključujejo genotipizacijo in uporabo MAS (marker assisted selection = na markerje oprta selekcija). Za uspešno genotipizacijo je ključna zagotovitev zadostne količine DNA primerne čistosti in kakovosti iz informativnega biološkega vzorca. Neinvaziven odvzem bioloških vzorcev za izolacijo dednine matic je posebno atraktiven metodološki izziv. Ta omogoča pridobitev informacije o genotipu osebkov brez žrtvovanja osebkov in nimajo vpliva na dolgoživost. Kutikula žuželk je ekstracelularnega izvora in sama ne vsebuje celic, vendar pa posamezne epiteljske celice ob levitvi ostanejo pritrjene nanjo. Te celice predstavljajo potencialno uporaben vir dednine za nadaljnje študije. Levi bub matic dostopen neinvazivni vir dednega materiala. Predstavili bomo prve rezultate uspešnosti in primernosti izbranih metod za izolacijo DNA iz levov bub matic kot neinvazivnega vira biološkega materiala pri kranjski čebeli. Uspešna izolacija DNA iz levov bub matic omogoča genotipizacijo matic še pred parjenjem ter odbiro tistih matic, ki so nosilke genotipov, ki nas zanimajo. Razvoj in evalvacija primerne metode izolacije DNA iz neinvazivnih virov predstavlja pomemben korak pri vzreji in selekciji kranjske čebele s pomočjo genetskih markerjev.

Ključne besede: *Apis mellifera carnica*, kranjska čebela, izolacija DNA, levi, matica, PCR, COI, tRNA^{Leu}, neinvazivno vzorčenje, genetski markerji

ISOLATION OF GENOMIC DNA FROM NON-INVASIVE SAMPLES OF CARNIOLAN HONEY BEE QUEENS (*Apis mellifera carnica*)

Abstract

There is a growing interest for development and utilisation of methods that employ genotyping and take advantages of MAS (marker assisted selection) in honey bee selection. Biological source of DNA of appropriate purity and quality is most important parameter for successful genotypization. Non-invasive ways to obtain DNA of honey bee queens present attractive alternative since they do not require sacrifice of specimen and have no impact on individual longevity. Cuticle of insects is of extracellular origin and does not contain cells by itself. However, epithelial cells may remain attached to it as a consequence of moulting. These cells present potentially useful source of DNA for further studies. Exuviae of honey bee queen pupae are thus accessible source of genetic material. In this study we present first results of successful isolation of DNA from exuviae of honey bee queen pupae and amplification of two specific mitochondrial fragments from non-invasive (exuviae), semi-invasive (wing-clippings) and invasive (legs or antennae) sources. Successful isolation of DNA from exuviae of honey bee queen pupae may enable genotyping of honey bee queens before mating and selection of specific genotypes for further breeding. Development and evaluation of suitable method for DNA isolation from non-destructive biological sources presents important step in breeding and selection of Carniolan honey bee using genetic markers.

Key words: *Apis mellifera carnica*, Carniolan honey bee, DNA isolation, exuviae, honey bee queen, PCR, COI, tRNA^{Leu}, non-invasive sampling, genetic markers

¹ Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana

² Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

³ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Groblje 3, 1230 Domžale

UVOD

V vzrejo čebel se postopoma uvajajo metode, ki vključujejo genotipizacijo in uporabo z markerji podprte selekcije (MAS - marker assisted selection; Ruvolo-Takasusuki in sod., 2016; Holloway in sod., 2013). Eden od pomembnih korakov za uspešno genotipizacijo je izolacija zadostne količine DNA primerne čistosti in kakovosti iz informativnega biološkega vzorca. Izolacija iz tkiva žuželk, kamor spada tudi čebela, načeloma ni problematična in obstaja veliko število uveljavljenih in preizkušenih tehnik, ki omogočajo izolacijo DNA zadostne količine in primerne čistosti za nadaljnjo analizo (npr. Sudhagar in sod., 2014). V ta namen je osebek potrebno žrtvovati, nas pa zanima predvsem genetski material trotoev (haploidni) in matic (diploidne), ki prenašajo svoje genetske lastnosti v naslednjo generacijo, in je žrtvovanje osebkov nezaželeno. Večji izziv je izolacija DNA iz semi- in neinvazivno pridobljenih vzorcev pri maticah. Semi-invazivno pridobljeni vzorci so koščki krila, ki jih čebelarji pogosto matici odrežejo, preden jo vključijo v družino. Pri tem matica preživi in jo delavke redko zavrnejo. V literaturi obstajajo navedbe o uspešni izolaciji DNA iz koščkov kril za namen genotipizacije pri čebelah (Faccini in sod., 2018; Chaline in sod., 2003; Gould in sod., 2011; Gregory in Rinderer, 2004). Neinvazivni vzorci pa so levi bub matic, torej kutikula, ki ostane v matičniku po izleganju odrasle matice. Kutikula sama po sebi ne vsebuje celic, vendar se ob levitvi obloga zadnjega in sprednjega črevesa ter notranjost trahej z nekaj celicami, ki vsebujejo DNA, odloži skupaj z njo (Berholf, 1925). Te zadostujejo za nadaljnje analize. Ideja o uporabi kutikularnih ostankov za potrebe genotipizacije pri entomoloških vzorcih ni nova. Uspešnost izolacije DNA so pokazali pri nekaterih skupinah žuželk (Watts in sod., 2005; Nguyen in sod., 2017), ter tudi pri čebelah (Gregory in Rinderer, 2004). Levi bub matic so

dostopen neinvazivni vir dednega materiala, hkrati pa je učinkovita izolacija DNA metodološki izziv.

Cilj naše raziskave je postaviti izhodišča in raziskati možnosti za uspešno izolacijo DNA iz neinvazivnega vira pri maticah kranjske čebele za potrebe genotipizacije. V prvem koraku smo pripravili relativno enostaven protokol za vzrejevalce matic za vzorčenje matičnikov po izleganju matic. Kutikularne ostanke iz matičnikov smo shranili na -20°C in za izolacijo izbrali najprimernejše vzorce. Kot pozitivno kontrolo uspešnosti metode izolacije smo uporabili kot biološki vir okončino ali anteno matice, semi-invaziven vir so predstavljali koščki kril matic. Uspešno izolacijo DNA smo potrdili na podlagi pomnoževanja specifičnih mitohondrijskih fragmentov (COI in tRNA-Leu) s PCR ter sekvenciranjem pridobljenih zaporedij in ugotavljanjem identitete na ravni vrste medonosna čebela *Apis mellifera*.

Uspešna izolacija DNA iz levov bub matic omogoča genotipizacijo matic še pred parjenjem ter odbiro tistih matic, ki so nosilke genotipov, ki nas zanimajo. Razvoj in evalvacija primerne metode izolacije DNA iz neinvazivnih virov predstavlja pomemben korak pri vzreji in selekciji kranjske čebele s pomočjo genetskih markerjev.

MATERIALI IN METODE

Vzorčenje in priprava vzorcev za izolacijo DNA

V dogovoru z nekaterimi vzrejevalci matic smo v sezoni 2018 pridobili matičnike po izleganju matic. V ta namen smo pripravili enostaven protokol odvzema in shranjevanja matičnikov za pošiljanje po pošti. Vzrejevalcem smo v naprej poslali primerno število sterilnih 50 ml epruvet, v katere so po priloženem navodilu shranili matičnike po izleganju matic in jih po pošti poslali v roku 48 ur. Na vsako epruveto so vzrejevalci zabeležili datum poganja in



Slika 1. Primer matičnika po izleganju matice – LEVO matičnik po izleganju matice; DESNO – notranjost matičnika z vidnim rumenkastim kosmom na dnu in ob strani stene matičnika. To so ostanki kutikule po levitvi.

številko plemenilčka, v kolikor so bili ti podatki na voljo. Vzrejevalci so posebno skrb pri odvzemu namenili časovnemu okviru in sicer so matičnike za zagotovitev virov DNA morali odstraniti iz družine neposredno po poleganju matic oziroma v najkrajšem možnem času, preden so čebele delavke matičnike očistile. Prevzete vzorce smo shranili na -20°C do nadaljnje obdelave. Noge, antene in krila matic smo pridobili iz poginulih matic družin Kmetijskega Inštituta Slovenije, ki smo jih predhodno shranili v sterilne mikrocentrifugirke na -20°C . Poleg tega smo skozi celo sezono shranjevali matičnike poleženih matic iz družin Kmetijskega Inštituta Slovenije.

Iz matičnikov smo z čisto spatulo postrgali vsebino v novo sterilno mikrocentrifugirko volumna 2 ml. V nekaterih matičnikih smo lahko s prostim očesom ločili kosem rumenkaste barve na dnu matičnika (sklepamo, da gre za zmes izločkov, hranil in levov po levitvah ličnike) ter svetlo rjave prosojne zmečkanemu papirju podobne strukture, ki štrlijo ob notranji strani matičnika (sklepamo, da so to ostanki kutikule po zadnji levitvi bube matice; po Berholf, 1925; Elias-Neto in sod., 2009; Slika 1). Oboje smo s spatulo oziroma pinceto prenesli v ločeno sterilno mikrocentrifugirko. Tako pripravljene vzorce smo shranili na -20°C .

Izolacija DNA

Vzorce tkiva matic (noge, antene, krila) ter ostanke kutikule iz matičnikov smo uporabili kot izvorni material za preizkus izolacije DNA z 2 kompleta za izolacijo s kolonami, ki smo ju dodatno optimirali: ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline) in QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). Pri izolaciji DNA smo sledili navodilom proizvajalca, spreminjali pa smo naslednje parametre:

1. mehanska homogenizacija vzorca s pestilom/mehanska homogenizacija s kroglicami na napravi Tissue-Lyser (Qiagen)
2. inkubacija vzorca po mehanski homogenizaciji v pufru za lizo in ob dodatku Proteinaze K 3 ure na 56°C /prekonočna inkubacija na 56°C
3. uporaba pufru PBS v koraku mehanske homogenizacije/brez uporabe pufru PBS (pri kompletu QIAamp DNA Mini Kit).
4. Za elucijo izolirane DNA smo uporabili 50 μl pufru za elucijo.
5. Ločeno odstranjevanje rumenkastega kosma na dnu matičnika in nitaste strukture ob strani matičnika z ločeno izolacijo, kjer je bilo mogoče. Za ta korak smo se odločili, ker je rumenkast kosem bolj viskozne, lepljive strukture in bi lahko sestava primesi v njem motila nadaljnje korake izolacije DNA in kasneje verižne

reakcije s polimerazo.

6. Nekaj minutno centrifugiranje pri najvišjem številu obratov pred nalaganjem vzorca na kolono kot dodatni korak. Na kolono smo naložili zgolj supernatant – del vzorca, ki se je po centrifugiranju ločil od spodnje usedline (ostanki primesi, krilc, noge). Tako smo preprečili zamašitev separacijske membrane.

Pomnoževanje specifičnih fragmentov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Uspešnost izolacije smo najprej preverili na agarozni gelski elektroforezi, tako da smo nanесли 5 μl izolata v jamičo. Ugotovili smo, da je DNA, izolirana iz okončin, vidna na gelu, izolati hitinskih ostankov iz matičnikov in kril pa ne (Slika 2). Zato smo v nadaljevanju pripravili poskus pomnoževanja specifičnih fragmentov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), da bi potrdili uspešnost izolacije DNA ter skladnost pomnožene DNA na ravni vrst (*Apis mellifera*) iz neinvazivnih in semi-invazivnih vzorcev.

Fragment intergenske regije t-RNA^{Leu} – Cox2 (v nadaljevanju tRNA-Leu) je najbolj široko uporabljan mitohondrijski marker za razlikovanje med linijami in podvrstami medonosne čebele (pregledni članek Meixner in sod., 2013). Za podvrste, ki pripadajo evlucijski liniji C (kamor spada tudi kranjska čebela), je značilno kratko zaporedje in odsotnost variabilnosti v dolžini fragmenta tRNA-Leu. Do danes je znanih 9 haplotipov kranjske čebele (Franck in sod., 2000a; 2000b; Sušnik in sod., 2004; Božič in sod., 2016).

Metoda "DNA barcoding" z markerjem COI, ki je visoko ohranjen na ravni vrst, se uspešno uporablja pri identifikaciji organizmov (Herbert in sod., 2003). Uporabnost pri razlikovanju med podvrstami medonosne čebele na podlagi tega markerja pa je zaenkrat omejena (Bouga in sod., 2011). Syromyatnikov in sod. (2018) so pokazali možnost uporabe COI markerja za razlikovanje nekaterih podvrst medonosne čebele v Rusiji.

S PCR smo uspešno pomnožili oba od zgoraj opisanih markerjev (tRNA-Leu in COI). Osnovni volumen reakcije je bil 15 μl . Reakcijska mešanica je vsebovala 7,5 μl 2x mešanice DreamTaq MasterMix (ThermoFischer Scientific, ZDA), po 0,2 μl 20 uM vsakega začetnega oligonukleotida, 2 μl izolirane DNA in 5,1 μl destilirane H₂O (Sigma, ZDA). Izolate iz okončin, ki so služili za pozitivno kontrolo, smo predhodno 10 x redčili v destilirani vodi. Informacije o markerjih, nukleotidnih zaporedjih oligonukleotidnih začetnikov, nastavitve programa PCR smo povzeli po literaturi (Garnerey in sod., 1993 (tRNA-Leu) in Folmer in sod., 1994 (COI)). PCR smo izvedli v cikličnih termostatih SureCycler 8800 (Agilent), Veriti (Applied Biosystems), GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) ali T1 Thermocycler (Biometra).

Detekcija izolirane dednine in produktov PCR z agarozno gelsko elektroforezo

Uspešnost pomnoževanja nukleotidnega zaporedja smo preverili tako, da smo 5 µl pomnoženega produkta nanesli v jamice v 1 % agaroznem gelu z dodatkom EtBr (etidijevoga bromida) v 0,5 x pufru TBE na horizontalni elektroforezi. Za oceno dolžine fragmenta smo uporabili standardno lestvico GeneRuler™ 100 bp DNA (ThermoScientific, ZDA), ki smo jo sočasno z vzorci nanesli v eno od jamic na gelu. PCR produkte smo po končani elektroforezi vizualizirali s pomočjo UV transiluminatorja pri valovni dolžini 280 nm.

Čiščenje produktov PCR, sekvenciranje, urejanje zaporedij

Uspešno pomnožene produkte PCR smo encimsko očistili z reagentom ExoSAP-IT (ThermoFischer Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca. Določanje nukleotidnega zaporedja očiščenih produktov PCR so izvedli po Sangerjevi metodi v podjetju SeqMe (Češka) z obema začetnima oligonukleotidoma.

Kromatograme DNA zaporedij smo združili v programu Geneious v 11.1.5. (<https://www.geneious.com>) in popravili morebitne napake v branju zaporedja. Nato smo urejena homologna zaporedja poravnali bodisi z dodatkom ClustalW (Thompson in sod. 1994) ali z dodatkom MAFFT v.7 (Katoh, 2013) z uporabo algoritma E-ins-i v programu Geneious. Vsako od poravnav smo skrbno pregledali za morebitne napake v branju. Kodirajoča zaporedja markerja COI smo prevedli v aminokislinska zaporedja in preverili, da ne vsebujejo stop-kodonov. Vsa zaporedja smo preverili s spletnim orodjem BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ali se po podobnosti ujema jo z že znanimi zaporedji pri rodu *Apis*. Fragment COI, ki je uveljavljen univerzalen marker v metodi identifikacije organizmov »Barcoding« pa smo dodatno uporabili za preverjanje identifikacije na vrstni ravni v podatkovni zbirki BOLD (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_IdentificationRequest).

Filogenetska analiza

Za vsakega od markerjev smo pripravili unilokusno filogenetsko analizo, s katero smo preverili filogenetske odnose naših vzorcev ter izbora homolognih zaporedij rodu *Apis*, ki so dostopna v podatkovni zbirki GenBank (NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> na dan 15. 9. 2018). Za zunanjik smo uporabili homologna zaporedja vzhodne čebele *Apis cerana*. Vrzeli v poravnavi smo kodirali kot »-«, manjkajoče dele zaporedij pa smo kodirali kot »?«. S pomočjo programa jMODELTEST2 (Darriba in sod., 2012; Guindon in Gascuel, 2003) na strežniku CI-

PRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/portal2/>) smo določili najprimernejši substitucijski model za vsako poravnavo po kriteriju AIC (Akaike Information Criterion). Najprimernejši substitucijski model za marker COI je GTR + I, za marker tRNA-Leu pa HKY85 + G.

Filogenetsko drevo smo izračunali v programu MrBayes v.3.2.3. (Ronquist in sod. 2012) na strežniku CIPRES Science Gateway tako, da smo nastavili dva vzporedna algoritma MCMCMC vsakega s tremi toplimi in eno hladno verzijo, število generacij pa smo prilagodili glede na velikost nabora vzorcev tako, da je prišlo do konvergence v vzporednih algoritmih (standardna deviacija ločenih frekvenc 0.01 ali manj). 3×10^6 je bilo večinoma dovolj veliko število generacij za konvergenco, sicer smo število generacij povečali. Program je zabeležil vsako 1000. generacijo. Prvih 25 % vzorčenih dreves smo zavrgli, preostala drevesa pa so služila za določitev 50 % večinskega drevesa soglasja (50 % majority rule consensus tree). Za statistično podporo kladov so služile posteriorne verjetnosti na vsaki cepitvi. Genska drevesa smo grafično prikazali v programu Fig-Tree 1.4.3. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>) in jih uredili za prikaz rezultatov.

REZULTATI Z RAZPRAVO

Levi bub matic kot dostopen in primeren vir dednine za genotipizacijo – izhodišče za vpeljavo genetskih markerjev v rejski program?

V letošnji sezoni smo za potrebe analiz zbrali preko 100 matičnikov pri 13 vzrejevalcih in čebelarjih. Ugotovili smo, da je protokol vzorčenja matičnikov po izleganju matic primeren in dovolj enostaven, po končanih analizah pa bomo za mnenje zaprosili tudi sodelujoče in poizkusili upoštevati njihove predloge.

Za potrebe izolacije dednine iz tkiv (krilca in okončine) smo uporabili 8 matic, ki so v letošnji sezoni poginile. Uspešno smo izolirali DNA iz hitinskih ostankov matic po izleganju, iz koščkov kril in iz okončin. Naši rezultati kažejo, da so hitinski ostanki v matičnikih po izleganju matic stabilen in obstojen vir DNA na sobni temperaturi in ne potrebujejo posebnih pogojev kratkoročnega shranjevanja. Na podlagi agarozne gelske elektroforeze, s katero smo vizualizirali po 5 µl izolirano DNA, smo ugotovili, da je količina DNA v izolatih iz kutikularnih ostankov iz matičnikov in krilc v 5 µl izolata pod mejo detekcije na gelu (Slika 2).

Kljub nizki koncentraciji DNA v vzorcih smo uspešno pomnožili 2 fragmenta mitohondrijske DNA (COI in tRNA-Leu).

Ugotovili smo, da so za uspešno izolacijo DNA iz ostan-



Slika 2. Agarozna gelska elektroforeza izolatov DNA (volumen posameznega izolata na gelu je 5 μ l). Zadostna količina DNA za detekcijo je bila uspešno izolirana iz vzorca noge (N1 in N2), DNA iz kutikularnih ostankov matičnikov (1-5) in krilc (k1 in k2) ni vidna. L je standardna lestvica 100 bp plus.

kov hitina iz matičnikov in krilc ter uspešno pomnožitev fragmentov mitohondrijske DNA pomembni naslednji koraki:

1. Mehanska liza je pomembna pri uspešni izolaciji DNA in uporaba homogenizatorja TissueLyser s kroglicami je dala boljši rezultat kot homogenizacija ročno s pestilom.
2. Prekonočna inkubacija vzorcev v začetnem koraku lize na 56°C je dala boljši rezultat kot zgolj nekajurna inkubacija.
3. Pri pomnoževanju fragmentov se je pokazalo, da so bili uspešno pomnoženi vsi izolati iz matičnikov kjer smo za vir DNA uporabili izključno košček nitaste strukture, ne pa tudi izolati istih matičnikov iz rumenkastega kosma na dnu matičnika. Ta grudičast, lepljiv vir nam je povzročal že pri sami izolaciji določene težave (nekajkrat je prišlo do zamašitve membrane na koloni, obvezno smo morali uvesti dodaten korak centrifugiranja vzorca pred nanosom na kolono). Predvidevamo, da je razlog za slabši rezultat izolacije DNA iz rumenkastih kosmov dvojen: 1. Zaradi prisotnosti v kosmu v postopku izolacije zadostna količina DNA iz tega vira ni primerno dostopna ali pa 2. so v izolatu ostale po izolaciji prisotne nečistoče, ki inhibirajo polimerazno aktivnost.

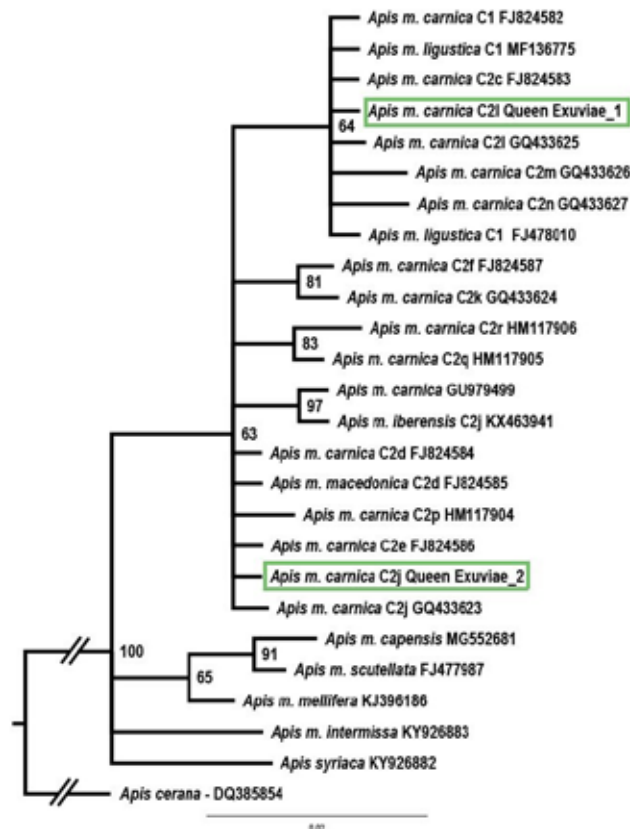
Da bi zagotovili, da DNA izolirana iz ostankov hitina in koščka krila ni kontaminacija (DNA bakterij, plesni, cvetnega prahu) ampak pripada čebeli, smo za pozitivno kontrolo uporabili DNA izolirano iz noge ali antene matice. Vsa uspešno pomnožena zaporedja iz ostankov hitina in krila so se ujemala z zaporedji pridobljenimi iz vzorcev okončin matice.

Uspešno smo pomnožili 536 bp dolg fragment tRNA-leu pri 24 vzorcih. Med temi vzorci smo razločili 2 haploti-

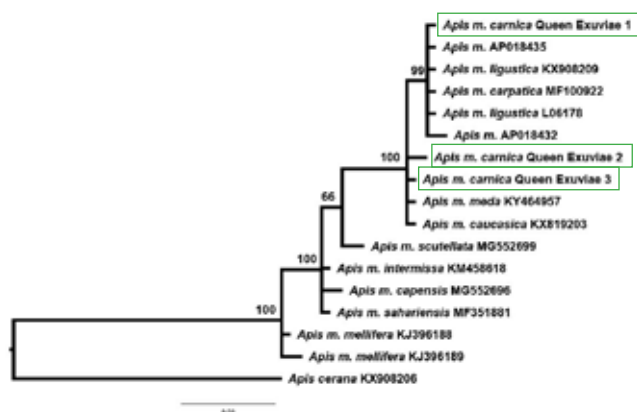
pa, ki smo ju uporabili v filogenetski analizi. Haplotipa se ujemata z do sedaj znanimi in opisanimi haplotipi v populaciji čebeljih družin v Sloveniji (Božič in sod., 2016). Haplotip 1 ustreza haplotipu C2i s šifro GQ433625, haplotip 2 ustreza haplotipu C2j s šifro GQ433623 (GenBank, Razpet in sod., 2009).

661 bp dolg fragment za COI smo uspešno pomnožili pri 32 vzorcih. Med temi vzorci smo razločili 3 haplotipe, ki smo jih uporabili v filogenetski analizi. Haplotipe smo preverili v podatkovni zbirki BOLD, ki omogoča identifikacijo na podlagi regije COI na ravni vrste. Rezultat je pokazal 99,85 % ujemanje z vrsto *Apis mellifera*.

Naši preliminarni rezultati kažejo, da so levi bub matic dostopen in primeren vir dednine za genotipizacijo matic kranjske čebele. Izpopolnjena metoda bo omogočila vplejavo genetskih markerjev v rejski program v Sloveniji in hitrejšo selekcijo linij kranjske čebele z zanimivimi rejskimi lastnostmi. Hkrati bo izpopolnjena metoda omogočila enostaven monitoring – spremljanje morebitne introgresije genov drugih podvrst v genski sklad populacij v Sloveniji.



Slika 3. Filogenetsko drevo z bayesovim pristopom za marker tRNA-Leu. Vrednosti na drevesu so posteriorne verjetnosti za posamezno cepitev. Z zelenim okvirjem sta označena haplotipa *A. m. carnica*, katerih fragment je pridobljen iz izolatov hitinskih ostankov matic po izleganju iz matičnikov.



Slika 4. Filogenetsko drevo z bayesovim pristopom za marker COI. Vrednosti na drevesu so posteriorne verjetnosti za posamezno cepitev. Z zelenim okvirjem so označeni haplotipi kranjske čebele *A. m. carnica*, pridobljeni iz izolatov hitinskih ostankov matic po izleganju iz matičnikov.

Filogenetska analiza

Naravno območje razširjenosti medonosne čebele *Apis mellifera* L. je Evropa, Afrika in Bližnji Vzhod. Adaptaci-

ja na raznolike življenjske pogoje je pripeljala do diverzifikacije na več kot 24 podvrst, ki se združujejo v 4 linije: Afriška (A), Zahodno Evropska (M), Vzhodno Evropska (C) in Bližnje Vzhodna (O) (Ruttner, 1988). Kranjska čebela *Apis mellifera carnica* Pollman spada v filogenetsko linijo C, poleg nje pa to linijo tvorijo še *A. m. ligustica* Spinola, *A. m. cecropia* Kiensenwetter in *A. m. macedonica* Ruttner (Ruttner, 1988). Medtem ko genotipizacija regije tRNA-Leu omogoča razlikovanje med posameznimi linijami, smo se v tej študiji omejili na vprašanje, ali je izolirana DNA iz ostankov hitina v matičnikih čebelja, ali gre za kak drug vir (npr. kontaminacijo). Ugotovili smo, da vsa pridobljena zaporedja poravnana z zaporedji iz podatkovne zbirke GenBank po podobnosti ustrezajo vrsti *Apis mellifera*. Unilokusna filogenetska analiza za vsak marker to tudi potrjuje (sliki 3 in 4).

ZAKLJUČKI

Neinvazivni in semi-invazivni biološki vzorci (levi bub in koščki krila) pri maticah so posebno atraktiven vir DNA, saj omogočajo pridobitev informacij o genotipu osebka brez žrtvovanja in nimajo bistvenega vpliva na dolgoživost.

Eksoskeleti žuželk, ki ostanejo v matičniku po izleganju matic, so sestavljeni iz necelularnih glikoproteinov in so primeren vir za neinvazivno genotipizacijo čebeljih matic. DNA, izolirana iz levov bub matic, se genotipsko ujema z DNA, izolirano iz vzorcev krilc in nog matic. To smo pokazali s specifičnim pomnoževanjem s PCR, pri čemer smo uporabili marker COI (za vrstno identiteto) ter marker tRNA-Leu (diskriminacija na ravni linij). Ugotovili smo, da je med metodami, ki smo jih preizkusili, najprimernejša metoda za izolacijo DNA iz hitinskih ostankov s kompletom QIAamp Mini s prekonočno inkubacijo v koraku lize ter z uporabo mehanske homogenizacije s kroglicami na napravi TissueLyser (QiaGen). Vključno z metodo vzorčenja, ki je prilagojena enostavnemu vzorčenju

matičnikov po izleganju matic s strani vzrejevalcev, nam ta metoda izolacije DNA iz neinvazivnega vira olajša/poenostavi postopek pridobivanja podatkov o genotipu matic še pred oploditvijo in vzpostavitvijo družine. Tak postopek genotipizacije omogoča selekcijo zaželjenih osebkov in podporo tradicionalnim metodam selekcije družin z izraženimi zaželjenimi lastnostmi. Z uspešnim izločanjem matic z nezaželjenimi lastnostmi v čimbolj zgodnji fazi reje, se lahko zmanjšajo stroški reje, čas in trud, ki ga vložijo čebelarji za vzdrževanje in testiranje družin. Hkrati bo izpopolnjena metoda omogočila enostaven monitoring – spremljanje morebitnega vnašanja genov drugih podvrst v genski sklad populacij v Sloveniji.

Predstavljena raziskava je izhodišče za nadaljnjo optimizacijo protokola za genotipizacijo matic na podlagi DNA iz ostankov hitina po zadnji levitvi. Na ta način bo omogočeno spremljanje rejskih lastnosti na ravni DNA, odbira matic za vzrejo in selekcijo, analize pa bodo na voljo tudi za uporabo v primeru izvoza matic kranjske sivke v tujino.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujemo vsem vzrejevalcem in čebelarjem, ki so v letošnjem letu sprejeli povabilo za sodelovanje in nam posredovali primerno ohranjene matičnike (Bevk Danilo, Bukovšek Štefan, Bukovšek Janko, Dremelj Janez, Grm Darko, Jezeršek Cvetka, Kolar Peter, Novak Miha, Nakrst Mitja, Petelin Irma, Peternelj Jože, Starovasnik Milan, Zemljič Andrej). Zahvaljujemo se tudi sodelavcem na Kmetijskem inštitutu Slovenije, ki so s svojimi predlogi, znanjem in strokovno pomočjo prispe-

vali k prvim rezultatom na področju izolacije dednine iz matičnikov v Sloveniji. Projekt je financiran iz sredstev programske skupine P4-0133 (Trajnostno kmetijstvo na Kmetijskem inštitutu Slovenije) in sredstev projekta "Raziskovalci-2.0-KIS-529015", ki ga sofinancirata Republika Slovenija (Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport) in Evropska Unija iz Evropskih strukturnih in investicijskih skladov.

LITERATURA

- Berhof, L.M. 1925. The moults of the honey bee. *Journal of Economic Entomology*. 18: 380-384.
- Bouga, M., Alaux, C., Bienkowska, M., Ralph, B., Carreck, N.L., Cauia, E., Chlebo, R., Dahle, B., Dall'Olio, R., De la Rua, P., Gregorc, A., Ivanova, E., Kence, A., Kence, M., Kezić, N., Kiprijanovska, H., Kozmus, P., Kryger, P., Le Conte, Y., Aleksandar, B. 2011. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *Journal of Apicultural Research*. 50: 51-84. doi: 10.3896/IBRA.1.50.1.06.
- Božič, J., Kordiš, D., Križaj, I., Leonardi, A., Močnik, R., Nakrst, M., Podgoršek, P., Prešern, J., Sušnik Bajec, S., Zorc, M., Zorc, J., Dovč, P. 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, 5)*. Ljubljana: Biotechnical Faculty. 2016, suppl. 5: 18-27.
- Châline, N., Ratnieks, F., Raine, N., Badcock, N., Burke, T. 2004. Non-lethal sampling of honey bee, *Apis mellifera*, using wing tips. *Apidologie*. 35: 311-318.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 8: 772
- Elias-Neto, M., Soares, M.P.M., Bitondi, M.M.G. 2009. Changes in integument structure during the imaginal molt of the honey bee. *Apidologie*. 40: 29-39. doi: 10.1051/apido:2008064
- Facchini, E., Rizzi, R., Chessa, S. 2018. DNA extraction from wings as a suitable approach for queen bees genotyping. *International Journal of Health, Animal Science and Food Safety*. 5. doi : <https://doi.org/10.13130/2283-3927/10065>
- Folmer, O.M., Black, M., Hoeh, R., Lutz, R., Vrijehok, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5: 304-313.
- Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M., Cornuet, J.-M. 2000. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular ecology*. 9: 907-921. doi : 10.1046/j.1365-294x.2000.00945.x.
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.-M. 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from Near East. 31: 167-180. DOI: 10.1051/apido:2000114.
- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G., Cornuet, J.-M. 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*. 49: 1016-1021. doi:10.1007/BF02125651.
- Gould, E. M., Taylor, M.A., Holmes, S. J. 2011. A more consistent method for extracting and amplifying DNA from bee wings. *Apidologie*. 42: 721-727. doi: 10.1007/s13592-011-0077-x.
- Gregory, P.G., Rinderer, T.E. 2004. Non-destructive sampling of DNA used to genotype honey bee (*Apis mellifera*) queens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 111: 173-177.
- Guindon, S., Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by

- maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
- Holloway, B., Tarver, M.R., Rinderer, T.E. 2013. Fine mapping identifies significantly associating markers for resistance to the honey bee brood fungal disease, Chalkbrood, *Journal of Apicultural Research*, 52:3: 134-140. doi: 10.3896/IBRA.1.52.3.04
 - Katoh, S. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772-780.
 - Meixner, M.D., Pinto, M.A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E., Fuchs, S. 2013. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 52. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.05.
 - Mikhail, S.Y., Borodachev, A.V., Kokina, A.V., Popov, V.N. 2018. A Molecular Method for the Identification of Honey Bee Subspecies Used by Beekeepers in Russia. *Insects*. 9. doi: 10.3390/insects9010010.
 - Nguyen, H.Q., Kim, Y. I., Borzée, A., & Jang, Y. 2017. Efficient isolation method for high-quality genomic DNA from cicada exuviae. *Ecology and Evolution*, 7(20): 8161-8169. doi: 10.1002/ece3.3398
 - Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*. 61(3): 539-542. doi:10.1093/sysbio/sys029.
 - Ruttner, F., 1988. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 284 pp.
 - Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., Arielen Patricia Balista Casagrande Pozza, Ana Paula Nunes Zago Oliveira, Rejane Stubs Parpinelli, Fabiana Martins Costa-Maia, Patricia Faquinello and Vagner de Alencar Arnaut de Toledo. 2016. Improvement and Selection of Honeybees Assisted by Molecular Markers, *Beekeeping and Bee Conservation Emerson Dechechi Chambo*, IntechOpen, doi: 10.5772/62426. Available from: <https://www.intechopen.com/books/beekeeping-and-bee-conservation-advances-in-research/improvement-and-selection-of-honeybees-assisted-by-molecular-markers>
 - Sudhagar, S., Rami Reddy, P.V., Sridhar, V., Kamala Jayanthi, P.D., Vani, R. 2014. Qualitative and quantitative differences in DNA extracted from different body parts of *Apis* spp. (Hymenoptera:Apidae) and its validation using microsatellite markers. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*. 20: 55-58.
 - Susnik, S., Kozmus, P., Poklucar, J., Meglic, V. 2004. Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. *Apidologie*. 35: 623-636. doi: 10.1051/apido:2004061
 - Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22):4673-4680.
 - Watts, P.C., Thompson, D.J., Daguét, C., Kemp, S.J. 2005. Exuviae as a reliable source of DNA for population-genetic analysis of odonates. *Odonatologica*. 34: 183-187.