Genetski markeri u identifikaciji bioraznolikosti medonosne pčele (Apis mellifera L.)

Pimpi-Steiner, Dorothea

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:337502

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dorothea Pimpi-Steiner
Preddiplomski stručni studij Zootehnika
Smjer Zootehnika

Genetski markeri u identifikaciji bioraznolikosti medonosne pčele (*Apis mellifera L.)*

Završni rad

Osijek, 2018.
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dorothea Pimpi-Steiner
Preddiplomski stručni studij Zootehnika
Smjer Zootehnika

Genetski markeri u identifikaciji bioraznolikosti medonosne pčele (*Apis mellifera L.)*

Završni rad

Osijek, 2018.
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Dorothea Pimpi-Steiner
Preddiplomski stručni studij Zootehnika
Smjer Zootehnika

Genetski markeri u identifikaciji bioraznolikosti medonosne pčele (*Apis mellifera L.)*

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. doc.dr.sc. Nikola Raguž, mentor
2. prof.dr.sc. Zlatko Puškadija, član
3. doc.dr.sc. Boris Lukić, član

Osijek, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Završni rad
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Preddiplomski stručni studij Zootehnika, smjer Zootehika
Dorothea Pimpi-Steiner

Genetski markeri u identifikaciji bioraznolikosti medonosne pčele *(Apis mellifera L.)*

Sažetak:

Varijabilnost pčelinjih zajednica u Europi smanjuje se uslijed brojnih čimbenika. To je prvenstveno posljedica širenja raznih bolesti pčela (varooza, nozemoza i različite viroze), jednolične ishrane pčela (monokultura), upotrebe zaštitnih sredstava (pesticida) u biljnoj proizvodnji te trgovina i uvoz većinom dvije podvrste medonosne pčele, sive ili kranjske pčele (*A. m. carnica*) te žute ili talijanske pčele (*A. m. ligustica*). Iako su provedena brojna istraživanja, stvarni uzroci pada navedenog broja pčelinjih zajednica nisu u potpunosti jasni. S ciljem očuvanja lokalno prilagođenih podvrsta i ekotipova putem suvremenih uzgojnih programa, takve populacije je najprije potrebno utvrditi. U ovom radu bit će obrađene morfometrijske i molekularne metode koje su trenutno dostupne te se koriste za potrebe ispitivanja genetske specifičnosti i identifikaciju bioraznolikosti pčela, te bolji uvid u njihove taksonomske odnose.

Ključne riječi: bioraznolikost, morfometrija, mikrosateliti, alozimi, SNP markeri.

26 stranica, 1 tablica

Završni rad je pohranjen u knjižnici Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Final work
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
Undergraduate proffesional study Zootehnique
Dorothea Pimpi-Steiner

Aplication of genetic markers in identification of biodiversity of honey bees *(Apis mellifera L.)*

Summary:

The natural variability of Western honey bee (*Apis mellifera*) in Europe is reduced due to a number of reasons. These are primarily consequences of spread of various bee diseases (varoosis, nosemosis, and variable viruses), uniform nutrition of bees (monoculture), significant use of pesticides in plant production and trade and import of mainly two subspecies (*A. m. carnica* and *A. m. ligustica*). The actual causes of the honey bee colony losses are not fully clear, although numerous studies have been carried out. In order to preserve locally adapted subspecies and ecotypes through contemporary breeding programs, such populations need to be deter- mined at first. In this article, the methods currently available, will be presented and used for investigation of genetic specificity and identification of bee biodiversity, also for better insight into their taxonomic relationships.

Keywords: biodiversity, morphometry, microsatellites, allozymes, SNP markers.

26 pages, 1 table

Final work is archived in Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. PRIKUPLJANJE I POHRANJIVANJE UZORAKA 3
3. MORFOMETRIJSKA MJERENJA 4
3.1. Klasična morfometrija 4
3.2. Geometrijska morfometrija 4
4. MOLEKULARNE METODE 6
4.1. Mitohondrijska DNK 6
4.2. RFLP metoda 7
4.3. PCR-RFLP metoda 8
4.4. PCR metoda 9
4.4.1. Multiplex PCR 9
4.4.2. RT- PCR metoda 10
4.4.3. Metoda sekvenciranja molekule DNK na temelju metode terminacije sinteze lanca 10
4.4.4. Sekvenciranje Maxam-Gilbert metodom 11
4.5. RAPD metoda 11
4.6. AFLP metoda 12
4.7. Sekvenciranje 13
4.8. Analiza alozima 14
4.9. DNK mikrosateliti 15
4.10. DNK minisateliti 16
4.10.1. VNTR metoda 17
4.11. SNP markeri 17
4.11.1. ARMS metoda 18
5. ZAKLJUČAK 19
6. LITERATURA 20

1. UVOD

Medonosna pčela (*Apis mellifera L.*) je najraširenija vrsta pčela koja se uzgaja s ciljem proizvodnje meda i ostalih pčelinjih proizvoda te se može naći na svim kontinentima osim na Antarktici. Medonosna pčela prvi je udomaćeni korisni kukac. Koristi od nje su izravne i neizravne. Izravne koristi su med, vosak, pelud, propolis, matična mliječ i pčelinji otrov. A neizravne su koristi od oprašivanja samoniklog i kultiviranoga bilja. Oprašivanjem bilja stvara se 10 do 100 puta veća korist od ukupnih izravnih koristi, te nam je zbog toga njezina bioraznolikost od izuzetne važnosti. Prirodno stanište medonosne pčele je veliko i obuhvaća područje Bliskog istoka, Afrike i Europe. Ljudi su zaslužni za njezino daljnje širenje, uvodeći europske podvrste u Sjevernu i Južnu Ameriku, Australiju, Novi Zeland i Istočnu Aziju. Podvrste su na temelju morfometrijskih analiza (Ruttner, 1988.) podijeljene u četiri glavne

grane. Afričke podvrste pripadaju grani A, sjeverozapadne europske podvrste grani M, jugoistočne europske podvrste grani C i srednjoistočne podvrste grani O. Najranija istraživanja bioraznolikosti pčela zasnivala su se isključivo na morfometrijskim metodama i bila su usmjerena prema rasvjetljavanju taksonomskih odnosa unutar vrste. Iako su morfometrijske metode pokazale visoku preciznost zahvaljujući korištenju velikog broja ispitivanih parametara, one su istovremeno bile dugotrajne zbog velikog broja fenotipskih mjerenja. Za potrebe ispitivanja genetskih specifičnosti podvrsta i identifikacije bioraznolikosti medonosnih pčela i boljeg uvida u njihove taksonomske odnose, počele su primjenjivati molekularne metode koje su znatno brže i preciznije. Ove metode omogućuju korištenje molekularnih informacija s ciljem određivanja srodstvenih odnosa između vrsta i postavljanja vrlo precizne znanstvene klasifikacije analiziranih organizama. Karakteristika medonosne pčele je velika varijabilnost (27 opisanih podvrsta) i prilagođenost lokalnim uvjetima klime i vegetacije. Međutim, zbog sve većih nastojanja za povećanjem ekonomske isplativosti proizvodnje, trgovina i razmjena pčela dovela je do povećanja uniformnosti između populacija i smanjenja genetske raznolikosti. Stoga se javila potreba za poticanjem regionalnih istraživanja u svrhu očuvanja lokalno prilagođenih podvrsta pčela. Da bi se taj cilj postigao, potrebno je imati referentnu populaciju za identifikaciju ekotipova koji će se koristiti za daljnji uzgoj. Za osiguravanje stabilne početne populacije, važno je da referentna baza odražava prirodnu varijaciju medonosnih pčela i pokriva najveći dio svih populacija u Europi, ali i u svijetu. Stoga je cilj ovoga rada prikazati metode i tehnike utvrđivanja bioraznolikosti pčela kako bi se olakšalo prikupljanje podataka prilagođenih za integraciju na razini cijele Europe i svijeta, s ciljem koherentnijeg shvaćanja raznolikosti medonosnih pčela.

2. PRIKUPLJANJE I POHRANJIVANJE UZORAKA

Količina uzoraka najviše ovisi o cilju istraživanja. U cilju identifikacije potrebni su samo uzorci od interesa, na primjer uzorci od određene linije pčela. Međutim, zbog razlika u koloniji potrebno je prikupiti dovoljan broj uzoraka od najmanje tri kolonije kako bi dobili referentne podatke. Ako se želi istraživati cijela populacija na nekom području kako bi utvrdili regionalne razlike, potrebno je prikupiti oko 5 kolonija po lokaciji kako bi pogreške prilikom skladištenja i istraživanja bile u granici koja se može tolerirati. Najprikladnije bi bilo da se prikupi dovoljan broj uzoraka kako bi se omogućila analiza uzoraka kombinacijom metoda. Dok je za većinu molekularnih metoda jedna pčela po koloniji dovoljna za analizu, preporučuje se 15 pčela za morfometrijsku analizu, a najmanje 10 treba analizirati. Odnosno, broj pčela koji je potreban za morfometrijska mjerenja ovisi o stupnju intra kolonijalne varijacije, veći je za varijabilna svojstva kao što su boje, ali se može smanjiti na pet sa stabilnijim svojstvima kao što su žilice krila. Za sve opisane metode u ovom radu, pčele se prije analize ubijaju te je prikladno prikupljanje od 30 do 40 radilica po zajednici. Za molekularne (DNK) analize, metoda ubijanja nije vrlo važna i preporučuje se skladištenje u 95% etanolu. Zamrzavanje je također moguće, ali rijetko je opcija prilikom prikupljanja na terenu. Skladištenje u bilo kojoj tekućini koja sadrži formaldehid ili octenu kiselinu uništava DNK i nije preporučljivo. Za "klasičnu" morfometriju, pčele bi trebale biti usmrćene uranjanjem u vruću (kipuću) vodu ili eterskim parama, jer niti jedna druga metoda

usmrćivanja pčela neće dovesti do istezanja proboscisa koji se ne može mjeriti ako nije ispružen. Medonosne pčele imaju dva dijela usta. Mandibula ili "čeljust" koja se koristi za žvakanje i proboscis. Proboscis je slamnati jezik koji se koristi za usisavanje tekućina i za degustaciju. No, za analizu alozima, pčele bi trebale biti prenesene žive u laboratorij, ili zamrznute na licu mjesta (suhi led, tekući dušik).

3. MORFOMETRIJSKA MJERENJA

Prvobitno, razlikovanje podvrsta medonosnih pčela je bilo zasnovano na deskriptivnim metodama koje nisu bile pouzdane pa su zamijenjene morfometrijskim metodama (Ruttner, 1988.). Morfometrijske metode su zasnovane na višestrukom mjerenju morfoloških karaktera na velikom broju jedinki (Alpatov, 1929.). Morfometrija kod pčela proučava kvantitativne (dužina, širina, površina pojedinih dijelova tijela) i kvalitativne (boja, građa tijela) fenotipske karakteristike. Morfometrijske analize predstavljaju najjeftiniju i najpraktičniju metodu za proučavanje fenotipske raznolikosti medonosne pčele (Ruttner, 1988.). Različiti dijelovi tijela, koji spadaju u četiri glavne kategorije, korišteni su u morfometrijskim analizama. Najsigurnija i najinformativnija je morfometrija krila pčela. Pri tome se koriste tri glavna pristupa; klasična morfometrija krila, metoda DAWINO i geometrijska morfometrija krila.

3.1. Klasična morfometrija

Klasična morfometrija se zasniva na mjerenju i usporednoj analizi pojedinih dijelova tijela pčela. Kod prvih istraživanja upotrebljavan je mali broj morfoloških karakteristika, dok se u novijim istraživanjima koristilo i do 42 morfološka karaktera. Kao najznačajniji od njih navode se: dužina prednjeg krila, širina prednjeg krila, dužina radijalne ćelije (a), dužina diskoidne ćelije (b), kubitalni indeks (a/b), dužina zadnjeg krila, širina zadnjeg krila, dužina buta zadnje noge, dužina golenjače zadnje noge, dužina bazitarsusa, širina bazitarsusa, dužina jezika (rilice). Ovom metodom opisano je 26 podgrupa pčela (Ruttner, 1988., 1992., Sheppardetal, 1997., Engel, 1999., Sheppard and Meixner, 2003.) s karakterizacijom „geografske podvrste“, jer je njihova rasprostranjenost povezana s različitim geografskim područjima. Jedna od unaprijeđenih morfometrijskih metoda je i DAWINO metoda (eng. Discriminant Analysis With Numerical Output) koja je pogodna za razlikovanje pčela unutar iste linije (Uzunov i sur., 2009.).

3.2. Geometrijska morfometrija

Geometrijska morfometrija ima mogućnost da se morfološka varijabilnost razdvoji na dvije osnovne komponente, veličinu i oblik (Bookstein, 1991.), koje se potom mogu nezavisno analizirati. Označavanjem relevantnih dvo ili trodimenzionalnih specifičnih točaka (eng. landmarks) na zadanoj morfološkoj cjelini definira se njihova konfiguracija. Specifične točke su jasno definirane anatomske točke koje je moguće utvrditi s velikom točnošću i ponovljivošću. Polazni podaci u analizama geometrijske morfometrije predstavljaju konfiguracije specifičnih točaka koje jasno odgovaraju definiranim morfološkim točkama i koje je moguće s velikom preciznošću utvrditi kod svih jedinki u analiziranom uzorku. Geometrijska morfometrija ima veliku „statističku osjetljivost“, tako da se njezinom primjenom mogu otkriti male promjene u obliku morfoloških cjelina koje se ne mogu utvrditi tradicionalnim morfometrijskim metodama (Klingenberg, 2002.). Međutim, za potrebe ispitivanja genetskih specifičnosti podvrsta i identifikacije bioraznolikosti i boljeg uvida u taksonomske odnose, razvijene su molekularne metode koje su znatno brže i preciznije od onih zasnovanih na morfometriji.

4. MOLEKULARNE METODE

Istraživanja obuhvaćaju pregled metoda i eksperimentalnih pristupa koje današnja biomedicinska istraživanja koriste u svrhu pronalaženja povezanosti, odnosno korelacije između promjena u genomu, transkriptomu i proteomu i složenih patoloških procesa kao što su, primjerice, novotvorine. Sukladno s time pozornost je na jednom od najjednostavnijih načina za izolaciju DNK, koji je temeljni alat molekularnih eksperimenata. Također, mogućnost manipulacije sa DNK ulomcima, tj. cijepanje DNK restrikcijskom endonukleazom, korištenje tako otvorenog vektora za ligaciju novog inserta (gena) DNK te kloniranje istog. Na taj način, dobiva se nova konstrukcija, odnosno kreira nova rekombinantna DNK molekula. Zatim, sastavljanje lančane reakcije polimeraze (PCR) te testiranje specifičnosti upotrebljenih primera. To su molekularne metode koje otvaraju vrata puno kompleksnijim eksperimentalnim pristupima. Ako znamo kako umnožiti DNK PCR-om, kako analizirati ulomke elektroforezom te kako konstruirati novu rekombinantnu DNK molekulu i ubaciti je u žive stanice, onda odabirom i znanjem, vođenim dizajnom primera i ulomaka DNK, možemo analizirati genetske razlike među vrstama i podvrstama, pronalaziti nove varijante gena, identificirati ulomke genomske DNK koji reguliraju izražavanje gena, ili čak kreirati genetski modificiran organizam, odnosno model.

4.1. Mitohondrijska DNK

Jedan od najznačajnijih molekularnih markera koji se koristi u proučavanju bioraznolikosti pčela je mitohondrijska DNK (mtDNK). To je deoksiribonukleinska kiselina koja se nalazi u mitohondrijima eukariotskih organizama koji pretvaraju kemijsku energiju iz hrane u oblik koji stanice mogu iskoristiti (ATP). Mitohondrijska DNK pčela je cirkularna molekula dužine 16 343 baznih parova koju čini 13 protein-kodirajućih gena, 22 gena za transportne RNK i dva gena za ribozomalnu RNK (Crozier i Crozier, 1993.). Za razliku od nuklearne DNK koja se nasljeđuje od oca i majke, mtDNK je naslijeđena samo putem majke što je ovaj marker učinilo jednim od najpopularnijih markera u genetskim istraživanjima medonosne pčele. Varijacije mtDNK u medonosne pčele su otkrivene pomoću različitih molekularnih metoda: RFLP, te sekvenciranje fragmenata (eng. Restricted Fragment Length Polymorphism - polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata) i PCR-RFLP. Prvobitna ispitivanja varijabilnosti mtDNK pčela obuhvatila su tri europske rase *A. mellifera*: *A. m. carnica, A. m. ligustica i A. m. caucasica* (Moritz i sur., 1986.). Korištenjem metode polimorfizama dužine restrakcijskih fragmenata (eng. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), čitav mitohondrijski genom podvrgnut je djelovanju sedam restrikcijskih endonukleaza, od kojih je samo BglII pokazao specifične razlike između ispitivanih podvrsta. Iako je ova metoda pokazala nizak nivo polimorfizama u mtDNK, njome je ipak bilo moguće razlikovati obrazac restrikcijskih fragmenata karakterističnih za A. m. carnica i A. m. ligustica s jedne i A. m. caucasica sa druge strane. Ista metoda, ali s drugim restrikcijskim enzimima pokazala je asimetričnu distribuciju polimorfizama između A. m. carnica i A. m. ligustica, pri čemu je veća varijabilnost uočena u populaciji kranjske medonosne pčele (Meixner i sur., 1993.). Ovakvi rezultati mogli su se koristiti za praćenje introgresije, odnosno protoka gena iz jedne populacije u drugu ponovljenim ukrštavanjem nastalih hibrida s jedinkama iz čistih linija, između dvije ispitivane podvrste pčela (Meixner i sur., 1993.).

4.2. RFLP metoda

Pomoću RFLP metode (eng. Restriction Fragment Length Polymorphism) DNK uzorak se razlaže (digestira) pomoću restrikcijskih enzima na pojedine dijelove, a samim time restrikcijski fragmenti su u gel elektroforezi razdvojeni, u skladu s njihovim dužinama. Elektroforeza je način određivanja veličine fragmenata nukleinskih kiselina na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. Najjednostavnija je horizontalna agarozna gel elektroforeza koja uglavnom služi za provjeru kvalitete ekstrahiranih nukleinskih kiselina, kao i za detekciju fragmenata nakon PCR reakcije ili RFLP metode. RFLP metoda se koristi za analizu jedinstvenih uzoraka unutar DNA fragmenata kako bi se detektirala genetska razlika organizama. Ovi se obrasci nazivaju varijabilnim brojem tandemskih ponavljanja (VNTRs).

Genetski polimorfizam se definira kao naslijeđena genetska razlika među pojedincima u više od 1% normalne populacije. RFLP metoda iskorištava ove razlike u sekvencama DNK kako bi prepoznala i proučila sličnosti i razlike unutar vrste. Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji sijeku DNK u kratke komade. Svaka restrikcijska endonukleaza cilja različite nukleotidne sekvence u DNK lancu i stoga dolazi do rasijecanja na različitim mjestima. Udaljenost između mjesta cijepanja određene restrikcijske endonukleaze razlikuje se od pojedinaca. Dakle, duljina DNK fragmenata proizvedenih restrikcijskom endonukleazom bit će različita kod pojedinačnih organizama i vrsta. RFLP se provodi pomoću nekoliko koraka. Za početak DNK se izdvaja iz krvi, sline ili drugih uzoraka te se pročišćava. Pročišćena DNK digestirana je pomoću restrikcijskih endonukleaza. Lokacije prepoznavanja tih enzima su općenito 4 do 6 osnovnih parova duljine. Što je kraći slijed poznat, to je veći broj fragmenata koji nastaje. Na primjer, ako postoji kratki niz GAGC koji se ponavlja u uzorku DNK. Restrikcijska endonukleaza koja prepoznaje GAGC sekvencu smanjuje DNK pri svakom ponavljanju GAGC uzorka. Ako jedan uzorak ponavlja GAGC slijed 4 puta, dok ga drugi uzorak ponavlja 2 puta, duljina fragmenata koje generira enzim za dva uzorka bit će različita. Restrikcijski fragmenti proizvedeni tijekom fragmentacije DNK analizirani su pomoću gel elektroforeze. Fragmenti su negativno nabijeni i mogu se jednostavno odvojiti elektroforezom koja razdvaja molekule na temelju njihove veličine i naboja. Fragmentirani uzorci DNK se stave u komoru koja sadrži elektroforetski gel i dvije elektrode. U električnom polju fragmenti kreću prema pozitivnoj elektrodi. Manji fragmenti kreću se brže kroz gel, ostavljajući veće iza sebe i time se uzorci DNK razdvajaju u različite fragmente na gelu. Gel se tretira luminescentnim bojama kako bi DNK fragmenti bili vidljivi.

4.3. PCR-RFLP metoda

Značajan napredak u analizama mtDNK ostvaren je primjenom RFLP metode na ograničene fragmente mitohondrijskog genoma koji su prethodno umnoženi metodom lančane reakcije polimeraze (eng. Polymerase Chain Reaction, PCR), a ne na cijelu molekulu mtDNK kao što je do tada bio slučaj. Osim toga, PCR-RFLP metoda prevladala je probleme u odabiru najpogodnijeg tkiva za izolaciju mitohondrija, male količine izolirane mtDNK i zavisnost kvalitete prinosa izolirane DNK od razvojnog stadija jedinke (Moritz i sur., 1986). Posebnu pažnju istraživača privukla je specifičnost intergenetske regije. A. mellifera između citohromoksidaza I (COI) i citohromoksidaza II (COII) gena (poznat i pod nazivom tRNAleu-cox2 regija), a koji se kvantitativno i kvalitativno razlikuje od iste regije kod drugih vrsta insekata (Crozier i sur., 1989.). Detaljnom analizom navedenih regija utvrđene su razlike u dužini tRNAleu-cox2, te je upravo to razlog što dužina mitohondrijskog genoma A. mellifera nije konstantna, već se u zavisnosti od podvrste kreće u rasponu od 16 500 do 17 000 baznih parova (Cornuet i Garnery, 1991.). Najpreciznija karakterizacija mtDNK haplotipova A. Mellifera dobijena je amplifikacijom COI-COII intergenetske regije i posljedičnim tretiranjem amplicirane sekvence DraI restrikcijskim enzimom (Garnery i sar., 1993.).

4.4. PCR metoda

PCR (eng. Polymerase Chain Reaction), odnosno polimerazna lančana reakcija, bazirana na RFLP metodi vrlo je jednostavna. Dio DNK molekule koji se želi umnožiti utvrđuje se kratkim oligonukleotidnim sekvencama, koje su komplementarne krajevima dijela DNK od interesa. Ovi primeri su pokretači serije reakcija pomoću enzima DNK polimeraze, koja na kalupu jednog lanca DNK sintetizira novi, komplementarni lanac, pri čemu veličina sintetiziranog dijela DNK molekule odgovara dužini koju omeđuje izabrani primer. Prvi korak u PCR-RFLP analizi je umnažanje fragmenta koji sadrži varijaciju, nakon čega slijedi tretiranje umnoženog fragmenta s odgovarajućim restrikcijskim enzimom. Budući da prisutnost ili odsutnost mjesta za prepoznavanje restrikcijskog enzima rezultira formiranjem restrikcijskih fragmenata različitih veličina, identifikacija alela može se provesti elektroforetskim odstranjivanjem fragmenata. Najčešći test korišten u istraživanju bioraznolikosti pčela je DraI test (DraI restrikcijski enzim). Polimerazna lančana reakcija odvija se u uređaju koji automatski i precizno kontrolira promjene temperature tijekom ciklusa amplifikacije (PCR termoblok). Taj uređaj zagrijava i hladi reakcijsku smjesu u epruvetama (0,2 ml) koje se nalaze u termobloku i osim kontrole temperature, termoblok kontrolira i dužinu trajanja pojedinih dijelova ciklusa amplifikacije. Znanstvenici su se dosjetili kako da poboljšaju ovu metodu na način da se i vrlo male količine DNK mogu uspješno umnožiti. Metoda se zove nested PCR ili PCR u dva stupnja. Metoda se temelji na primjeni dvostrukog PCR-a. Prvo,načini se prvi PCR postupak s malom količinom DNK. Zatim, PCR produkt iz prve PCR reakcije koristi se kao kalup za novi PCR. PCR reakcijska smjesa se ponovo načini na isti način kao i za prvi PCR , jedino primeri nisu isti. U odnosu na primere iz prvog PCR-a, novi primeri su smješteni unutar PCR produkta prve reakcije. Ovom metodom moguće je dokazati vrlo male početne količine DNK, a najviše se koristi u analizama malih količina cDNK (transkripcijskih RNK molekula) u dokazivanju niske ekspresije gena u ispitivanom tkivu.

4.4.1. *Multiplex PCR*

Multiplex PCR predstavlja mogućnost da se načini istovremena analiza više segmenata istog uzorka DNK u jednoj epruveti, koristeći više parova primera. Metoda je odgovor na pitanje- ako želimo u istom uzorku izolirane DNK učiniti vise amplifikacija, možemo li jednostavno u reakciju dodati više parova primera? Chamberlain je 1988. godine prvi pokazao da je to moguće. Koristio je šest parova primera i uspješno je načinjena multiplex amplifikacija.

4.4.2. *RT- PCR metoda*

Na osnovama PCR metode razvijeno je niz novih postupaka koji su prilagođeni potrebama eksperimentalnih zahtjeva i razinama osjetljivosti i specifičnosti samog eksperimentalnog ili analitičkog modela. Jedna od najznačajnijih je RT- PCR (eng. Reverse transcription – PCR). RT-PCR je metoda u kojoj je polazni genetski materijal molekula RNK. Budući da se zbog svoje strukture (uracil umjesto timina) ne može direktno amplificirati pomoću DNK polimeraze, u prvom koraku reakcije RNK se prepiše (transkribira) pomoću enzima reverzne transkriptaze u komplementarnu DNK (cDNK) i zatim je cDNK dovoljna da bude kalup za amplifikaciju segmenta RNK od interesa. Područje primjene je vrlo veliko. Na primjer, na ovaj način se može dokazati transkripcija jednog gena u točno određenom tkivu ili stanici. Eksponencijalna amplifikacija nakon reverzne transkripcije je metoda visoke osjetljivosti koja omogućuje da se vrlo mali broj RNK molekula uspješno detektira.

4.4.3. *Metoda sekvenciranja molekule DNK na temelju metode terminacije sinteze lanca*

Sanger 1977. godine razvija metodu sekvenciranja molekule DNK koja se temeljila na metodi terminacije sinteze lanca (eng. Chain termination method). Metoda je zahtijevala razdvajanje jednolančanih molekula DNK koje su se razlikovale u jednom nukleotidu pomoću gel elektroforeze. Sangersekvencira genom bakteriofaga Ø X174 veličine 5375 nukleotida, pritom koristeći 2,3-dideoksinukleotid trifosfate (ddNTP) i DNKpolimerazu. Specifičnost ddNTP-a je odsustvo hidroksilne skupine na 3'kraju, što onemogućuje stvaranje fosfodiesterske veze. DNKpolimeraza ne razlikuje dNTP i ddNTP, stoga se ddNTP mogao ugraditi u rastući lanac molekule DNK vezanjem 5' fosfatne skupine i 3'hidroksilne skupine posljednjeg nukleotida u lancu. Međutim, ugradnjom ddNTP-ova u rastući lanac, dolazi do završetka sinteze lanca zbog nedostatka 3' hidroksilne skupine. Budući da se u pokusu nalaze milijarde molekula DNK, odsječak novo sintetiziranog lanca može biti zaustavljen na bilo kojoj poziciji. To rezultira većim brojem molekula DNK različite duljine. Princip rada automatiziranog sekvencera je prepoznavanje zadnjeg ddNTP-a u lancu koji je obilježen fluorescentnom bojom. Računalni program interpretira podatke te iscrtava elektroferogram s obojenim vrhovima predstavljajući tako svako slovo u nukleinskom slijedu. Simulirana slika čita se s dna prema vrhu, počevši s najmanjim fragmentom DNK. Sangerova metoda smatra se metodom sekvenciranja prve generacije (eng. "first-generation" sequencing), dok metode sekvenciranja druge i treće generacije nazivamo metodama sekvenciranja novih generacija (eng. "next-generation" sequencing).

4.4.4. *Sekvenciranje Maxam-Gilbert metodom*

Maxim-Gilbertova tehnika u principu se bazira na kemijskom razlaganju pojedinih baza. Sekvencioniranje Maxam-Gilbert metodom zahtijeva radioaktivno označavanje na 5'kraju fragmenta DNK koji se sekvencira i pročišćavanjem DNK. Kemijska reakcija stvara pauze u malom postotku jedne ili dvije od četiri nukleotidne baze u svakoj od četiri reakcije (G, A + G, C, C + T). Na primjer, purini (A + G) su depurirani pomoću mravlje kiseline, gvanini (i do određene mjere adenini) metilirani su dimetil sulfatom, a pirimidini (C + T) su hidrolizirani korištenjem hidrazina. Dodavanje soli (natrijev klorid) u reakciju hidrazina inhibira reakciju timina za reakciju samo s C. Modificirane DNK mogu se zatim odcijepiti vrućim piperidinom; (CH2) 5NH na položaju modificirane baze. Koncentracija modificiranih kemikalija se kontrolira kako bi u prosjeku unijeli jednu modifikaciju po DNK molekuli. Stoga se generira niz obilježenih fragmenata, od radio-obilježenog kraja do prvog "rez" mjesta u svakoj molekuli.Fragmenti u četiri reakcije elektroforeze su jedan za drugim u denaturirajućim akrilamidnim gelovima za odvajanje. Za vizualizaciju fragmenata, gel je izložen rendgenskom filmu za autoradiografiju, dajući niz tamnih vrpci od kojih svaki pokazuje mjesto identičnih radio-obilježenih DNK molekula. Zbog prisutnosti i odsutnosti određenih fragmenata može se zaključiti slijed (sekvenca).

4.5. RAPD metoda

RAPD metoda (eng. Random Amplified Polymorphic DNA), odnosno metoda nasumične amplifikacije polimorfne DNK je metoda koja se zasniva na korištenju slučajnih oligonukleotidnih primera (10 baznih parova) za PCR umnažanje. Razlike u sekvencama DNK između vrsta dovode do različitog umnožavanja DNK. Produkti se razdvajaju na agaroznom gelu uz prisustvo etidijum bromida i promatraju pod UV svijetlom. usporešivanjem s poznatim uzorkom se može provjeriti pripadnost određenoj vrsti. Metoda se pokazala primjenjivom u otkrivanju genetskih varijacija različitih vrsta. Nuklearni genetski markeri u obliku slučajne amplificirane polimorfne DNK (RAPD) su bili potrebni kako bi se razlikovale afričke i europske medonosne pčele. DNA je bila amplificirana odvojeno sa 700 primera po deset baznih parova. Od toga je odabrano pet primera. DNK vrpca amplificirana primerom 539 specifična je za istočnoeuropsku skupinu podvrsta medonosnih pčela, a vrpce amplificirane primerima 652 i 691 su specifične za afričku skupinu podvrsta medonosnih pčela. Preostala dva markera pronađena su u visokim frekvencijama u europskim populacijama (primeri 694 i 514), a u afričkim populacijama su te frekvencije vrlo niske. U skladu s ranijim rezultatima RFLP markera specifičnih za istočnoeuropske pčele, primero 539 bio je odsutan u neotropskim afričkim pčelama. Frekvencije afričkih specifičnih markera (primeri 652 i 691) u neotropskoj populaciji ukazuju na određeni stupanj hibridizacije, možda sa zapadnoeuropskim pčelama (A.Suazo i sur., 1998.).

4.6. AFLP metoda

AFLP (eng. Amplified Fragment Length Polymorphism), odnosno polimorfizam dužine amplificiranih fragmenata je jedan od najznačajnijih i najšire primjenjivanih genetskih markera u brojnim biološkim istraživanjima. Primjenjuje se od molekularne biologije i genetike do mikrobiologije, ekologije i rekonstrukcije evolucijsko-filogenetskih veza i odnosa. Ovo je metoda koja analizira raznolikost duljina fragmenata DNK koji su dobiveni umnožavanjem PCR-om. DNK se prvo cijepa restrikcijskim enzimom, a zatim se određeni fragmenti umnožavaju, te tek nakon toga slijedi analiza (Peleg i sur., 2008.). Ona u sebi, uz pomoć specifičnih PCR adaptera koji se dodaju na restrikcijom dobivene fragmente DNK, ujedinjuje snagu metode RFLP s PCR metodom. Posljednji postupak u ovom procesu je selektivna amplifikacija, kada se u reakcijsku smjesu dodaju prethodno određeni primeri sa poznatim sekvencama, odnosno sekvencama primera koji su korišteni u preamplifikaciji, uz dodatak nekoliko (1-5) asumičnih nukleotida koji se dodaju na 3'kraju. Odrednicu selektivna amplifikacija ovaj postupak je dobio po tome što je selektivno kontroliran. Kao finalni rezultat, od početnog mnoštva fragmenata, amplificiraju se samo određeni, sa obično 50-100 nukleotida. Po završetku amplifikacije ostaje prostor za analizu, koji najprije podrazumijeva elektrogorezu za diferencijaciju molekula DNK po veličini, zahvaljujući različitoj pokretljivosti u električnom polju. Opisana procedura omogućava genetičku identifikaciju i genotipizaciju. Budući da je potpuno sekvenciranje genoma još uvijek teško primjenjivo u populacijsko-genetičkim studijama, znanstvenici raznolikost cjelokupnog genoma procjenjuju na temelju analize relativno malog broja lokusa. Tehnika AFLP je upravo jedna od takvih tehnika. Ona u sebi ujedinjuje gotovo sve osobine koje znanstvenik u području molekularne ekologije i evolucije zahtijeva od metoda za procjenu genetske raznolikosti kao što su: niska cijena, brza primjena, univerzalnost za sve vrste, te pokrivanje velikog broja lokusa. Glavni nedostatak AFLP metoda je nemogućnost razlikovanja dominantnih homozigota od heterozigotnih genotipova. Postoje mnoge prednosti u odnosu na druge tehnologije drugih AFLP markera , uključujući slučajno pojačane polimorfne DNK (RAPD), polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (RFLP) i mikrosatelita. U odnosu na druge metode, AFLP samo nema veću ponovljivost, rezoluciju i osjetljivost na nivou cijelog genoma, ali također ima sposobnost da amplificira između 50 i 100 fragmenata u jednom postupku. Osim toga, bez prethodnih informacija koje su potrebne za amplifikaciju sekvenci Tehnologija AFLP je zaštićena patentima i patentnim prijavama u Keygene N.V.

4.7. Sekvenciranje

Sekvenciranje DNKje najpreciznija i najinformativnija metoda za otkrivanje mtDNK varijacija. To je proces određivanja točnog poretka (sekvencije, niza) nukleotida u molekuli DNK. Podaci sekvenci generiraju haplotipove, koji su istovjetni po porijeklu, a potrebni su za filogenetsku analizu (Arias i Sheppard, 1996.). Također, sekvenciranje je uglavnom korišteno za karakterizaciju novih COI-COII/DraI haplotipova (Franck i sur., 2001.,Collet i sur., 2006.,Shaibi i sur., 2009., Pinto i sur., 2012.).Sekvenciranjem tRNAleu-cox2 regije porijeklom od 48 pčela dobivene su sekvence dužine 571-573 baznih parova. Njihovom analizom uočeno je šest polimorfnih nukleotidnih pozicija na osnovu kojih je identificirano šest haplotipova A. mellifera (Tablica 1).

Tablica 1. Identificirani haplotipovi Apis mellifera na osnovu utvrđenih polimorfnih mjesta unutar tRNAleu-cox2 sekvence

Haplotip pčele	Polimorfno mjesto					
	69 (3431)	112 (3474)	213 (3575)	225 (3587)	270 (3632)	405 (3767)
C1a	C	T	C	G	T	C
C2c	-	-	-	-	-	-
C2aa	-	-	T	-	C	T
C2d	-	-	-	-	C	T
C2e	-	-	-	-	C	T
C2i	-	-	-	A	C	T

*Brojevi izvan zagrade predstavljaju nukleotidne pozicije u dobijenim sekvencama, dok brojevi u zagradi predstavljaju nukleotidne pozicije u ukupnoj mtDNK A. Mellifera

4.8. Analiza alozima

Analiza alozima predstavlja istraživanje alelnih varijacija na enzimskim lokusima, dostupnim gel elektroforezom. Predstavlja prvu vrstu molekularnog markera koji se počeo primjenjivati u istraživanju bioraznolikosti medonosne pčele. Alozimi predstavljaju enzime kodirane iz različitih alela istog gena. Jedan od najvažnijih polimorfnih i najčešće korištenih enzimskih lokusa u istraživanjima varijabilnosti populacija medonosnih pčela je Mdh1 lokus (malat-dehidrogenaza). Njegova varijabilnost je osobito korisna, jer se frekvencije ovih alela uvelike razlikuju između različitih podvrsta medonosne pčele. Međutim, budući da postoje dokazi da se varijabilnost Mdh1 lokusa može tumačiti kao posljedica fiziološke prilagodbe različitim klimatskim uvjetima i pri tome nužno ne odražava protok gena (Coelho i Mitton, 1988., Nielsen i sur., 1994., Cornueti sur. 1995.), zaključuje se da Mdh1 lokus očito nije objektivan pokazatelj populacijske varijacije medonosnih pčela (Meixner i sur., 2013.). Postojanje alozimskih varijacija omogućavalo je istraživačima da provedu filogeografske studije, saznaju više o protoku gena između populacija i postojanju hibridizacije ili da ostvare uvid u strukturu populacija. Ispitivanje varijabilnosti populacija medonosne pčele u Grčkoj na osnovu 15 promatranih lokusa koji su kodirali devet enzima, pokazalo je polimorfizam kod samo dva enzima: malatdehidrogenazu (Mdh) i esterazu (Est) (Badino i sur., 1988.). Razlike u elektroforetskoj pokretljivosti alozima koristile su se i u diferencijaciji vrsta unutar roda Apis. U istraživanju koje suproveli Sheppard i Berlocher (1989.), sedam od 15 posmatranih lokusa pokazalo je polimorfizam između vrsta A. mellifera, A. cerana, A. dorsata i A. florea, pri čemu je najmanje polimorfnih lokusa utvrđeno za A. dorsata, a najviše za A. mellifera. Osim toga, za sedam lokusa postojale su alozimske varijante koje su se pojavljivale samo kod određene vrste pčela, dok je za tri lokusa enzim u identičnoj formi bio prisutan kod sve četiri ispitivane vrste. Ovakvi rezultati ukazivali su na postojanje značajnih alozimskih razlika unutar roda Apis, ali i na nemogućnost rješavanja filogenetskih odnosa isključivo na osnovu njihovog korištenja. Alozimski markeri korišteni su i za determinaciju različitih podvrsta roda Apis i njihovih hibrida, pri čemu je u metodologiji korišten i novi lokus Est-6. Statističkom obradom rezultata dobivene su tri grupe pčela koje su odgovarale geografskoj zastupljenosti čistih podvrsta i njihovih hibrida u graničnom području, čime je potvrđena pouzdanost alozimskih markera u determinaciji (Comparini i Biasiolo, 1991.).

4.9. DNK mikrosateliti

DNK mikrosateliti ili SSR (eng. Simple Sequence Repeats) predstavljaju dijelove molekule DNK koje čine nizovi od dva do šest baznih parova, a koji se u kontinuitetu ponavljaju od pet do s to i više puta po jednom genskom lokusu. Mikrosateliti se klasificiraju prema broju pripadajućih nukleotidaza ponavljanje, kao što su: *mono*, *di*, *tri*, *tetra*, *penta* ili *heksanucleotidi*. Klasifikacija uključuje standarde: čisti ili savršen. Čisti ili savršeni znači da se jedan motiv ponavlja *n* puta, kao $(AC)_{9.}$ Čisti isprekidani da se jedan motiv ponavlja *n* puta, gdje se nukleotidi ubacuju između različitih ponavljanja, npr$(CA)_2AA(CA)_{12.}$ Miješani podrazumijeva dva ili više ponavljanja motiva u seriji, , kao $(GT)_2(TG)_{10.}$ Miješani isprekidani, najmanje jedan predstavlja prošarano-isprekidano pojavljivanje nukleotida, npr: $(CT)_4(GT)_2CTAT(GT)_{15.}$ Kompleksni uključuje kombinacije bilo kojeg od navedenih klasa, bez ikakvog definiranog obrasca u poretku, npr. $(ACC)_8+TG+(GA)_{12}+(TTA)_5+GC+(TTA)_{4.}$ Ovi molekularni markeri prisutni su u genomu eukariota i u kloroplastima biljnih stanica, a zahvaljujući kodominantnom načinu nasljeđivanja vrlo su pogodni za genetsko-populacijska istraživanja, mapiranje genoma, kao i za utvrđivanje roditeljstva kod ljudi i životinja. Mikrosateliti su upotrebljivi za genetičke analize, jer je broj ponavljanja individualno drugačiji i zato se sekvenciranjem DNK restrikcijskim enzimima, kod različitih jedinki, dobiju fragmenti različitih dužina. Na ovaj način se jednostavno identificiraju polimorfizmi DNK molekula. Analiza dužine mikrosatelita na određenom mjestu (genskom lokusu) u određenom

genomu se odvija putem polimerazne lančane reakcije (PCR). U ovom slučaju, upotrebljavaju se kratki sintetički oligonukleotidi, tzv. primeri, koji su komplementarni onima u DNK sekvenci na proučavanom mikrosatelitu. Dva (obično različita) PCR proizvoda mogu biti odvojeni u gelu, pri čemu se se određuje i njihova dužina. DNK mikrosateliti su se pokazali vrlo pogodnim za razlikovanje populacija medonosne pčele. Tako je determinacija podvrsta *A. mellifera* porijeklom iz Afrike i Europe utvrđena na osnovu polimorfizama sedam mikrosatelita koji su po lokusu imali 7-30 alela, čime su potvrđeni rezultati o postojanju tri evolucijske linije pčela, prethodno dobiveni metodama morfometrije i analizom mtDNK (Estoup i sur., 1995.). Značajan doprinos molekularnim istraživanjima varijabilnosti *A. mellifera* dali su Solignac i sur. (2003.) definiranjem više od 550 mikrosatelitnih markera koji su se, osim što su bili polimorfni, mogli primijeniti i u istraživanjima ostalih vrsta roda *Apis*.

4.10. DNK minisateliti

Minisatelit je dio DNK koji se sastoji od kratke serije baza 10-60 baznih parova. Minisateliti se javljaju na više od 1.000 lokacija u ljudskom genomu. Neki minisateliti sadrže centralnu sekvencu s nizom „GGGCAGGANG“ (gdje N može da bude bilo koja baza) ili generalnije naklonost pojavi purina (adenozin (A) i guanin (G)) na jednom lancu i pirimidina (citozin (C) i timin (T)) na drugom. Po jednoj pretpostavki ove regije olakšavaju zamjenu DNK između kromosoma. U alternativnim modelima, prisustvo susjednih cis-djelujućih mejotičkih dvolančanih prekida su primarni uzrok varijacija broja minisatelitnih ponavljanja. Pretpostavlja se da do somatskih promjena dolazi uslijed replikacijskih poteškoća. Kad do toga dođe, prave se greške koje uzrokuju minisatelite na preko 1000 lokacija u genomu jedne jedinke da imaju neznatan različiti broj ponavljanja, što čini svaku jedinku jedinstvenom. Minisatelitni lokus koji najviše varira je CEB1 (D2S90). Minisateliti se razlikuju od mikrosatelita (takozvanih kratkih tandemnih ponavljanja ili STR). STR-ovi su također ponavljajuće sekvence, ali su one obično 2-13 nukleotida dugačke. Termin minisatelit se često koristi kao sinonim za skraćenicu VNTR.

4.10.1. *VNTR metoda*

Minisatelitni VNTR (eng. Variable number tandem repeat), odnosno varijabilnost broja tandemskih ponavljanja su tipski minisatelitni markeri. Njihova ukupna dužina varira od 500 do 10.000 baznih parova, a repetitivne sekvence obično od 10 do 35 baznih parova. Većina ovih polimorfnih markera se nalazi u ne kodirajućim dijelovima genoma, što znači da nisu podložni selekcijskom pritisku. Zbog toga su izvrsni markeri za identifikaciju različitih bioloških sustava. Posebno su i informativni jer broj njihovih alternatvnih alelnih varijacija doseže i preko 100. Ovi lokusi imaju i visoku stopu mutiranja, što rezultira velikim brojem detektibilnih varijanti. Varijabilnost broja tandemskih ponavljanja se ogleda u varijaciji većeg broja lokacija sa kratkim nukleotidnim sekvencama tandemskih ponavljanja, koje se u genomu višekratno ponavljaju. Mogu se naći na mnogim kromosomima, a često pokazuju međuindividualne varijacije u dužini. Svaka varijanta djeluje kao naslijedni alel, što omogućava da se koristite za osobnu ili roditeljsku identifikaciju. Njihova analiza je korisna u genetičkim i ostalim biološkim istraživanjima, forenzici i DNK profiliranju.

4.11. SNP markeri

SNP marker (eng. Single Nucleotide Polymorphism) ili polimorfizam jednog nukleoti daje vrsta genetskog markera koji prikazuje zamjenu jednog nukleotida nekim drugim nukleotidom. Primjerice, ako je promatrana sekvenca na određenoj lokaciji gena promatrane biološke vrste sastavljena od niza nukleotida AAGC**C**TA, a zatim nastane promjena redoslijeda nukleotida, kao npr. AAGC**T**TA. SNP je još često nazivan i „snip“. U svakom genomu postoji velik broj SNP-ova, te da bi se neka alteracija nukleotida smatrala SNP-om mora se pojavljivati u barem 1% populacije. Uzrok RFLP-a je SNP u ponavljajućoj sekvenci, međutim mali broj SNP-ova stvara RFLP-ove jer sekvencu u kojoj leži SNP ne prepoznaje ni jedan restrikcijski enzim. Za otkrivanje SNP mutacija odnosno utvrđivanje bilo koje poznate točkaste mutacije u DNK koristi se ARMS metoda koja je brža, jednostavnija i znatno ekonomičnija od metode sekvenciranja. Za razliku od ljudi postoji samo jedan komercijalni SNP test za pčele. Jedan od pokusa je izradio Spötter i sur. (2012.) za otkrivanje Varroa tolerancije kod kranjske pčele (*A. melliferacarnica)* i omogućuje analizu od 44.000 lokusa. SNP markeri imaju veliki potencijal za primjenu iz dva razloga. Na analitičkoj razini, pokrivenost cijelog genoma (kodirajuće i ne kodirajuće regije) potencijalno vodi do pouzdane identifikacije i točnije procjene razina introgresije. Na tehničkoj razini, to je mogućnost korištenja novih tehnologija koje omogućuju genotipizaciju visoke kvalitete, kvalitetu podataka i lako kalibriranje među laboratorijima, te tako olakšavaju analizu velikih količina podataka, razmjenu podataka među laboratorijima i razvoj javnih baza.Velika prednost SNP markera je njihov veliki broj i raspršenost po genomu te mogućnost ispitivanja metodama koje ne koriste elektroforezu gelom koja se pokazala teškom za automatiziranje. Detekcija SNP-a je brža jer je osnovana na oligonukleotidnoj hibridizacijskoj analizi. Uz navedena svojstva, SNP-ovi su i evolucijski stabilni, ne dolazi do velikih promjena iz generacije u generaciju, što

olakšava njihovo praćenje u populacijskim istraživanjima.

4.11.1. *ARMS metoda*

ARMS (eng. Amplification Refractory Mutation System) je jednostavan način za otkrivanje bilo koje mutacije koja uključuje promjene jedne baze ili male delecije. ARMS se temelji na korištenju sekvenci-specifičnih PCR primera koji omogućuju pojačanje ispitivane DNK samo kada se ciljani alel nalazi unutar uzorka. Odnosno, omogućuje genotipizaciju isključivo pregledom reakcijskih smjesa nakon agarozne gel elektroforeze. Ova metoda ne zahtijeva digestiju restrikcijskog enzima, sve specifične oligonukleotide, kao što je uobičajeno, niti analizu sekvenci PCR produkata. Standardni ARMS PCR sastoji se od dvije komplementarne reakcije (dvije cijevi) i koristi 3 primera. Jedan primer je konstantan i komplementaran predlošku u obje reakcije, ostali primeri razlikuju se na 3 'terminalnim reziduama i specifični su za divlji tip DNK sekvence ili mutirani slijed u određenoj bazi - samo jedan od tih primera se koristi po cijevi. PCR produkti su razdvojeni elektroforezom kroz agarozni gel koji sadrži etidium bromid. Ako je uzorak homozigotan mutirani ili homozigotan divlji tip pojačanja će se pojaviti samo u jednoj od cijevi, ako je uzorak heterozigotan pojačanje će se vidjeti u obje cijevi.

5. ZAKLJUČAK

Genetska varijabilnost u populaciji je osobito važna za održavanje bioraznolikosti, jer bez nje se jedinka i populacija ne mogu dugoročno prilagođavati promjenama životnih uvjeta. Kako bi se identificirala bioraznolikost, potrebno je determinirati različite populacije i ekotipove pčela. Determinacija se provodi morfometrijskim analizama (dužina i širina tijela, oblik, boja, površina), a za bolji uvid u taksonomske odnose medonosnih pčela preporučuju se molekularne metode koje su znatno brže i preciznije. U molekularne metode pripadaju analiza mitohondrijske DNK te analiza nuklearnih markera (analiza alozima, DNK mikrosateliti, DNK minisateliti, PCR-RFLP, AFLP, RAPD, SNP markeri). Metode molekularne genetike omogućuju korištenje molekularnih informacija za utvrđivanje srodstvenih odnosa između vrsta i dobivanje precizne klasifikacije pčela. Zbog iznimne gospodarske, poljoprivredne i ekološke važnosti, medonosna pčela je vrsta koju je potrebno zaštiti i očuvati.

6. LITERATURA

1. Arias, M C; Sheppard, W S (1996): Molecular phylogenetics of honey bee subspecies (Apis mellifera) inferred from mitochondrial DNA sequence. Molecular Phylogenetics and Evolution 5: 557–566
2. Badino G., Celebrano G.,, Manino A., Ifantidis M**.** (1988): Allozyme variability in a central Anatolian honeybee (Apis mellifera L) population
3. Coelho J. R., Mitton J. B. (1988): Oxygen consumption during hovering is associated with genetic variation of enzymes in honey bees. Functional Ecology 2: 141-146
4. Collet T., Ferreira K. M., Arias M. C., Soares A. E. E., Del Lama M. A. (2006). Genetic structure of Africanized honey bee populations (Apis mellifera L.) from Brazil and Uruguay viewed through mitochondrial DNA COI–COII patterns. 97: 329-335

5. Cornuet J. M., Oldroyd B. P., Crozier R. H. (1995): Unequal thermostability of allelic forms of malate dehydrogenase in honey bees. Journal of Apicultural Research 34: 45

6. Estoup A., Gsrnery L., Solignac M., Cornuet J. M. (1995): Microsatellite variation in honey bee (Apis mellifera L) populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. Genetics 140: 679-695

7. Franck, P., Garnery, L., Loiseau, A. (2001): GeneΘ c diversity of the honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. Heredity 86, 420–430

8. F. Sanger, Nicklen S., Coulson A. R. (1997): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors13. Fancj, P; Garnery L., Loisesu A. (2001): Genetic diversity of the honey bee in Africa: microsatellite and mitochondrial data. 86: 420–430for DNA sequence evolution. Molecular Biology and Evolution 4: 203-221

9. Harrison J., Nielsen I., Page R. (1988.): Malate Dehydrogenase Phenotype, Temperature and Colony Effects on Flight Metabolic Rate in the Honey-Bee, Apis mellifera

10. Levinson G., i Gutman G.A. (1987): Slipped-Strand Mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. Molecular Biology and Evolution 4: 203-221.

11. 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 (4), 1-28

12. Mortiz R. F.A., Hellman M (1986); Throphallaxis of worker honey bees Apis Niellifera L. of diferente ages

13. Nielsen D., Page J. R. E., Crodlsnd M. W. J. (1994): Clinal variation and selection of MDH allozymes in honey bee populations. Experientia 50: 867-871

14. Pinto M. A., Munoz I., Chavez-Galarza J., De La Rua P. (2012): The Atlantic side of the Iberian peninsula: a hot-spot of novel African honey bee maternal diversity. 43: 663-673

15. Ruttner F, (1988.): Biogeography and taxonomy of honey bees. Springer-Verlag; Berlin, Germany. ISBN 0387177817

16. Shaibi T., Muñoz I., Dall′Olio R., Lodesani M., De la Rúa P., Moritz R. F. A. (2009): Apis mellifera evolutionary lineages in Northern Africa: Libya, where orient meets occident. Insectes Sociaux 56: 293-300

17. Solignac M., Vautrin D., Loiseau A., Mguel F., Baudey E., Estroup A., Garnery L., Habel M., Cornuet J. M. (2003): Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honey bee (Apis mellifera L.) genome. Molecular Ecology. 3: 307-311.

18. Spötter A, Gupta P, Nürnberg G, Reinsch N, Bienefeld K. Development of a 44 K SNP assay focussing on the analysis of a varroa-specific defence behaviour in honey bees (Apis mellifera carnica) Mol Ecol Resour. 2012;12(2):323–32

19. Spötter A., Gupta P., Nürnberg G., Reinsch N., Bienefeld K. (2012): Development of a 44K SNP assay focussing on the analysis of a varroa-specific defence behaviour in honey bees (Apis mellifera carnica). Molecular Ecology. 12: 323-332

20. Suazo A., McTiernan R., Hall H.G. (1998): Differences between African and European honey bees (Apis mellifera L.) in random amplified polymorphic DNA (RAPD)

21. Uzonov A., Kiprijanovska H., Adonov S., Naumovski M., Gregorc A. (2009): Morphological diversity and racial determination of the honey bee (Apis mellifera L.) populatinon in the Republic of Macedonia.