

(Pagal priemonę „Moksliniai tyrimai bitininkystės sektoriuje“ atlikto tyrimo ataskaitos forma)

**VALSTYBINIS MOKSLINIŲ TYRIMŲ INSTITUTAS GAMTOS TYRIMŲ CENTRAS**

(nurodomas tyrimą atlikusios institucijos pavadinimas)

**I. PAGRINDINIAI DUOMENYS APIE TYRIMĄ**

Pavadinimas

(Nurodomas tyrimo pavadinimas, ne daugiau kaip 100 spaudos ženklų)

**Tamsiosios vakarinės medunešės bitės *Apis mellifera mellifera* Lietuvos populiacijos tyrimai**

Kryptis

(Nurodoma, kuriai kryptčiai pagal 2023–2027 m. strateginio plano sektorinės intervencinės priemonės priskiriamas tyrimas)

8.3.3. bičių biologijos, veislininkystės, ekologijos ir genetiniai tyrimai

**II. TYRIMO VYKDYTOJAI**

(Aprašomi asmenys, kurie vykdė tyrimą, surašomi nurodyti duomenys)

Eil. Nr.	Pareigybė atliekant tyrimą (pasirenkama)	Mokslo laipsnis	Vardas, pavardė	Telefonas, el. paštas	Darbovietės pavadinimas, pareigos
Tyrimo vadovas					
1.	Tyrėja pagal autorinę sutartį	Dr.	Laima Blažytė-Čereškienė	+37068584622, laima.blazyte@gamtc.lt	Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Gamtos tyrimų centras (GTC), vyresnioji mokslo darbuotoja
Kiti tyrimo vykdytojai					
2.	Tyrėjas pagal autorinę sutartį	Dr.	Eduardas Budrys	068571877, eduardas.budrys@gamtc.lt	GTC, vyriausiasis mokslo darbuotojas
3.	Tyrėja pagal autorinę sutartį	Dr.	Svetlana Orlovskytė	067836860, svetlana.orlovskyte@gamtc.lt	GTC, vyresnioji mokslo darbuotoja
4.	Tyrėja pagal autorinę sutartį	Dr.	Rasa Čepulytė	060312688 rasacepulyte@gmail.com	GTC, vyresnioji mokslo darbuotoja

**III. SANTRUMPOS IR SUTARTINIAI ŽENKLAI**

Santrumpa ar sutartinis ženklas	Paiškinimas
SNP	vieno nukleotido polimorfizmo (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
COI–COII	citochromo c oksidazės I ir II subvienetai
DNR	dezoksiribonukleorūgštis
PGR	polimerazės grandininė reakcija

#### IV. PAGRINDINIŲ REZULTATŲ SANTRAUKA

*Glaustai pateikiami pagrindiniai tyrimo rezultatai lietuvių kalba (ne daugiau kaip 4 000 spaudos ženklų).* Europos Sąjunga biologinės įvairovės atkūrimą ir apdulkintojų apsaugą laiko strateginiu prioritetu, ypatingą dėmesį skirdama medunešėms bitėms (*Apis mellifera*). Lietuvoje istoriškai paplitęs tamsiosios vakarinės medunešės bitės (*A. m. mellifera*) porūšis yra prisitaikęs prie vietinių klimato ir augalijos sąlygų, tačiau jo populiacija sumažėjo dėl svetimkraščių bičių įvežimo ir mišrinimosi. Dzūkijos nacionaliniame parke bei aplinkinėse teritorijose dar aptinkama vietinės kilmės bičių, todėl čia įsteigtas motinų poravimosi punktas, užtikrinantis geresnes sąlygas išlaikyti gryną porūšį. Vis dėlto genetinės taršos rizika išlieka, nes nėra teisinio ribojimo kitiems porūšiams laikyti aplinkinėse vietovėse.

2024–2025 m. tyrimai parodė, kad tik viena šeima (RA73) visiškai atitiko senąjį 1970 m. morfometrinių standartą, o penkios – 1984 m. aprašytus požymius. Pusės tirtų motinų genotipe *A. m. mellifera* dalis siekė  $\geq 70\%$ , o kitose pastebėta ryški introgresija su *A. m. carnica* ir kitais porūšiais. Marcinkonių apylinkėse sugauti spiečiai daugiausia priklausė M linijai, vyraujant M4fa mitotipui, o kitose Lietuvos vietovėse nustatyti net trys iki šiol nefiksuoti M linijos mitotipai. Tolesniam dauginimui rekomenduojama naudoti LC14-25 (M4na) spiečių, o genetinei įvairovei palaikyti – šeimas GR19 ir MNAD3-25. Asociacija „Lietuvos tamsioji bitė“ bei tiriamų bitynų savininkai gavo detalias rekomendacijas dėl atrankos ir selekcijos. Sisteminė genetinė kontrolė ir selekcinis darbas laikomi būtinomis sąlygomis vietinės tamsiosios bitės populiacijos išsaugojimui bei atkūrimui.

#### V. TURINYS

##### ĮVADAS

##### 1. TYRIMO METODAI

##### 1.1. Tyrimo objektas ir vieta

##### 1.2. Genetiniai tyrimai

##### 1.3. Morfometriniai tyrimai

##### 2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

##### 2.1 Motinų poravimosi punkto populiacijos tyrimas

##### 2.2. Atskridusių spiečių analizė

##### 2.3. Naujų *Apis mellifera mellifera* bičių šeimų paieška už DNP ribų

##### IŠVADOS IR REKOMENDACIJOS

##### NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS

*ĮVADAS (glaustai pristatomas tyrimo tikslas, objektas ir nurodomi uždaviniai, kuriuos buvo siekiama išspręsti; ne daugiau kaip 2 000 spaudos ženklų).*

Biologinės įvairovės atkūrimas ir išsaugojimas yra vienas iš strateginių Europos Sąjungos (ES) prioritetų, kuriame ypatingas dėmesys skiriamas apdulkintojų apsaugai (<https://www.europarl.europa.eu>). Tarp jų svarbią ekologinę ir ekonominę reikšmę turi medunešės bitės (*Apis mellifera*), kurios atlieka esminį vaidmenį apdulkindamos tiek kultūrinius, tiek laukinius augalus. Su šia funkcija efektyviausiai susidoroja vietiniai bičių porūšiai, kurie per tūkstančius metų evoliucionavo kartu su vietine augalija ir prisitaikė prie specifinių aplinkos sąlygų, taip užtikrindamos ekosistemų pusiausvyrą.

Centrinė ir Šiaurės Europa, įskaitant Lietuvą, istoriškai priklauso *Apis mellifera mellifera* porūšio – vadinamosios tamsiosios medunešės bitės – natūraliam arealui. Šio porūšio populiacijos reikšmė siejama su ilgu kartu su vietine augalija vykusiu evoliuciniu procesu, leidusiu išvystyti adaptacijas, būtinas išgyvenimui vietinėmis klimato ir augalijos sąlygomis. Tačiau pastaraisiais dešimtmečiais šios bitės atsidūrė ties išnykimo riba dėl nekontroliuojamo kitų, dažnai komerciškai

naudojamų svetimkraščių bičių porūšių įvežimo ir jų neribojamo mišrinimosi su vietinėmis populiacijomis.

Lietuvoje ilgą laiką buvo manyta, kad *A. m. mellifera* populiacija yra išnykusi. Tačiau naujausi genetiniai tyrimai parodė, kad tam tikruose tradiciniuose bitynuose vis dar egzistuoja šio porūšio motininių linijų, kurių pagrindu yra įmanoma išlaikyti bent dalinį vietinį genofondą. Be to, išsilaikiusi genetinė įvairovė, kuri būdinga natūralioms gamtinėms populiacijoms, patvirtina populiacijos vietinį evoliucijos kelią (Orlovskytė et al., 2024).

Viena reikšmingiausių vietovių, kur aptinkama šio porūšio bičių, yra Dzūkijos nacionalinis parkas (DNP) ir jo apylinkės. Čia išskirtinė gamtinė aplinka – Dainavos giria, unikali ekosistema ir nedidelis žmogaus veiklos poveikis – sudaro palankias sąlygas vietinių tamsiųjų bičių populiacijai klestėti. Tyrimų duomenimis, čia esančiose bičių šeimose vyrauja vietiniam porūšiui būdingos genetinės ir morfologinės savybės (Blažytė-Čereškienė et al., 2021).

Atsižvelgiant į tai, DNP teritorijoje pradėtos taikyti sistemingos vietinio porūšio išsaugojimo priemonės. Asociacijos „Lietuvos tamsioji bitė“ ir parko darbuotojų iniciatyva netoli Čepkelių valstybinio gamtinio rezervato įsteigtas *A. m. mellifera* bičių motinų poravimosi punktas. Ši vieta pasirinkta dėl atokumo, didelio miškingumo ir minimalaus antropogeninio poveikio. Nemažu spinduliu aplink punktą (6 km) nėra bitynų, o gamtoje gyvenančios bičių šeimos formuoja potencialiai gryną vietinę tranų populiaciją. Dėl to užtikrinamos palankios sąlygos kontroliuojamam poravimuisi su vietiniu porūšiu.

Vis dėlto kasmet vykdomi spiečių genetiniai tyrimai atskleidžia svetimkraščių bičių porūšių atklydimą, tokiu būdu keliamą riziką vietinei populiacijai ir su tuo susijusią genetinę taršą (Blažytė-Čereškienė et al., 2023, 2024). Pagrindinis iššūkis šiuo atveju yra teisinio reguliavimo nebuvimas: kol nėra įsteigta saugoma teritorija, kurioje būtų ribojamas kitų porūšių bičių laikymas, populiacijos mišrinimosi grėsmė išlieka reali. Tokia situacija ypač aktuali bitynams, esantiems už 6 km ribos nuo poravimosi punkto.

Dėl šių priežasčių būtina taikyti nuoseklią genetinės kontrolės strategiją. Tai apima kasmetinius susiporavusių motinų genetinius tyrimus bei morfometrinius jų palikuonių vertinimus. Tokie tyrimai leidžia identifikuoti svetimkraščių porūšių genų introgresiją, pašalinti netipines šeimas iš veislinės populiacijos ir atrinkti grynąsias *A. m. mellifera* šeimas tolesniam motinų auginimui bei tėvinių šeimų formavimui. Tik sistemingas selekcinis darbas ir griežta genetinė atranka gali užtikrinti vietinio porūšio stabilų išsaugojimą bei jo atkūrimo sėkmę.

Projekto tikslas – tamsiosios vakarinės medunešės bitės *Apis mellifera mellifera* Lietuvos populiacijos morfometriniai ir genetiniai tyrimai, siekiant atrinkti bičių šeimas populiacijos palaikymui.

Uždaviniai:

1. Įvertinti 2024 m. suformuotų bičių šeimų, išaugintų iš Čepkelių gamtinio rezervato teritorijoje susiporavusių motinų, morfometrinius požymius ir jų atitikimą *Apis mellifera mellifera* porūšio Lietuvos populiacijos standartui.
2. Atrinktose bičių šeimose įvertinti svetimkraščių porūšių branduolio DNR genų introgresiją, naudojant vieną iš naujausių genetinių metodų – vieno nukleotido polimorfizmą (angl. *single nucleotide polymorphism*, SNP).
3. Nustatyti 18 km spinduliu aplink Marcinkonis esančiuose bitynuose naujai atskridusių spiečių evoliucines linijas (M ar C), naudojant mitochondrinės DNR (mtDNR) tarpgeninio COI–COII intarpo žymenis, ir atlikus sekoskaitą, nustatyti *A. m. mellifera* porūšių atitinkančių bičių šeimų / spiečių motinines linijas (mitotipus).
4. Siekiant neprarasti genetinės įvairovės, atlikti tinkamų M linijos bičių šeimų paiešką ir kitose Lietuvos vietovėse, nutatyti jų mitotipus.
5. Pagal morfometrinius ir genetinius požymius atrinkti tolesniam dauginimui ir *A. m. mellifera* populiacijos palaikymui tinkamiausias bičių šeimas ir spiečius, tokiu būdu siekiant išlaikyti jų genetinę įvairovę.

6. Suinteresuotoms institucijoms / organizacijoms pateikti rekomendacijas dėl tolesnių veiksmų saugant Lietuvos tamsiosios bitės populiaciją.

DĖSTOMOJI ATASKAITOS DALIS (išdėstoma tyrimų metodika, įvertinamas jos patikimumas ir tikslumas, išvardijami pagal paraiškoje pateiktą kalendorinį darbų planą numatyti atlikti darbai, nurodoma, kurie darbai atlikti, kurie ne; dėl neatliktų darbų paaiškinama, kodėl jie neatlikti. Pateikiami svarbiausi tyrimo rezultatai (lyginant su kitų tyrėjų rezultatais), nurodoma jų reikšmė. Jei gauti rezultatai išdėstyti ataskaitos prieduose pateikiamų mokslinių publikacijų kopijose, priimtų ar parengtų spaudai straipsnių ir kt. kopijose, ataskaitoje jie tik cituojami, t. y. pažymimi nuorodose ar išnašose (ataskaitos apimtis neribojama). Ataskaitoje turi būti pateikta tik ta informacija, kurią galima skelbti viešai).

## 1. TYRIMO METODAI

### 1.1. Tyrimo objektas ir vieta

Tyrimams buvo rinkti *Apis mellifera* bičių mėginiai iš 3 skirtingų šaltinių:

1. Motinių poravimosi punkto populiacija. Siekiant įvertinti motinių poravimosi punkto aplinką – tranų foną, mėginiai buvo surinkti iš 24 bičių šeimų, kurių motinos susiporavo poravimosi punkte, esančiame DNP teritorijoje. Šių šeimų mitotipai, nustatyti pagal mtDNR COI–COII tarpgeninio intarpo sekas, buvo žinomi iš ankstesnių tyrimų (Blažytė-Čereškienė et al., 2024). Atlikti morfometriniai tyrimai parodė tranų foną 2024 m., o vertinta svetimkraščių genų introgresija, taikant vieno nukleotido polimorfizmo (angl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) analizę, atskleidė, kiek hibridizuotas yra motinos genomas.
2. Natūraliai atskridę spiečiai. Surinkti 21 spiečiaus mėginiai iš bitynų, esančių iki 18 km atstumu nuo motinių poravimosi punkto Čepkelių rezervate (1 lentelė). Šiems mėginiams atlikta genetinė analizė, kurios metu pagal mtDNR COI–COII tarpgeninio intarpo seką identifikuota evoliucinė bei motininė linijos. Spiečiai, kurių motinos linija identifikuota kaip *A. m. mellifera*, toliau tirti morfometriškai.
3. Naujos bičių šeimos už DNP teritorijos. Buvo ištirta 31 bičių šeima iš bitynų, esančių Trakų, Raseinių, Ignalinos ir Ukmergės rajonuose (1 lentelė). Šių bitynų savininkai teigė laikantys tamsiąsias bites (*A. m. mellifera*). Tirtas jų mtDNR COI–COII tarpgeninis intarpas, siekiant nustatyti šeimų evoliucinę ir motininę linijas. Tik tos šeimos, kurioms buvo patvirtinta *A. m. mellifera* motinos linija, įtrauktos į tolesnę morfometrinę analizę.

1 lentelė. Bičių mėginių rinkimo vietos ir tirtų šeimų skaičius.

Bityno kodas	Rajonas	Vietovė	Bičių šeimų skaičius
<b>2025 m. spiečiai</b>			
MGAR	Varėnos	Marcinkonys	11
LC	Varėnos	Marcinkonys	5
DNP	Varėnos	Musteika	3
RN	Varėnos	Musteika	1
D	Varėnos	Drevių takas	1
<b>Anksčiau netirtos bičių šeimos už DNP ribų</b>			
MNA	Trakų	Aukštadvaris	10
GR	Raseinių	Pryšmantai	16
APŠ	Ignalinos	Apšiūtos	1
BER	Ignalinos	Bernotai	1
AK	Ukmergės	Samantonys	3
Viso:			52

Kiekvieną mėginį sudarė po 20–30 bičių darbininkių arba 30 bičių tranų lėliukių, surinktų iš vienos bičių šeimos. Kiekvieno mėginio bitės buvo užpildtos 96 % etanoliu, transportuotos į laboratoriją ir paliktos saugoti –20 °C temperatūroje iki tolesnių analizės procedūrų.

## 1.2. Genetiniai tyrimai

### 1.2.1. Mitochondrinės DNR COI–COII tarpgeninio intarpo sekos analizė

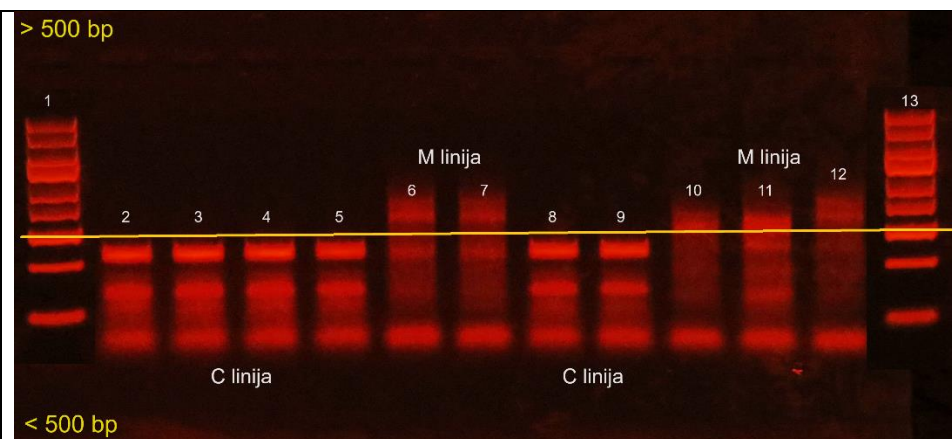
Bendra genominė DNR buvo skirta iš 1–2 mm<sup>3</sup> dydžio plaušelių krūtinės raumenų naudojant DNR išskyrimo rinkinį „GeneJET Genomic DNA Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva).

Polimerazinės grandininės reakcijos (PGR) metu daugintas mitochondrinės DNR tarp citochromo c oksidazės 1 ir 2 subvienetų esantis nekoduojantis tarpgeninis intarpas (mtDNR COI–COII) su T3AmelCOI3-f (5'-attaaccctcactaaagatcattcacatttagaaattccat-3') ir T7AmelCOII5-r (5'-aatacagactactatagatgaaatgaaattaaattatcagc-3') pradmenimis, susintetintais Metabion (Vokietija). Į PGR mišinį įėjo po 12,5 µl 2x DreamTaq PCR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva), 2,5 µl (10 pmol/µl) kiekvieno pradmens, 2 µl DNR ir 5,5 µl dejonizuoto H<sub>2</sub>O. PGR atlikta šiomis sąlygomis: 5 min 95 °C – pradinė DNR grandinių denatūracija, 35 ciklai, sudaryti iš 40 s 94 °C denatūracijos, 40 s 61 °C pradmenų prisijungimo ir 1 min 30 s 74 °C grandinių sintezės, bei 7 min 74 °C – galutinė sintezė.

PGR sėkmingumas bei porūšių nustatymas vertintas horizontaliosios elektroforezės būdu, užnešant PGR produktus į 1,5 % agarozės gelį, dažytą Roti Gelstain Red (Karl Roth, Vokietija) dažais ir nardintą į 0,5x TBE buferį (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva). Sekų ilgiai nustatyti pagal GeneRuler Express liniuotę (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva), geliai dokumentuoti 254 nm UV šviesoje.

Evoliucinė linija nustatyta pagal sekos ilgį: apie 400 bp siekiančios sekos priskirtos C (sekoskaitai paimta po 1 mėginį iš šeimos), 600 bp – M evoliucinei linijai (sekoskaitai paimta po 2 mėginius iš kiekvienos šeimos) (1 pav.). Sėkmingai padauginta DNR valyta egzozonukleazės I (20 U/µl) ir FastAP termojaudrios alkalino fosfatazės (1 U/µl) fermentais (Thermo Fisher Scientific Baltics, Lietuva). Paruošti mėginiai siųsti į MacroGen Europe sekoskaitos centrą (Nyderlandai), kuriame dvipusė Sangerio sekoskaita atlikta 3730xl DNR analizatoriumi (Applied Biosystems, JAV).

Po sekoskaitos gautos DNR sekos lygintos BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999) programa. Jų ilgis, svyravęs tarp 352 bp (C linija) ir 606–607 bp (M evoliucinė linija), sumažintas nuo jų pašalinant tRNR-leu ir COII fragmentus paliekant tik tarpgeninį intarpą (vadinamąsias P ir Q sekas), kurio kintamumas, priklausomai nuo evoliucinės linijos ir mitotipo, svyravo nuo 192 bp (C linija) iki 446–447 bp (M linija). M evoliucinės linijos mėginių mitotipai nustatyti lyginant naująsias sekas su ankstesnių tyrimų metu gautais duomenimis (Orlovskytė et al., 2024; nepublikuoti duomenys). Sekose esančios pakaitos ir insercijos / delecijos buvo koduotos pagal P. Franck et al. (2000) metodą. Fasta formatas konvertuotas į Nexus su ClustalX2 (Larkin et al., 2007) programa. Mitotipų tinklas braižytas su PopArt 1.7 programa (Leigh, Bryant, 2015) pritaikius Median-Joining algoritimą (Bandelt et al., 1999); į jį įtrauktos ir anksčiau nustatytų mitotipų sekos (Orlovskytė et al., 2024; nepublikuoti duomenys).



1 pav. Agarozės gelio nuotrauka su *Apis mellifera* šeimų mtDNR COI–COII PGR produkto mėginiais po atliktos elektroforezės: 1, 13 – liniuotės su skirtingo ilgio DNR atkarpomis, 2–12 – tiriamų mėginių DNR sekos. Trumpesnės už 500 bp liniuotės atkarpą sekos priklauso C linijai (2–5, 8–9), lygios ar ilgesnės – M evoliucinei linijai (6–7, 10–12).

### 1.2.2. Vieno nukleotido polimorfizmo (SNP) analizė

SNP (vieno nukleotido polimorfizmo) analizė buvo atlikta siekiant nustatyti svetimkraščių genų introgresiją *Apis mellifera mellifera* branduolinėje DNR. Tyrimas leido įvertinti daugiau nei 70 000 polimorfinių vietų bičių genome. Šis metodas užtikrina aukštą genetinio kintamumo aptikimo tikslumą ir yra ypač tinkamas genetinio grynumo bei introgresijos laipsnio vertinimui. Kiekvieną mėginį sudarė po 30 tranų antenų, paimtų iš vienos bičių šeimos.

SNP analizė buvo atlikta laikantis standartizuotų genotipavimo procedūrų Genų diagnostikos centre (Vokietija), užsakant paslaugą įmonėje „Apigenix“ (Šveicarija). Gauti duomenys analizuoti pasitelkiant bioinformacinius metodus, siekiant identifikuoti genetinius žymenis, būdingus skirtingoms bičių populiacijoms, bei nustatyti galimus svetimkraščių genotipų įsiskverbimo atvejus.

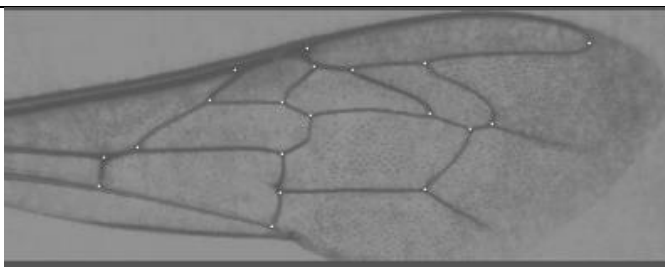
### 1.3. Morfometriniai tyrimai

Bičių darbininkių mėginiai buvo užpilti etanoliu ir analizuoti laboratorijoje. Buvo vertinama darbininkių pilvelio tergitų spalva, suskaičiuojama, kiek kiekviename mėginyje yra tamsių bičių ir kiek – su šviesiai rudais arba oranžiniais pilvelio tergitais.

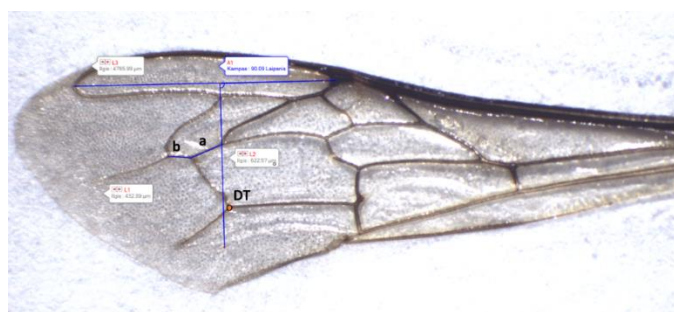
Sparnų preparatų nuotraukos buvo parengtos naudojant stereomikroskopą „Motic SMZ-140“ su fotografavimo ir matavimo įranga.

Morfometriniai tyrimai atlikti naudojant programą „Deepwings“ (<https://deepwings.ddns.net/>), kuri, įkėlus sparnų nuotraukas, automatiškai pažymi sparno gyslų susikirtimo taškus, apskaičiuoja 3 kiekvieno sparno parametrus ir pateikia porūšio tikimybę (2 pav.). Buvo vertinti 2 priekinio dešinio darbininkės sparno rodikliai:

1. Kubitalinis indeksas (KI) – apskaičiuojamas išmatuojant a ir b gyslas ir nustatant jų santykį ( $KI = a/b$ ) (Goetze, 1940) (3 pav.).
2. Diskoidalinio taško (DT) poslinkis – vertintas nubraižius tiesę per ribinį narelį ir nuleidus statmenį, einantį per tašką 3. Jeigu statmuo kerta DT, poslinkis yra 0; jei DT yra už statmens link sparno pamato – poslinkis neigiamas (-), o jei link sparno krašto – teigiamas (+) (3 pav.). Išmatavus 30 sparnų, apskaičiuojamas procentinis neigiamą DT poslinkį turinčių individų skaičius. Šis metodas naudotas anksčiau publikuotuose Lietuvos vietinės bitės tyrimų darbuose (Balžekas, Straigis, 1978; Straigis, 1979).



2 pav. „Deepwings“ programoje ant sparno nuotraukos sudėta 19 taškų, naudojamų analizėje.



3 pav. Pagrindiniai *Apis mellifera* bitės sparno morfometriniai požymiai, naudojami vertinant bičių atitikimą porūšiui: kubitalinis indeksas (KI) (pagal G. Goetze (1940)  $KI = a/b$ ) ir diskoidalinio taško (DT) padėtis (paveiksle matoma neigiama (-)).

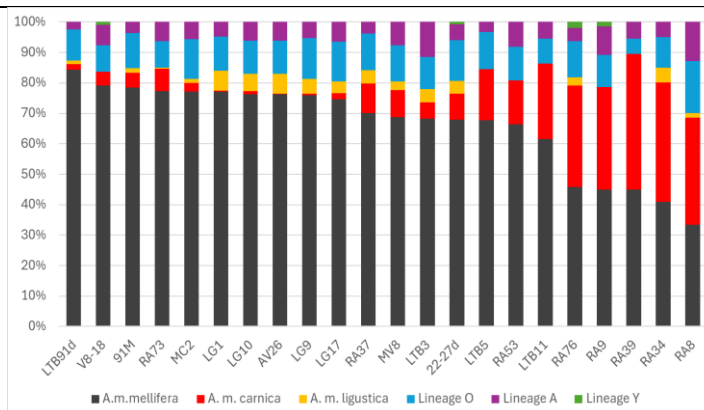
## 2. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### 2.1. Motinų poravimosi punkto populiacijos tyrimas

Ištyrus 24 bičių šeimas, kurių motinos išaugintos iš motinų, atrinktų pagal genetinius ir morfometrinius požymius ir atitinkančių Lietuvos vietinių bičių standartą (2 lentelė), paaiškėjo, kad dalies jų charakteristikos reikšmingai pasikeitė.

2 lentelė. Bičių motinų auginimui naudotų šeimų pagrindiniai požymiai (Blažytė-Čereškienė et al., 2024).

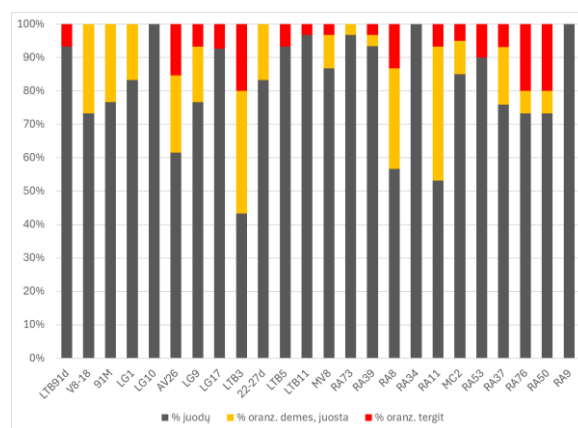
Šeimos kodas	Mitotipas	Tergitų spalva	KI	DT (-)	<i>A. m. mellifera</i> grynumas (dalis)
AV26	M-LT3	juoda	1,602	70	0,81±0,06
AV35	M4e	juoda	1,657	70	0,62±0,12
SV17	M4e'	juoda	1,807	80	0,78±0,06
LTB91	M-LT1	juoda	1,926	50	0,73±0,07
22-27	M4fa	juoda	1,657	80	0,79±0,07



4 pav. Svetimkraščių porūšių genų introgresija *Apis mellifera mellifera* bičių šeimose.

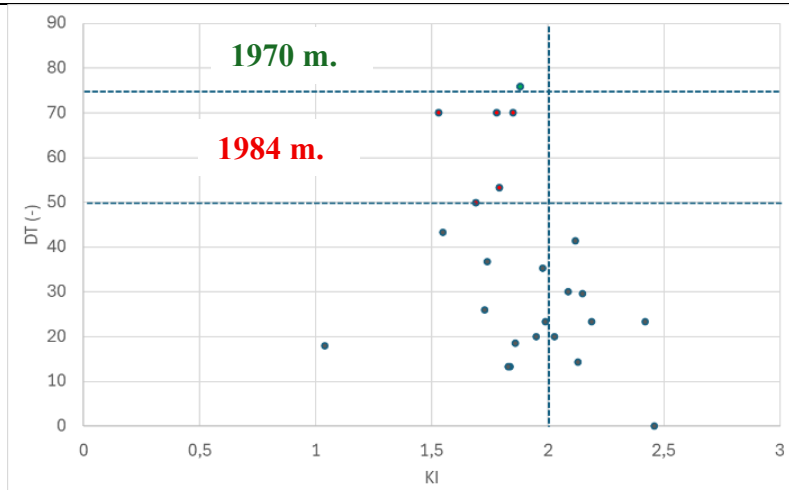
SNP analizė parodė, kad visos tirtų šeimų motinos (tranų SNP sutampa su jų motinų, nes jie vystosi iš neapvaisintų kiaušinių) skirtingu laipsniu pasižymi svetimkraščių genų introgresija. Atskirose motinose *Apis mellifera mellifera* genai sudarė nuo 33,46 % iki 84,38 % (4 pav.). Mažiausią svetimkraščių genų introgresiją turėjo LTB91d (M-LT1 mitotipo) motina. Pusės bičių motinų *A. m. mellifera* genų dalis buvo 70 % ir daugiau, gi kitos pusės susimišinimas gana reikšmingas su *A. m. carnica* ir kitomis svetimkraštėmis medunešėmis bitėmis. Visose motinose nustatyta beveik vienoda dalis (vidutiniškai 11 %) O evoliucinės linijos, kas nurodo introgresiją *A. m. caucasica* porūšio, likusio nuo jo auginimo propagavimo Lietuvoje raudonųjų dobilų apdulkinimui. Iš Afrikos kilusios A evoliucinės linijos dalis vidutiniškai sudarė apie 6 % kiekvienoje motinoje, kas atskleidžia hibridizaciją su *A. mellifera* x buckfast, kurios yra hibridinės bitės, labai lengvai poruojasi su visais porūšiais ir yra itin populiarios tarp Lietuvos bitininkų.

Atlikus bičių šeimų mėginių pradinę išorinių požymių apžiūrą laboratorijoje nustatyta, kad tik 2 iš 24 tirtų bičių šeimų darbininkų pilvelio tergitų spalva buvo tamsi (5 pav.). Net 64 % bičių šeimų pasižymėjo darbininkėmis su 1–3 oranžiniais pilvelio tergita, iš kurių didžioji dalis dažniausiai buvo su saura ištisine oranžine juosta ant 2-o tergito.



5 pav. *Apis mellifera mellifera* motinos liniją turinčių bičių šeimų pilvelio tergitų spalva: raudona spalva rodo darbininkų dalį su 1–3 oranžiniais tergita, geltona spalva – bičių dalį su siaura ištisine oranžine juosta ant pirmųjų tergitų, juoda spalva – tamsių bičių dalį.

Vidutinis KI tirtose šeimose svyravo nuo 1,04 iki 2,46 (6 pav.). Šešiolika bičių šeimų (66,7 %) atitiko *Apis mellifera mellifera* KI rodiklį, kitų šeimų KI buvo didesnis už 2. Įvertinus DT padėtį, aptiktos 6 šeimos (25 %), kurių 50 % ar daugiau darbininkų DT padėtis minusinė ir atitinka 1984 m. aprašytas charakteristikas, ir tik 1 šeima, kurioje nustatyta daugiau kaip 75 % darbininkų su minusine DT padėtimi, būdinga bitėms iki 1970 m.



6 pav. Tirtų bičių šeimų atitikimas Lietuvos *Apis mellifera mellifera* populiacijai pagal (-) DT padėtį ir KI: 1970 m. – bičių šeimų KI ir DT padėtis atitinka iki 1970 m. aprašytas Lietuvos vietines bites (N = 1); 1984 m. – bičių šeimų KI ir DT padėtis atitinka 1984 m. aprašytas Lietuvos vietines bites (N = 5).

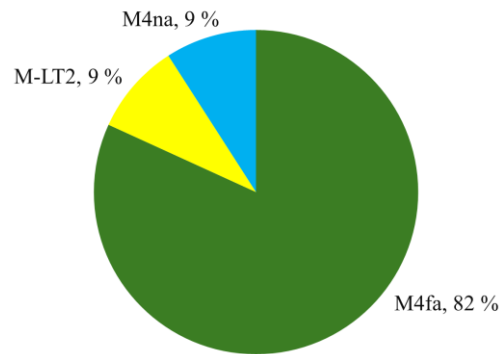
Įvertinus abu morfometrinius rodiklius nustatyta, kad Lietuvos *Apis mellifera mellifera* populiacijos požymius, aprašytus 1970 m. (Straigis, 1979), atitinka 1 šeima – RA73 (6 pav.). Vėliau, 1984 m. aprašytus rodiklius atitiko 5 bičių šeimos: LG10, AV26, MČ2, RA50 ir LG1. Susumavus ir įvertinus visus rezultatus, šios 6 bičių šeimos pasirodė tinkamos naudoti tolesnėje atrankoje ir Lietuvos *A. m. mellifera* populiacijos palaikyme.

## 2.2. Atskridusių spiečių analizė

Bitynuose, esančiuose 18 km spinduliu aplink *Apis mellifera mellifera* bičių motinų poravimosi punktą, tirti 2025 m. atskridę bičių spiečiai. Atlikus 21 mėginio mtDNR COI–COII tarpgerinio intarpo sekų analizę ir vizualizavus gautus PGR rezultatus agarozės gelyje, pagal gautų sekų ilgių skirtumus nustatyta, jog 11 mėginių (52,38 %) priklauso M evoliucinės linijos *A. m. mellifera* porūšiui (sekos ilgesnės nei 500 bp), o 10 (47,62 %) spiečių pasirodė esantys įvežtinių porūšių (sekų ilgis < 500 bp) (1 priedas).

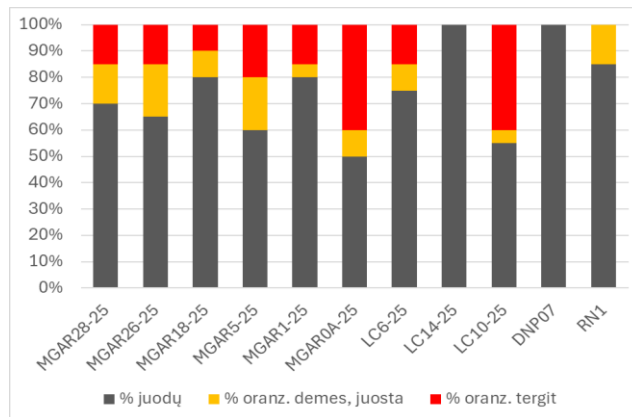
Lyginant su 2024 m. spiečių analizės rezultatais, nustatyta, kad šiais metais padidėjo C linijos spiečių dalis: 2024 m. 69 % pagautų spiečių buvo M evoliucinės linijos, o šiais metais M linijos spiečiai tesudarė 52,38 %. Nors pokytis nėra didelis, bet jis gali būti reikšmingas motinoms poruojantis, todėl vis dar reikalingi tolesni darbai identifikuojant C linijos bičių spiečius ir juos šalinant iš aplinkos. Taip pat situaciją pagerintų neaiškių bičių įvežimo į DNP ribojimas.

Sekoskaitos metu gauti M evoliucinės linijos mtDNR COI–COII tarpgeriniai intarpai pagal kintamumą suskirstyti į 3 mitotipus (7 pav., 1 priedas). Iš jų dažniausias pasirodė esantis M4fa (9 šeimos), nustatytas Marcinkonyse ir Musteikoje pagautuose spiečiuose, o likę M-LT2 ir M4na mitotipai aptikti pavienėse bičių šeimose, atskridusiose į Marcinkonyse esančius bitynus. Kitaip nei praėjusiais metais, naujų mitotipų tarp tirtų spiečių rasta nebuvo.



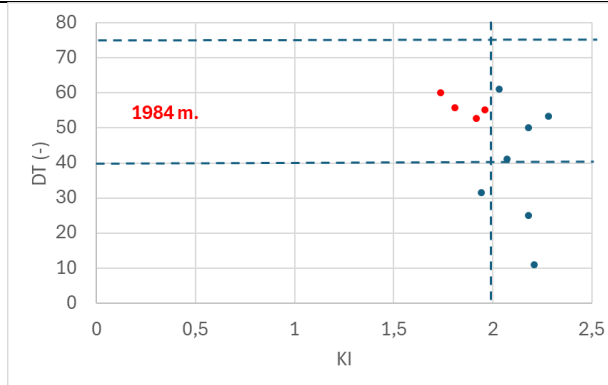
7 pav. 2025 m. pagautų M evoliucinės linijos bičių spiečių mtDNR COI–COII tarpgeninio intarpo mitotipų santykis.

Pradinė morfologinė apžiūra laboratorijoje parodė, kad 2 mėginių (DNP07, M4fa mitotipo ir LC14-25, M4na mitotipo šeimos, 18 %) bitės iš 11 naujai aptiktų M evoliucinei linijai priklausančių spiečių pasižymėjo tamsia pilvelio tergitų spalva (8 pav.). Dar viename mėginyje (RN1, M4fa mitotipo) aptikta 15 % individų, turinčių tik siaurą oranžinę juostelę ant 2-ojo tergito. Kitų mėginių bitės turėjo 10 % ar > darbininkių su 1–3 oranžiniais pilvelio tergitais. Šie požymiai rodo svetimkraščių porūšių ar jų hibridų (*Apis mellifera ligustica*, *A. m. x buckfast*), pasižyminčių oranžiniais pilvelio tergitais, genų introgresiją.



8 pav. M evoliucinės linijos bičių spiečių pilvelio tergitų spalva: raudona spalva rodo darbininkių dalį su 1–3 oranžiniais tergitais, geltona spalva – bičių dalį su oranžinėmis dėmėmis ant 1-o tergito arba išsine siaura juosta ant pirmųjų tergitų, juoda spalva – tamsių bičių dalį.

Atlikus šių spiečių morfometrines analizes, paaiškėjo, kad vidutinis KI šeimose svyravo nuo 1,74 iki 2,28. Penkios bičių šeimos atitiko *Apis mellifera mellifera* KI rodiklį, kitų šeimų KI buvo didesnis už 2. Įvertinus DT padėtį, nustatytos 7 šeimos, kurių 50 % ar > darbininkių DT padėtis minusinė ir atitinka 1984 m. aprašytas charakteristikas. Nebuvo nei vienos bičių šeimos, kuriose būtų daugiau kaip 75 % darbininkių su minusine DT padėtimi, būdinga bitėms iki 1970 m.



9 pav. 2025 m. tirtų M evoliucinės linijos bičių spiečių atitikimas Lietuvos *Apis mellifera mellifera* populiacijai pagal (-) DT padėtį ir KI: 1970 m. – bičių šeimų Ki ir DT padėtis atitinka iki 1970 m. aprašytas Lietuvos vietines bites (N = 0); 1984 m. – bičių šeimų Ki ir DT padėtis atitinka 1984 m. aprašytas Lietuvos vietines bites (N=4).

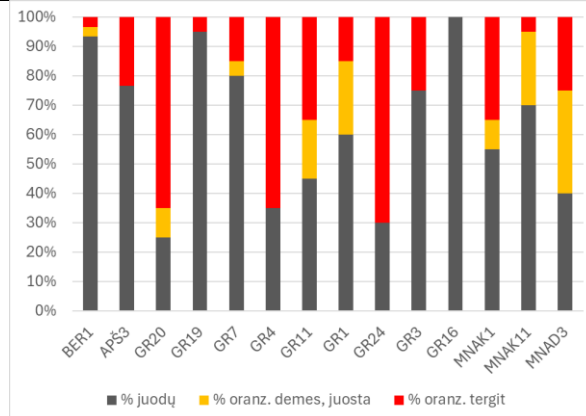
Analizuojant abu morfometrinius parametrus kartu, buvo išskirti 4 bičių mėginiai (MGAR28-25, MGAR18-25, LC6-25 (M4fa mitotipo) ir LC14-25 (M4na mitotipo)), kurių KI (< 2) ir (-) diskoidalinio taško padėtis ( $\geq 50$  %) patenka į rodiklio ribas (9 pav.), aprašytas kaip būdingas Lietuvos vietinei bitei 1984 m. (Straigis, 1987). Tačiau peržvelgus šių spiečių darbininkų morfologinius požymius (tergitų spalvą), paaiškėjo, kad tik 1 iš jų (LC14-25) galėtų būti naudojama tolesniam veisimui. Kiti spiečiai, nors ir turėjo pakankamai neblogus morfometrinius parametrus, vis tik yra netinkami atrankai dėl gana didelio oranžinius tergitus turinčių bičių skaičiaus (iki 45 %) mėginyje. Nebuvo nei vieno spiečiaus, kurio bičių morfometriniai rodikliai atitiktų 1970 m. aprašytuosius (Straigis, 1979).

### 2.3. Naujų *Apis mellifera mellifera* bičių šeimų paieška už DNP ribų

Galimai *Apis mellifera mellifera* porūšio bičių šeimos buvo tirtos 5 bitynuose, esančiuose už DNP ribų. Atlikus 31 mėginio mtDNR COI–COII tarpgerinio intarpo sekų analizę ir vizualizavus gautus PGR rezultatus agarozės gelyje, pagal gautų sekų ilgių skirtumus nustatyta, jog iš jų 14 (45 %) yra M evoliucinės linijos (sekų ilgis > 500 bp), o likusios 17 (55 %) šeimų buvo įvežtinių porūšių (sekų ilgis < 500 bp) (1 priedas).

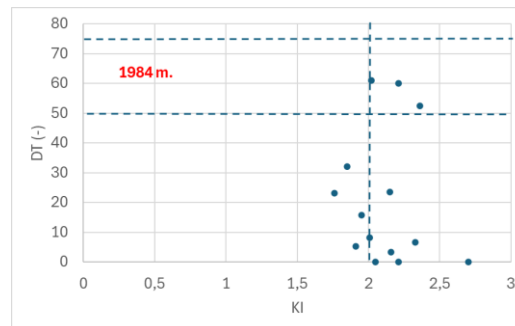
Tiriant vietinio porūšio kintamumą, nustatyti 6 mitotipai (10 pav., 1 priedas). Pusė tirtų bičių šeimų priklausė M4fa (4 šeimos), M4na (2 šeimos) ir M4e (1 šeima) mitotipams. Likusieji iki šiol nebuvo aptikti Lietuvos teritorijoje, jie laikinai pavadinti Nr. 1, Nr. 2 ir Nr. 3 (10 pav.). Du iš jų rasti Raseinių raj. esančiame bityne (Nr. 2 – 4 šeimose, Nr. 3 – 2 šeimose), likęs (Nr. 1) – 1 Aukštadvario bičių šeimoje. Lyginant juos su jau žinomais, ankstesniais metais Lietuvos teritorijoje aptiktais *Apis mellifera mellifera* porūšio mitotipais (11 pav.), nustatyta, kad tik per 1 hipotetinį mutacinį žingsnį naujas mitotipas Nr. 1 nutolęs nuo M4na, Nr. 2 – nuo M-LT3 mitotipo. Labiausiai besiskiriantis yra Nr. 3 mitotipas – nuo panašiausio M4na jis nutolęs per 5 mutacinius žingsnius.





12 pav. M evoliucinės linijos bičių šeimų, aptiktų už DNP teritorijos, pilvelio tergitų spalva: raudona spalva rodo darbininkų dalį su 1–3 oranžiniais tergitais, geltona spalva – bičių dalį su oranžinėmis dėmėmis ant 1-o tergito arba išsine siaura oranžine juosta ant pirmųjų tergitų, juoda spalva – tamsių bičių dalį.

Atlikus šių šeimų morfometrinių analizę, paaiškėjo, kad vidutinis KI šiose šeimose svyravo nuo 1,76 iki 2,36. Penkios bičių šeimos atitiko *Apis mellifera mellifera* KI rodiklį, kitų šeimų KI buvo didesnis už 2 (13 pav.). Įvertinus DT padėtį, nenustatyta šeimų, kurių DT minusinė padėtis atitinktų Lietuvos vietinės bitės rodiklius, aprašytus 1984 m. (Straigis, 1987).



13 pav. 2025 m. tirtų M evoliucinės linijos bičių šeimų, aptiktų už DNP teritorijos, atitikimas Lietuvos *A. m. mellifera* populiacijai pagal (-) DT padėtį ir KI.

Pažymėtina, kad naujose šeimose aptikti 3 nauji mitotipai (motininės linijos), kurie ypač svarbūs siekiant išlaikyti genetinę porūšio įvairovę. Todėl tokias bičių šeimas, kaip MNAD3-25 (naujo mitotipo Nr. 1) ir GR19 (naujo mitotipo Nr. 3), kurių morfometrinių rodiklių nuokrypis nuo tamsiosios bitės standarto nėra didelis, rekomenduotume panaudoti populiacijos atkūrimui.

**IŠVADOS IR REKOMENDACIJOS** (pateikiamos išvados ir rekomendacijos, nors jos ir yra išdėstytos ataskaitos prieduose (ne daugiau kaip 4 000 spaudos ženklų).

1. Įvertinus 2024 m. suformuotų bičių šeimų, išaugintų iš Čepkelių gamtinio rezervato teritorijoje susiporavusių motinų, morfometrinius požymius nustatyta, kad Lietuvos *Apis mellifera mellifera* populiacijos požymius, aprašytus 1970 m., atitiko 1 šeima – RA73, o 1984 m. pateiktus požymius atitiko 5 bičių šeimos: AV26, LG1, LG10, MČ2 ir RA50.
2. Čepkelių gamtinio rezervato teritorijoje susiporavusios bičių motinos pasižymi skirtingo laipsnio svetimkraščių genų introgresija. Mažiausia introgresija nustatyta pas LTB91d šeimos motiną. Pusės bičių motinų *A. m. mellifera* genų dalis buvo 70 % ir daugiau, likusios dalies susimišinimas su *A. m. carnica* ir kitomis svetimkraštėmis medunešėmis bitėmis gana reikšmingas.

3. Daugiau nei pusė medunešių bičių spiečių, 2025 m. sugautų 18 km spinduliu aplink Marcinkonis esančiuose bitynuose, pasirodė esantys M evoliucinės linijos. Didžioji jų dalis pasižymėjo M4fa mitotipu.
4. Iš kitose Lietuvos vietovėse surinktų bičių šeimų apie pusė priklausė 6 M evoliucinės linijos mitotipams, kurių 3 iki šiol nebuvo aptikti šalies teritorijoje.
5. Pagal morfometrinius ir genetinius požymius tolesniam dauginimui ir *A. m. mellifera* populiacijos palaikymui rekomenduotume naudoti LC14-25 (M4na mitotipo) spiečiaus bites, o genetinės įvairovės palaikymui padauginti motinas iš naujais mitotipais pasižyminčių šeimų – GR19 ir MNAD3-25, kurių morfometrinių rodiklių nuokrypis nuo tamsiosios bitės standarto nėra didelis.
6. Asociacijai „Lietuvos tamsioji bitė“, užsiimančiai *A. m. mellifera* bičių populiacijos išsaugojimu, bitininkams, kurių bičių šeimos buvo tirtos, pateikti tyrimo rezultatai ir rekomendacijos dėl atrinktų šeimų naudojimo tolesniam dauginimui ir atrankai.

#### NAUDOTOS LITERATŪROS SĄRAŠAS.

- Balžekas J. A., Straigis J. 1978. Research on Lithuanian honey bee. *Liet. Žemd. Moks. Tyr. Inst. Darbai* 22: 60–66.
- Bandelt H., Forster P., Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Blažytė-Čereškienė L., Orlovskytė S., Čepulytė R., Budrys E., Tiškevičiūtė D. 2023. Tinkamų bičių šeimų paieška Lietuvos vietinės tamsiosios bitės *Apis mellifera mellifera* populiacijos palaikymui. Ataskaita. Gamtos tyrimų centras, Vilnius.
- Blažytė-Čereškienė L., Skrodenytė-Arbačiauskienė V., Budrys E., Orlovskytė S. 2021. Potencialių vietų Lietuvos vietinių bičių išsaugojimui paieška. Ataskaita. Gamtos tyrimų centras, Vilnius.
- Blažytė-Čereškienė L., Orlovskytė S., Čepulytė R., Budrys E., Tiškevičiūtė D. 2024. Europos tamsiosios bitės, *Apis mellifera mellifera*, Lietuvos populiacijos palaikymui tinkamų bičių šeimų atranka ir naujai atskridusių spiečių įvertinimas. Ataskaita. Gamtos tyrimų centras, Vilnius.
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00945.x>
- Goetze G. 1940. Die beste Biene. Liedloft, Loth u. Michaelis, Leipzig.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 5–98.
- Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Leigh J. W., Bryant D. 2015. PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6 (9): 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Orlovskytė S., Budrys E., Skrodenytė-Arbačiauskienė V., Blažytė-Čereškienė L. 2024. The dark European honey bee *Apis mellifera mellifera* in Lithuania: data on mitotype diversity of native bee population. *Journal of Apicultural Research*, 64: 959–962 <https://doi.org/10.1080/00218839.2024.2327125>
- Straigis J. 1979. Rasinis Lietuvos TSR medunešių bičių tipišumas. *Acta entomologica Lituanica*, 7: 151–160.
- Straigis J. 1987. APIS. Bitininkystės mokslinio būrelio mokslinis darbas. Žemės ūkio akademija.

PRIEDAI (20...–20... m. tyrimo rezultatų priimtų spaudai mokslinių publikacijų kopijos, taip pat parengtų spaudai rankraščių kopijos ir kita informacija).

Tyrimų rezultatų pagrindu numatoma parengti mokslinę bei populiarią publikaciją

Projekto vadovė, vyresn. m. d.  
(Vadovo ar įgalioto asmens  
pareigų pavadinimas)

(Parašas)

Laima Blažytė-Čereškienė  
(Vardas, pavardė)