

# Primjena molekularnih analiza u determinaciji mikrobiote fecesa divljih vrsta pčela

---

**Galešić, Marija Andrijana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:234675>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**PRIMJENA MOLEKULARNIH ANALIZA U  
DETERMINACIJI MIKROBIOTE FECESA DIVLJIH VRSTA  
PČELA**

**DIPLOMSKI RAD**

Marija Andrijana Galešić

Zagreb, rujan, 2023.  
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Agroekologija – Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**PRIMJENA MOLEKULARNIH ANALIZA U  
DETERMINACIJI MIKROBIOTE FECESA DIVLJIH VRSTA  
PČELA**

DIPLOMSKI RAD

Marija Andrijana Galešić

Mentor:

Izv.prof.dr.sc. Darija Lemić

Zagreb, rujan, 2023.  
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZJAVA STUDENTA**  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Marija Andrijana Galešić**, JMBAG 0178109224, rođena 21.01.1997. u Zagrebu  
izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**PRIMJENA MOLEKULARNIH ANALIZA U DETERMINACIJI MIKROBIOTE FECESA DIVLJIH**

**VRSTA PČELA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE**

**O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Marija Andrijana Galešić**, JMBAG 0178109224, naslova

**PRIMJENA MOLEKULARNIH ANALIZA U DETERMINACIJI MIKROBIOTE FECESA DIVLJIH**

**VRSTA PČELA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Darija Lemić mentor

\_\_\_\_\_

2. izv. prof. dr. sc. Lidija Svečnjak član

\_\_\_\_\_

3. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka član

\_\_\_\_\_

## Zahvala

Ovime zahvaljujem Julii Lanner i Christini Rupert iz Beča koje su mi omogućile da uspješno dođem do rezultata ovog istraživanja. Hvala Ani i Lucii s Instituta Ruđer Bošković što su mi pomogle u posljednjim koracima mog rada.

Zahvaljujem svojoj mentorici Dariji Lemić koja je uvijek uz mene i podupire moj rast i razvoj te mi omogućuje da ostvarujem svoje potencijale. Zauvijek ćeš mi biti uzor.

Hvala bratu, sestri i majci na neiscrpoj podršci i vjeri u sve moje pothvate.

Hvala Dori koja je sa mnom od početka do kraja, bez obzira na sve što se oko nas promijenilo. *Servo me, servabo te.*

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Cilj istraživanja</b>	<b>3</b>
<b>2. Pregled literature</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Solitarne pčele</b>	<b>4</b>
2.1.1. Solitarne pčele iz porodice Megachilidae	5
2.1.2. <i>Hoplitis adunca</i> Panzer 1798.	5
2.1.3. <i>Osmia bicornis</i> Linnaeus 1758	7
2.1.4. <i>Megachile sculpturalis</i> Smith 1853	8
<b>2.2. DNA barkodiranje i metabarkodiranje</b>	<b>10</b>
<b>3. Materijali i metode</b>	<b>11</b>
<b>3.1. Lokaliteti prikupljanja fecesa pčela</b>	<b>11</b>
<b>3.2. Metoda prikupljanja uzoraka</b>	<b>11</b>
<b>3.3. Provedba molekularnih analiza</b>	<b>13</b>
3.3.1. DNA izolacija	13
3.3.2. Vizualizacija DNA fragmenata – Gel-elektroforeza	16
3.3.3. PCR analiza	18
3.3.4. Pročišćavanje uzoraka	20
3.3.5. Indeks PCR – DNA metabarkodiranje	20
3.3.6. Obrada sekvenci	21
<b>4. Rezultati</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Početnice rbcLa F / rbcLr 506</b>	<b>23</b>
<b>4.2. Početnice 16S 347-803 F / 16S 347-803 R</b>	<b>29</b>
<b>4.3. Analiza biljnih preferencija</b>	<b>35</b>
<b>4.4. Rezultati analiza prema vrstama pčela</b>	<b>35</b>
4.4.1. <i>Hoplitis adunca</i>	35
4.4.2. <i>Osmia bicornis</i>	35
4.4.3. <i>Megachile sculpturalis</i>	36
<b>5. Rasprava</b>	<b>37</b>
<b>6. Zaključak</b>	<b>36</b>

## Sažetak

Diplomskog rada studentice **Marije Andrijane Galešić**, naslova

### **PRIMJENA MOLEKULARNIH ANALIZA U DETERMINACIJI MIKROBIOTE FECESA DIVLJIH VRSTA PČELA**

Pčele kao glavni biljni oprašivači imaju ključnu ulogu u održavanju ravnoteže cjelokupnog ekosustava. Solitarne pčele su nerijetko s u kontaktu sa medonosnim pčelama kao zadružnim kukcima te mogu međusobno utjecati na sastav crijevne mikrobiote koja utječe na zdravlje jedinki, ali i cijele zajednice. Provedbom DNA metabarkodiranja uzoraka fecesa triju vrsta solitarnih pčela (*Hoplitis adunca*, *Osmia bicornis*, *Megachile sculpturalis*) utvrđene su prehrambene preferencije i prisutnost mikroorganizama u crijevnoj mikrobioti jedinki. Biljne preferencije prilikom ishrane ukazuju na biljke roda *Echium sp.*, *Prunus sp.* i *Ranunculus sp.* Analizom bakteriološkog sastava crijevne mikrobiote utvrđena je prisutnost bakterije *Melissococcus plutonius* te prisutnost bakterija *Bradyrhizobium sp.* i *Clostridium sp.* Potrebna su daljnja istraživanja solitarnih pčela i njihovih prehrambenih i ekoloških navika kako bi se osigurao opstanak i poboljšanje broja njihovih populacija kao jednih od najvažnijih oprašivača u prirodi.

**Ključne riječi:** solitarne pčele, feces, DNA metabarkodiranje



## Summary

Of the master's thesis – student **Marija Andrijana Galešić** entitled

### **APPLIED MOLECLAR ANALYSIS REGARDING MICROBIOTIC FECAL RESIDUE OF WILD BEE SPECIES**

Bees, as primary plant pollinators, play a crucial role in maintaining the balance of the entire ecosystem. Solitary bees often come into contact with honeybees as social insects, and they can mutually influence the composition of the gut microbiota, which impacts the health of individuals as well as the entire community. By conducting DNA metabarcoding of fecal samples from three species of solitary bees (*Hoplitis adunca*, *Osmia bicornis*, *Megachile sculpturalis*), dietary preferences and the presence of microorganisms in the gut microbiota of individuals were determined. Plant preferences during feeding point to plants of the genus *Echium* sp., *Prunus* sp., and *Ranunculus* sp. Through analysis of the bacterial composition of the gut microbiota, the presence of the bacterium *Melissococcus plutonius* was established, along with the presence of bacteria *Bradyrhizobium* sp. and *Clostridium* sp. Further research into the dietary and ecological habits of solitary bees is necessary to ensure the survival and enhancement of their populations as one of the most important pollinators in nature.

**Keywords:** solitary bees, faeces, DNA metabarcoding

# 1. Uvod

Pčele pripadaju skupini najvažnijih oprašivača. U svijetu je trenutno poznato skoro 20 000 različitih vrsta pčela. U cjelokupnom ekosustavu, procijenjena vrijednost pčela iznosi 195 bilijuna američkih dolara godišnje (Ollerton i sur., 2011). Dio tih vrsta čine medonosne pčele, bumbari i pčele bez žalca (nativne u tropskim krajevima). Ostatak, koji predstavlja veliku većinu ukupne brojnosti vrsta čine solitarne pčele koje se uglavnom mogu pronaći u otvorima u tlu, drveću i drvnim prerađevinama ili biljnim izdancima. U takvim otvorima, solitarne pčele skladište pelud i nektar kao izvor hrane za ličinke. Za razliku od medonosnih pčela koje nektar i pelud skupljaju na raznovrsnim biljnim vrstama, solitarne pčele preferiraju točno određene vrste biljaka te su vrlo efikasni oprašivači istih. S obzirom na specifične obrasce posjećivanja bilja, uloga solitarnih pčela kao oprašivača je od velike važnosti. Učinkovitost oprašivanja voćaka kod nekih solitarnih pčela je čak 120 puta veća nego kod medonosnih pčela (Zoološki vrt Zagreb, 2022). Pravilnim gospodarenjem u poljoprivredi postiže se utilizacija nativnih solitarnih pčela te potencijalna introdukcija stranih vrsta s ciljem poboljšanja oprašivanja i, posljedično, većim poljoprivrednim dobitcima. Kako bi odnošenje prema solitarnim pčelama bilo ispravno i isplativo, više je nego potrebno poznavanje njihove biologije i ekologije.

Poznato je da životinje koje žive u zajednicama poput medonosnih pčela, uglavnom sadrže specifičnu crijevnu mikrobiotu, karakterističnu za pojedinu skupinu. Crijevna mikrobiota višestruko utječe na kvalitetu ishrane, iskorištavanje nutrijenata iz hrane te zaštitu od patogena (Engel i sur., 2012). Mnoga su provedena istraživanja vezana uz mikrobiološki sastav cijevne mikrobiote i košnica socijalnih pčela. Dokazano je da mikrobiološka aktivnost unutar košnica, kao i crijevna mikrobiota pčela, ima značajan utjecaj na ekologiju i fiziologiju pčela, podjednako pozitivan i negativan (Keller i sur., 2013; Voulgari-Kokota i sur., 2019).

Odrasle medonosne pčele domaćini su konzistentnoj crijevnoj mikrobioti za koju se smatra da višestruko doprinosi zdravlju i zaštiti pčela od patogena i parazita. S druge strane, okolišni antropogeni čimbenici u modernoj poljoprivredi, poput ostataka antibiotika i pesticida, mogu sinergistički utjecati na pčelinje patogene doprinoseći negativnom utjecaju istih (Keller i sur., 2013; Dosch i sur., 2021).

Istraživanja provedena u gnijezdima solitarne pčele *Osmia bicornis* Linnaeus, 1758 pokazala su bakterijsku raznovrsnost neusporedivu s kolonijama medonosnih pčela. Velik dio bakterija prisutnih u gnijezdu poticao je iz okolišnih izvora poput blata kojim su gnijezda zidana ili

uskladištene peludi, a neke od njih mogu djelovati letalno na ličinke (Keller i sur., 2013; Voulgari-Kokota i sur., 2019). Prema istraživanju Keller i suradnika iz 2013. godine ustanovljeno je da crijevnu mikrobiotu pčele *O. bicornis* čine bakterije *Bacillus subtilis*, *Bartonella*, *Bifidobacterium*, *Burkholderia cepacia*, *Gilliamella*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Saccharibacter*, *Snodgrassella*. Među potencijalnim patogenima ističu *Achromobacter*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Brevibacillus*, *Clostridium botulinum*, *Enterococcus*, *Melissococcus plutonius*, *Mesoplasma*, *Paenibacillus*, *Photobacterium luminescens*, *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas protegens*, *Rickettsiella grylli*, *Spiroplasma melliferum*, *Xenorhabdus bovienii*, *Xenorhabdus nematophila*, *Stenotrophomonas*.

Metabarkodiranje kao metoda analize kratkih sekvenci nukleotida u svrhu determinacije mikrobiološkog sastava različitih uzoraka zbog svoje jednostavnosti primjene je sve češće upotrebljavana kao prvi izbor za utvrđivanje bioraznolikosti u uzorcima tla, vode, hrane i fecesa (Snider i sur., 2022). Do sada provedena istraživanja na medonosnim pčelama dala su uvid u kompleksne odnose medonosnih pčela i njihove specifične konzistentne mikrobiote crijeva koja se prenosi između jedinki unutar zajednice (košnice). Rezultati ukazuju na koevoluciju i mutualističke odnose između pčela i mikroorganizama. Također, istraživanja provedena na socijalnim bumbarima iz roda *Bombus* ukazala su da prijenos mikroorganizama među jedinkama u zajednici putem fecesa utječe na zaštitu jedinki od somatidnog patogena *Crithidia bombi*. U zaštiti pčela najveću ulogu imaju rodovi bakterija *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Snodgrassella* i *Gilliamella* (Engel i sur., 2012). Cox-Foster i suradnici (2007) u istraživanju crijevne mikrobiote medonosnih pčela navode identificirane rodove bakterija *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bartonella*, *Gluconoacetobacter* i *Simonsiella*, dok Koch i Schmid-Hempel (2011) navode *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Fructobacillus*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas* i *Simonsiella*. S obzirom na veliku važnost solitarnih pčela kao oprašivača, u interesu je saznati više o sastavu njihove crijevne mikrobiote; ishrani, mogućoj otpornosti prema patogenima, sinergističkim i mutualističkim odnosima s mikroorganizmima ili eventualno prisustvo patogena. S obzirom na invazivan karakter do sad jedne zabilježene vrste solitarnih pčela prisutnih na našim prostorima (*Megachile sculpturalis* Smith 1853.), interes za boljim upoznavanjem s njihovim načinom ishrane i života uvelike raste kako bi se spriječile potencijalne buduće štete i narušavanje ekosustava, a sve uz maksimalno iskorištavanje dobrobiti solitarnih pčela (Bila Dubaić i sur., 2021).

## **1.1. Cilj istraživanja**

Kako bi upoznali fiziologiju pčela cilj ovoga rada bio je molekularnim analizama uzoraka fecesa tri različite vrste divljih pčela ustanoviti: i) biljne preferencije prilikom ishrane kod različitih vrsta pčela te ii) bakteriološki sastav crijevne mikrobiote različitih vrsta pčela.

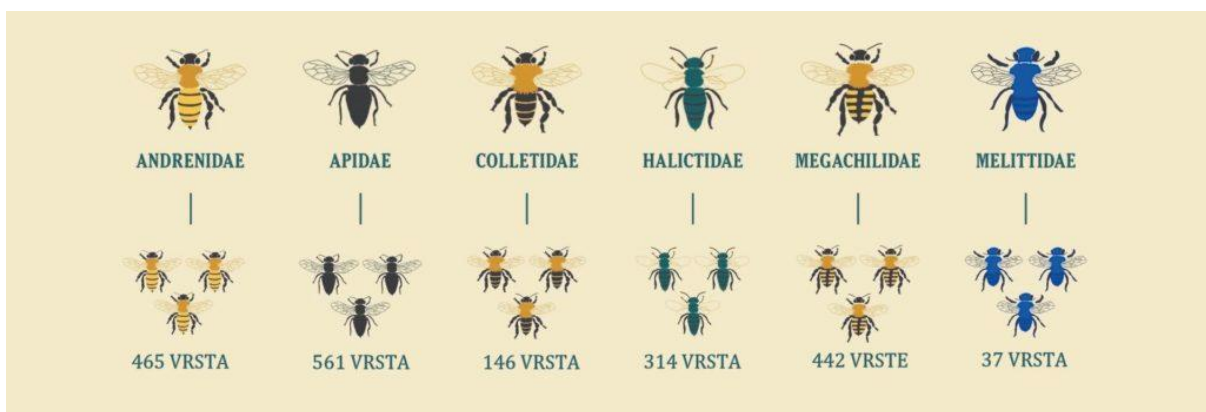
## 2. Pregled literature

### 2.1. Solitarne pčele

Otpriblike 9,5 % sveukupne svjetske poljoprivredne proizvodnje je ostvareno zahvaljujući pčelama. Sveukupni doprinos pčela poljoprivredi se procjenjuje na 15 – 30 % sveukupne količine namirnica namijenjenih za ljudsku i stočnu ishranu. Proizvodnja navedenih količina hrane ne bi bila ostvariva bez sudjelovanja solitarnih pčela uz medonosne. Solitarne pčele čine čak 85 % od procijenjenih 25 000 – 30 000 vrsta pčela diljem svijeta. Njihova djelotvornost pri oprašivanju može biti uvelike efikasnija nego što je slučaj kod medonosnih pčela. Istraživanje provedeno 2006. godine dokazalo je da prisutnost solitarnih vrsta pčela pozitivno utječe i povećava efikasnost oprašivanja od strane medonosnih pčela (Greenleaf i Kremen, 2000). Izuzev pozitivnog utjecaja na srodnike, solitarne pčele imaju specifičnu sposobnost sonikacije koja im omogućuje oprašivanje cvjetova koje medonosne pčele ne mogu. Sonikacija je definirana kao tjelesna vibracija kojom pčele i bumbari lakše dopru do peludi kod cvjetova specifične fizionomije. Pojedine biljke u potpunosti ovise o sonikaciji i njihovo oprašivanje ne bi bilo zamislivo bez solitarnih pčela i bumbara (Kline i Joshi, 2020).

Prema istraživanju iz 2014. (Nieto i sur. cit. Kuhlmann, 2014) na teritoriju Europe se nalazi 1965 vrsta pčela. One se dijele na dvije grupe:

- i) Apidae i Megachilidae – pčele dugog jezika
- ii) Andrenidae, Colletidae, Halictidae i Melittidae – pčele kratkog jezika (Slika 1.)  
(preuzeto iz Nieto i sur. cit. Kuhlmann, 2014).



Slika 1. Porodice pčela u Europi.

(Izvor: <https://gospodarski.hr/wp-content/uploads/SLIKA-1.-VRSTE-1024x350.jpg>)

Posljednjih godina su u Europi provedena istraživanja o smanjenju broja populacija solitarnih pčela. Istraživanje provedeno u Irskoj procjenjuje da je 3 % sveukupnog broja vrsta nativnih solitarnih pčela izumrlo, dok se 41 % vrsta smatra ugroženo. Mnogi faktori pogoduju trendu smanjenja broja populacija solitarnih pčela kao što su upotreba agrokemikalija, intenzivna poljoprivredna proizvodnja, gubitak staništa zbog urbanizacije te prisutnost pčelinjih zaraznih bolesti i parazita (Kline i Joshi, 2020).

#### 2.1.1. Solitarne pčele iz porodice Megachilidae

Solitarne pčele predstavljaju iznimnu važnost kao efikasni oprašivači s obzirom na njihovu preferenciju prema specifičnim biljkama koje odabiru za ishranu. Za gniježđenje pomno biraju mjesta u blizini izvora peludi i nektara, a nerijetko i vode. Solitarne pčele odabiru prostor za gniježđenje u blizini bilja s karakterističnom morfologijom lišća, vlakana, prisutnosti blata ili smole (što je često kod pčela iz porodice Megachilidae). Unatoč navedenom, većina solitarnih pčela se gnijezdi u tlu, dok Megachilidae pak preferiraju izradu gnijezda u biljnom materijalu, točnije u već postojećim otvorima u drvu, stabljikama ili granama, prvenstveno u urbanim područjima poput gradskih parkova i vrtova. Često se pčele iz porodice Megachilidae nastanjuju u otvorima koje su bile gnijezdo neke druge vrste prije njih (npr. stršljeni) (Gorton Linsley, 1958). Porodica Megachilidae ima 4 potporodice: Fideliinae, Lithurginae, Megachilinae i Pararhophitinae. Porodica Megachilinae se dijeli na 5 tribusa: Anthidiini, Aspidosmiini, Dioxyini, Megachilini i Osmiini koji sadrže preko 70 rodova (ITIS, 2023). Na području Hrvatske najpoznatiji rod je *Osmia* (Zoo Zagreb, 2023), a odnedavno su uočene i jedinke roda *Megachile* (Bila Dubaić i Lanner, 2021).

#### 2.1.2. *Hoplitis adunca* Panzer 1798.

*Hoplitis adunca* (Slika 2 i Slika 3) je pčela iz porodice Megachilidae. Rasprostranjena je po Europi, sjevernoj Africi, Sjevernoj Americi i centralnoj Aziji (BWARS, 2023; Exotic Bee ID, 2023). Pelud ova vrsta pčele sakuplja s biljaka roda *Ranunculus* i *Echium*, a gnijezda gradi u već postojećim rupama i šupljinama; pukotinama stijena, otvorima u drveću, trupcima, praznim puževim kućicama te u tlu. Kada ženka pronađe pogodan tunel za gniježđenje, najprije ga očisti, a potom na dnu tunela krene graditi pregrade od blata. U očišćenom tunelu krene redati nektar i pelud nakon čega položi jaje, koje također pregradi blatnim zidom. Za izgradnju

pregrada i začepljenje otvora osim blata *H. adunca* koristi komadiće drva, lišća, smolu, glinu, pijesak ili latice cvijeća (Zurbuchen i sur., 2010; BWARS, 2023; Exotic Bee ID, 2023).



Slika 2. Tijelo mužjaka *Hoplitis adunca*.

(Izvor: <https://sites.google.com/site/beesofromania/wild-bee-photo-gallery/megachilidae/hoplitis-adunca-panzer-1798>)



Slika 3. Tijelo ženke *Hoplitis adunca*.

(Izvor: <https://sites.google.com/site/beesofromania/wild-bee-photo-gallery/megachilidae/hoplitis-adunca-panzer-1798>)

### 2.1.3. *Osmia bicornis* Linnaeus 1758

*Osmia bicornis* solitarna je pčela iz porodice Megachilidae. Rasprostranjena je po Europi, sjevernoj Africi i zapadnoj Aziji. Ženke na glavi imaju crne dlake i dva roščića iznad kojih nema dlaka (Slika 4). Mužjaci na glavi imaju žućkasto bijele dlake (Slika 5). I mužjaci i ženke imaju tijelo duljine 8 do 12 mm (Exotic Bee ID, 2022)..

Nastanjuju gradske parkove i vrtove te oprašuju širok spektar biljnih vrsta, s preferencijom biljaka iz porodica Rosaceae i Fabaceae. Također, vrlo su efikasni oprašivači i u staklenicima (Exotic Bee ID, 2022). Za izradu gnijezda koriste širok spektar različitih postojećih otvora; u drvenim građevinama, šupljim stabljikama, kućicama puževa, hotelima za pčele. Gnijezda su uglavnom većinom položena linearno u dubokim uskim otvorima, a u plitkim i širokim otvorima grade ih u nekoliko redova. Otvore gnijezda nakon odlaganja jajašca zatvaraju vlažnom zemljom ili glinom (Exotic Bee ID, 2022).

U svrhu očuvanja potomaka, čija stopa preživljavanja opada s porastom temperature gnijezda, izbjegavaju izradu gnijezda pri temperaturi višoj od 28°C. Povišenje temperature gnijezda također dovodi i do gubitka na težini kod odraslih pčela, no istraživanje Ostap-Chec i sur. (2021) je pokazalo je kako visoke temperature djeluju letalno na pčelinje parazite čiji je broj najviši u negrijanim gnijezdima.



Slika 4. Glava ženke *Osmia bicornis*.

(Izvor: [https://idtools.org/uploads/idtools/47/259/BBSL1056980\\_Osmia\\_bicornis\\_female\\_face\\_EDITED.jpg](https://idtools.org/uploads/idtools/47/259/BBSL1056980_Osmia_bicornis_female_face_EDITED.jpg))





Slika 5. Glava mužjaka *Osmia bicornis*.

(Izvor: [https://idtools.org/uploads/idtools/47/259/Osmia\\_bicornis\\_male\\_face.jpg](https://idtools.org/uploads/idtools/47/259/Osmia_bicornis_male_face.jpg))

#### 2.1.4. *Megachile sculpturalis* Smith 1853

Pčela smolarica, *Megachile sculpturalis* jedina je invazivna vrsta solitarnih pčela u Europi. Porijeklom iz Azije, rasprostranila se na području Sjedinjenih Američkih Država i Europe. Kod pčele smolarice značajno je izražen spolni dimorfizam. Tijelo ženke dugačko je 21-27 mm, a tijelo mužjaka 12-19 mm. Mužjaci imaju karakteristične žute dlake iznad usnog aparata (Slika 6) koje kod ženki nisu prisutne. I mužjaci i ženke na toraksu imaju bakreno narančaste dlake koje se ističu na crnom tijelu (Slika 7). Krila su prema vrhovima zatamnjena (Lanner i sur., 2020) Pčela smolarica med skuplja pomoću četke na donjoj strani abdomena, a aktivna je od lipnja do rujna. Mužjaci s letom započinju 10-14 dana prije ženki. Nektar sakuplja s raznovrsnih biljnih porodica, uglavnom egzotičnog ukrasnog bilja poput japanske kaline, obične kaline, jorgovana, vrbice i sl. (Centar za biologiju pčela, 2022). Za izradu gnijezda pčele smolarice preferiraju već postojeće otvore minimalnog promjera od 8 mm. Kompartimenti u gnijezdima odvojeni su zidovima koje pčela smolarica gradi od blata, a otvore gnijezda zapečate smolom. Kod azijske pčele smolarice uočena je izražena teritorijalna aktivnost i invazivan karakter koji se očituje padom pojavnosti nativnih vrsta od 51 % u prisustvu ženke pčele smolarice. Biljke poput glicinije i lavande zajednički su izvor hrane ovoj alohtonoj vrsti, kao i mnogim autohtonim vrstama zbog čega dolazi do sukoba između vrsta (Lanner i sur., 2020; Lanner i Bila Dubaić, 2021; Centar za biologiju pčela, 2022).



Slika 6. Glava mužjaka *Megachile sculpturalis*.

(Izvor: [https://entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEES/Giant\\_resin05.jpg](https://entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEES/Giant_resin05.jpg))



Slika 7. Karakteristične dlake na tijelu kod *Megachile sculpturalis*.

(Izvor: [https://entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEES/Giant\\_resin04.jpg](https://entnemdept.ufl.edu/creatures/MISC/BEES/Giant_resin04.jpg))

## 2.2. DNA barkodiranje i metabarkodiranje

DNA barkodiranje predloženo je 2003. godine kao univerzalna metoda u molekularnoj taksonomiji. Koristi se za determinaciju biološkog materijala u smislu identifikacije vrste, a također kao i metoda za otkrivanje novih, još neopisanih vrsta. Temelji se na korištenju kratkih jedinstvenih sekvenci nukleotida koje su dovoljno različite kod svih organizama od interesa što omogućuje brzu i preciznu identifikaciju biološkog materijala (Nicole i sur., 2012; Ćosić, 2014; Kučinić, 2022). Osim u taksonomiji, široko je primjenjivana metoda u molekularnoj filogenetici, populacijskoj genetici i biogeografiji (Raclariu i sur., 2017).

Glavna odlika DNA barkodiranja je odabir odgovarajućeg barkoda tj. sekvenci nukleotida. Mnoštvo je barkodova, a izbor odgovarajućeg ovisi o postojećoj bazi podataka i materijalu koji se istražuje. Najčešće upotrebljavani su COI (citokrom c oksidaza podjedinice I) za životinjsku DNA, ITS (internal transcribed spacer rRNA) za gljive, rbcL (ribuloza-bifosfat karboksilaza) te matK (maturaza K) za biljke i 16S rRNA za prokariote (Alberdi i sur., 2018.; McGee i sur., 2022). DNA metabarkodiranje kombinacija je high-throughput sekvenciranja i DNA barkodiranja. Široko je upotrebljavana metoda za analizu bioraznolikosti u uzorcima okoliša poput tla, vode, crijevnog sadržaja ili fekalija. Omogućava simultanu high-throughput multi-taksonomsku identifikaciju korištenjem ekstracelularne i/ili sveukupne DNA ekstrahiranu iz uzoraka. Osnovna ideja metabarkodiranja je analiza određenog genetičkog odsječka („barkoda“) koji je specifičan za pojedinu skupinu organizama. Proces uključuje ekstrakciju ukupne DNA iz uzorka, amplifikaciju odabranog barkoda pomoću PCR, sekvenciranje DNA fragmenata i zatim analizu sekvenci pomoću bioinformatičkih alata kako bi se identificirali organizmi prisutni u uzorku (Raclariu i sur., 2017; Alberdi i sur., 2018).

Jednostavnost primjene DNA metabarkodiranja i postojeća široka baza podataka, popularizirala je ovu metodu i učinila je glavnim izborom za analizu dijetalnih navika životinja. Istraživanje prehrambenih preferenci jedinki bazira se na uzimanju uzoraka iz probavnog trakta ili fecesa jedinki. S obzirom na neinvazivni pristup prilikom prikupljanja, češći su odabir fekalni uzorci životinja. S druge strane, ovisno o vrsti životinje, mikrobiološki sastav želuca i fecesa se uvelike može razlikovati zbog procesa razgradnje hrane u probavnom traktu, dovodeći do potencijalno oskudnih rezultata u slučaju uzorkovanja fecesa. Pa ipak, u slučaju člankonožaca, uzorkovanje fecesa prva je metoda izbora zbog neinvazivnosti, mogućnosti

uzorkovanja u prirodnim uvjetima i laboratorijskim uvjetima te mogućnosti obrađivanja velikog broja uzoraka odjednom (Sinder i sur., 2022).

### 3. Materijali i metode

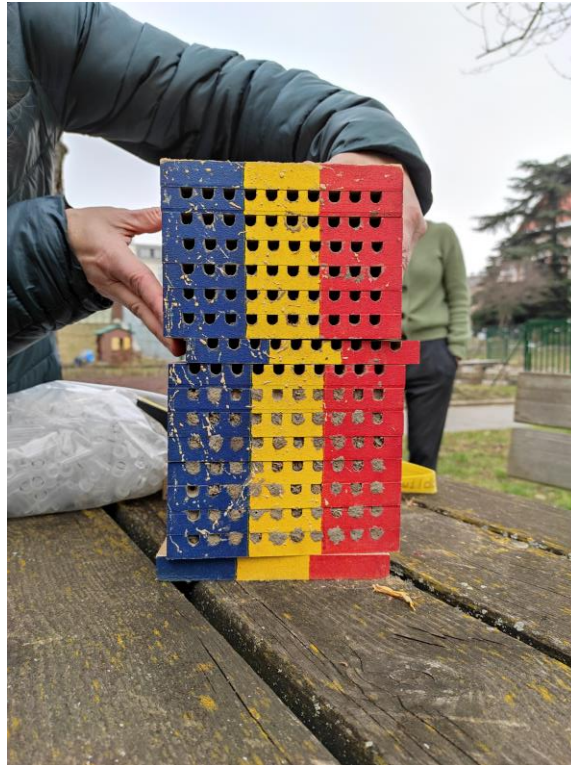
#### 3.1. Lokaliteti prikupljanja fecesa pčela

Za provedbu ovog istraživanja korišten je izmet triju vrsta divljih solitarnih pčela porodice Megachilidae; *Hoplitis adunca*, *Osmia bicornis* i *Megachilae sculpturalis*. Feces pčela uzorkovan je na različitim lokacijama. Feces vrste *O. bicornis* prikupljen je na University of Natural Resources and Life Sciences u Beču (Austrija) tijekom ožujka 2021. godine. Za analizu fecesa vrsta *M. sculpturalis* i *H. adunca* korišteni su uskladišteni smrznuti uzorci, originalno korišteni za ranija istraživanja, a prikupljeni su tijekom 2020. godine diljem Švicarske, Belgije, Nizozemske i kontinentalne Italije (alpski predio).

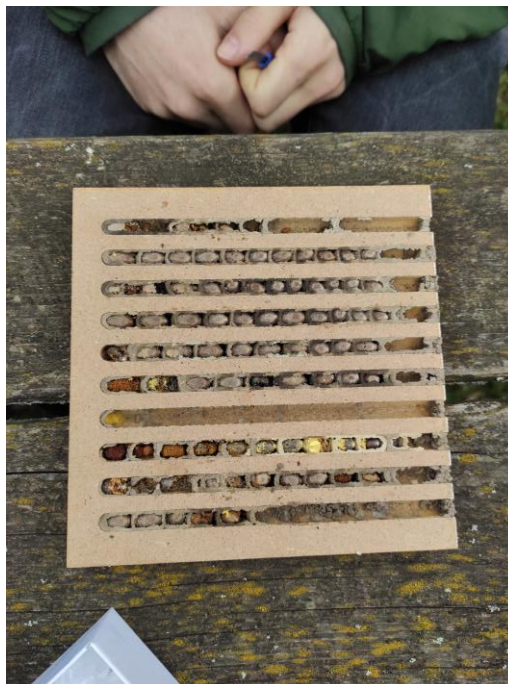
#### 3.2. Metoda prikupljanja uzoraka

U ovom istraživanju, korišteno je sveukupno 137 uzoraka fecesa triju vrsta pčela: *O. bicornis*, *H. adunca* i *M. sculpturalis*. Uzorci fecesa pčela roda *Osmia* su prikupljeni iz „nastambe za solitarne pčele“ (Slika 8). U utorima „hotela“ nalazile su se kukuljice pčela (Slika 9). Vađenjem kukuljica iz utora, otkrivene se nakupine fecesa i peludi kojom su se ličinke hranile do stadija kukuljice. Vađenje kukuljica i prikupljanje fecesa se provelo uporabom pincete (Slika 10). Nakon prikupljene dovoljne količine, svaka kukuljica je vraćena na svoje mjesto kako bi nesmetano nastavila svoj razvoj. Svaki uzorak činilo je do 10 komadića fecesa, prikupljenih u tubice koje su označavane prema unaprijed dogovorenom konceptu. Naziv je uključivao broj „etaže hotela“, identifikaciju spola pčele prema veličini kukuljice (manje kukuljice su mužjaci, a veće ženke (Raw i O'Toole, 1979)) i slovo kojim se označava pozicija u otvoru. Osim navedenih informacija, dodatno su bilježene specifičnosti vezane uz uzeti uzorak; je li kukuljica prazna, ima li peludi oko kukuljice, ima li tvorbi koje ukazuju na prisutnost gljivične infekcije, prisutnost parazita i sl. Na ovaj način, prikupljeno je ukupno 103 uzoraka fecesa vrste *O. bicornis*, dok je ostatak uzoraka, njih 34, pripadalo vrstama *M. sculpturalis* i *H. adunca*.

Uzorci fecesa vrsta *M. sculpturalis* i *H. adunca* prikupljane su na isti način iz hotela za pčele postavljenih po gradskim vrtovima, parkovima i privatnim balkonima ljudi koji su sudjelovali u istraživanju (citizen science projekt).



Slika 8. Nastamba za solitarne pčele



Slika 9. Utori nastambe za solitarne pčele s kukuljicama pčela.





Slika 10. Prikupljanje uzoraka fecesa pomoću pincete.

### **3.3. Provedba molekularnih analiza**

Ekstrakcija DNA te provedba PCR analize provedena je u sklopu Instituta za integrativna istraživanja, na University of Natural Resources and Life Sciences u Beču (Austrija), u razdoblju od ožujka do srpnja 2021. godine.

#### **3.3.1. DNA izolacija**

Izolacija DNA iz prikupljenih uzoraka fecesa provedena je prema unaprijed utvrđenom laboratorijskom protokolu (Tablica 11):

Tablica 11. Protokol za izolaciju DNA iz fecesa pčela

1. Usitniti uzorke pijeskom
2. Dodati Pre-lysis pufera T1 (Macherey-Nagel) 180 $\mu$ l
3. Dodati Proteinase K [10mg/ml], 10 $\mu$ l
a. Kratko vorteksiranje
b. Inkubirati pri 56°C, 300 rpm, minimalno 1h
4. Dodati Rnase [10mg/ml], 10 $\mu$ l
a. Kratko vorteksiranje
b. Inkubirati na 37°C, 300 rpm, 15 minuta
5. Dodati Lysis pufera B3 (Macherey-Nagel) 180 $\mu$ l
a. Inkubirati pri 70°C, 300 rpm, 10 minuta
6. Ciklus centrifugiranja:
a. 1000 rpm, 1 min
b. 2000 rpm, 1 min
c. 4000 rpm, 1 min
d. 8000 rpm, 1 min
e. 11000 rpm, 7 min
7. U tubice volumena 1,5 ml uliti:
a. EtOH absolute 180 $\mu$ l
b. Lizat (supernatant) 360 $\mu$ l
i. Promiješati pipetiranjem 10 x
ii. Nanijeti 540 $\mu$ l na kolumne
iii. Centrifugirati 4000 rpm, 1 min
8. Izliti filtrat
9. Dodati 600 $\mu$ l EtOH 80%
a. Centrifugirati pri 12000 rpm, 1 min
b. Centrifugirati pri 12000 rpm, 2 min
10. Prvo ispiranje
a. Dodati pufer za ispiranje; Elution Buffer 10mM Tris, pH 8,33, 30 $\mu$ l, zagrijan na 65°C
b. Inkubirati pri sobnoj temperaturi, 3 min
c. Centrifugirati pri 12000 rpm, 1 min
11. Drugo ispiranje
a. Dodati pufer za ispiranje; Elution Buffer 10mM Tris, pH 8, 50 $\mu$ l, zagrijan na 65°C
b. Inkubirati pri sobnoj temperaturi, 3 min
12. Centrifugirati pri 1200 rpm, 1 min

Otopine korištene za izolaciju navedene su u tablici 12.

Tablica 12. Otopine korištene za izolaciju DNA iz pčelinjeg fecesa

Pre-lysis pufer T1 (Macherey-Nagel kit)
Proteinaza K (10mg/ml)
RNaza (10mg/ml)
Lysis pufer B3 (Macherey-Nagel kit)
Apsolutni alkohol
80 % -tni alkohol
Pufer za pročišćavanje 10 mM Tris (pH 8,3)

Izolacija DNA započinje usitnjavanjem uzoraka. Uzorci su usitnjavani u Eppendorf tubicama volumena 2.0 ml, svaka tubica za sebe, pomoću specijaliziranog pijeska i malenog tučka za usitnjavanje. Nakon usitnjavanja, uzorci su centrifugirani. Korištena je Thermo scientific™ centrifuga snage 21,000 rpm (eng. rounds per minute – okretaja u minuti). Uzorci su centrifugirani 1 minutu.

Sljedeći korak uključuje dodavanje 180 µl Pre-lysis T1 pufera (Macherey Nagel). Navedeni pufer osigurava odgovarajući pH za djelovanje Proteinase K enzima te kako bi se spriječila degradacija DNA inaktivacijom ostalih enzima u citosolu. Dodano je 10 µl Proteinaze K (10mg/ml). Nakon dodavanja otopina, uzorci su stavljeni sat vremena u termički vrtložnik s postavkama na 56°C i 300 rpm.

Nakon sat vremena, u tubice je dodano 10 µl RNAze (10mg/ml), tubice su kratko vorteksirane te ponovno stavljene u termički vrtložnik, no ovoga puta na 15 minuta s postavkama 37°C i 300 rpm.

Potom je dodano 180 µl litičkog pufera B3 (Macherey-Nagel) te su uzorci stavljeni u termički vrtložnik na 10 minuta s postavkama na 70°C i 300 rpm nakon čega slijedi centrifuga.



Različite faze centrifugiranja provode se kako bi se odvojile krute čestice, a sa svrhom prevencije oštećenja DNA. Nakon završenog ciklusa centrifugiranja, iz tubica je pipetirano 360 µl supernatanta (lizata) koji je preliven u 1,5 ml Eppendorf tubice. Osim supernatanta, u tubice je dodano 180 µl apsolutnog alkohola te su dvije otopine miješane pomoću pipete (naizmjeničnim usisavanjem i potiskivanjem 10 puta).

Dobivenih 540 µl otopine se iz svake tubice prenoseno je u EconoSpin Columns sa silika membranom (Epoch Life Science, USA) te su centrifugirane 1 minutu na 4000 rpm.

Kako bi isprali višak nečistoća s kolumni, dodano je 600 µl 80 %-tnog alkohola u svaku kolumnu te što je centrifugirano najprije jednu minutu na 12000 rpm zatim 2 minute s istim brojem okretaja. Nakon centrifuge, odbačen je flow-through i ostavljen EconoSpin tanjurić na sušenju na sobnoj temperaturi 15 minuta.

Posljednji korak za izolaciju DNA je ispiranje (elucija) uz pomoć unaprijed ugrijanog (na 65 °C) 10 mM Tris (pH8,3) pufera za ispiranje. Za prvo ispiranje dodano je 30 µl Tris pufera te je elutant ostavljen na sobnoj temperaturi tri minute nakon čega slijedi jednogminutno centrifugiranje na 12000 rpm.

Posljednje ispiranje provedeno je s 50 µl 10mM Tris pufera (pH8,3). Elutant je ostavljen tri minute na sobnoj temperaturi te je stavljen jednu minutu na centrifugiranje pri 12000 rpm.

DNA izolirana ovakvim postupkom može se zamrznuti na – 20°C za kasnije analize ili odmah koristiti za vizualizaciju produkata pomoću gel-elektroforeze.

### 3.3.2. Vizualizacija DNA fragmenata – Gel-elektroforeza

Gel elektroforeza je postupak separacije i vizualizacije DNA fragmenata dobivenih postupkom DNA izolacije. Gel se izrađuje od polisaharida agaroze i TAE pufera (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA). Gel služi kao molekularno sito u kojem se nukleinske kiseline iz DNA fragmenata uz pomoć električnog polja odvajaju na temelju njihove veličine. S obzirom na broj uzoraka koji se želi vizualizirati, priprema se gel debljine sloja od 1 do 10 mm. Priprema gela zahtijeva prokuhavanje i miješanje otopine agaroze koja se potom ulijeva u za to namijenjene kalupe. U kalup se umeću „češljevi“ kojim se u gelu stvaraju jažice. Jažice predstavljaju utore u koje se nanose uzorci DNA.

Nakon hlađenja i stvrdnjavanja, gel se potapa u kadu s loading puferom te se u njega nanose uzorci zajedno sa specijalnim bojom koje omogućuje vizualizaciju uzoraka pod UV svjetlom.

Potopljeni gel spaja se na izvor struje; na kraj bliži jažicama spaja se anoda, a na suprotni katoda. S obzirom da su fragmenti DNA negativno nabijeni, u električnom polju putovati će prema pozitivno nabijenom polu (prema katodi), a daljina koju dosežu u gelu ovisi o veličini fragmenta. Nakon određenog vremena izlaganja struji (ovisno o veličini gela), gel se izvadi iz pufera, višak tekućine se iscijedi te se uz pomoć UV lampe vizualiziraju rezultati (Lee i sur., 2012; Dončević, 2017).

Za vizualizaciju DNA fragmenata iz pčelinjeg fecesa, pripremljen je 1,5 % -tni gel agaroze otapanjem 0,8 g agaroze u 52 ml TAE pufera. Mješavina je zagrijavana u laboratorijskoj mikrovalnoj pećnici te povremeno miješana do potpunog otapanja agaroze. Nakon hlađenja, u otopinu dodano je 0,7  $\mu$ l HDGreen bojila koje omogućuje vizualizaciju gela pod UV svjetlom. Korišten je „češalj“ za izradu 16 jažica. Nakon hlađenja i stvrdnjavanja, gel je potopljen u kadu s TAE puferom. U jažice je pomoću mikropipete nanešena mješavina 4  $\mu$ l LB pufera (1:4) (loading dye) i 5  $\mu$ l DNA. Kao referentno mjerilo, korišteno je 0,6  $\mu$ l Hindi ladder-a (Lambda Dann/EcoRI+Hind III Marker, 3) uneseno u praznu jažicu lijevo od uzoraka. U praznu jažicu desno od uzoraka unesena je negativna kontrola. Gel je 20 minuta izložen izvoru struje jačine 80 V (Slika 13). Za vizualizaciju gela korišten je Trans-illuminator system Intas GEL IX IMAGER (Germany).

Vizualizacija gela pod UV lampom dala je pozitivne rezultate; fragmenti DNA su uspješno vizualizirani što je potvrdilo prisutnost nukleinskih kiselina u fecesu pčela te osiguralo temelje za daljnje istraživanje – provedbu PCR analize.

Tijekom provedbe ovog istraživanja, provedena je DNA izolacija i vizualizacija svih uzoraka. Ovisno o broju uzoraka u određenoj seriji izolacije DNA, izrađeno je više gelova različitih veličine. Pojedini uzorci nisu dali pozitivan rezultat tijekom vizualizacije fragmenata zbog čega su isključeni iz daljnje obrade. Nakon vizualizacije uzoraka, tanjurići s uzorcima su označeni te spremljeni u zamrzivač na  $-20^{\circ}\text{C}$  za kasniju PCR amplifikaciju i purifikaciju.



Slika 13. Uzorci DNA stavljeni na gel elektroforezu.

### 3.3.3. PCR analiza

Nakon pozitivnih rezultata DNA izolacije tj. uspješne vizualizacije DNA fragmenata, 51 uzorak je podvrgnut PCR analizi.

PCR analiza izolata DNA mikrobiote fecesa pčela provedena je uz pomoć termo bloka koji služi kao uređaj koji zagrijava i hladi uzorke u unaprijed postavljenim vrlo preciznim temperaturama i dužinama programiranih ciklusa. Ciklusi se sastoje od denaturacije DNA, sparivanje početnica i na kraju produljivanja lanaca. S ciljem dobivanja što preciznijih rezultata, u ovom istraživanju su korištene pomno odabrane početnice i postavke termo bloka.

Smjesu za PCR jednog DNA uzorka činile su sljedeće komponente:

- 5  $\mu\text{l}$  Master mix-a dvostruke koncentracije
  - unaprijed pripremljena mješavina  $\text{MgCl}_2$ , dNTP-ova, Taq polimeraze i pH pufera
- 0,4  $\mu\text{l}$  "forward" početnice koncentracije 10  $\mu\text{M}$
- 0,4  $\mu\text{l}$  "reverse" početnica koncentracije 10  $\mu\text{M}$
- 3,2  $\mu\text{l}$  vode
- 1  $\mu\text{l}$  DNA

Sveukupno čineći 10  $\mu\text{l}$  PCR smjese.

Korištene početnice navedene su u Tablici 14.

Tablica 14. Početnice korištene u provedbi PCR analize.

Naziv početnice	Sekvenca (5' → 3')	Ciljana DNA
TrNL F e	TCTTCCCTACACGAC- GCTCTCCGATCTGGTCAAGTCC CTCTATCCC	Eukariotska
TrNL R f	CTGGAGTTCAGAC- GTGTGCTCTCCGATCTATTTGAA CTGGTGACACGAG	Eukariotska
rbcLr506	CTGGAGTTCAGAC- GTGTGCTCTCCGATCTAGGGGA CGACCATACTT-GTTCA	Eukariotska
rbcLa-F	TCTTCCCTACACGAC- GCTCTCCGATCTATGTCACCACA AACAGA-GACTAAAG	Eukariotska
ITS2_Pollen_F	TCTTCCCTACACGAC- GCTCTCCGATCTATGCGATACTT GGTGTGAAT	Eukariotska
ITS2_Pollen_R	CTGGAGTTCAGAC- GTGTGCTCTCCGATCTGACGCTT CTCCAGACTACAAT	Eukariotska
16S_347-803F	TCTTCCCTACACGAC- GCTCTCCGATCTG- GAGGCAGCAGTRRGAAT	Prokariotska
16S_347-803R	CTGGAGTTCAGAC- GTGTGCTCTCCGATCTC- TACCRGGTATCTAATCC	Prokariotska

Postavke PCR uređaja su bile sljedeće:

1. Denaturacija pri 95 °C, 15 min
2. Denaturacija pri 95°C, 0:30 min
3. Sparivanje početnica pri 52°C, 1 min
4. Elongacija pri 72°C, 1 min
5. Ponavljanje 2.-4. koraka 34 puta
6. Ekstenzija pri 72°C, 10 min
7. Inkubacija pri 10 °C, 10 min.

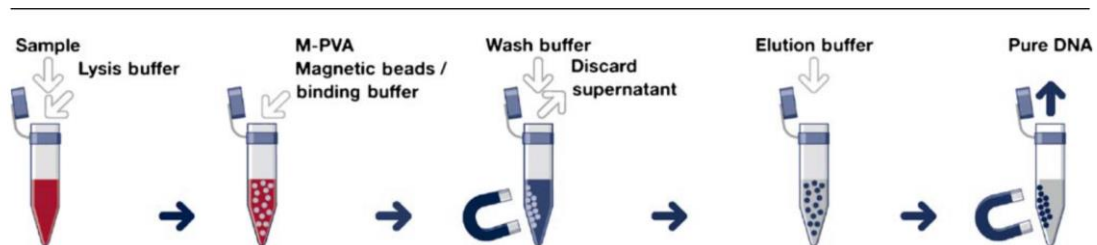
Nakon potpunog ciklusa u termo bloku, uzorci su centrifugirani jednu minutu pri 1000 rpm te podvrgnuti gel elektroforezi radi vizualizacije produkata i provjere uspješnosti odrađene PCR analize. Za izradu gela korišteno je 112 mL 1xTAE pufera, 1,69 g agarose i 1,5 µl HD Green bojila. Gel je sadržavao 86 jažica za nanošenje 1 µl svakog pojedinačnog uzorka. Gel je izložen

izvoru struje 30 minuta pri 70 V. S obzirom na uspješnu vizualizaciju PCR produkata pomoću gel elektroforeze, uzorci su podvrgnuti daljnjoj analizi.

#### 3.3.4. Pročišćavanje uzoraka

Pročišćavanje se provodi sa svrhom odvajanja DNA ili PCR produkata od svih suvišnih tvari (nečistoća); oligopeptida, početnica i dr. tvari koje kontaminiraju uzorke. Metoda provedena korištenjem magnetnih čestica koje predstavljaju jednostavan, ekonomičan i vremenski isplativ postupak (DeAngelis i sur., 1995; Ma i Difazio, 2008; Santos i sur., 2017) (Slika 15).

Za proces pročišćavanja uzoraka korišten je MagnaMedics-ov komplet Magsi-NGS<sup>Prep</sup> Plus. Upotrijebljeno je 2.86 µl AMPure XPB magnetnih kuglica koje su miješane uz pomoć pipete s 4 µl DNA uzorka. Nakon homogenizacije, u mješavinu su uronjeni magnetni separatori kojim se nastoje prikupiti sve magnetne kuglice koje na sebe imaju adsorbirane PCR produkte. Kuglice se zatim dva uzastopna puta ispiru u 200 µl 80 %-tnog alkohola. Posljednji korak uključuje ispiranje uzoraka u 20 µl 10 mM Tris pufera i uklanjanje magnetnih kuglica separatorom iz mješavine.



Slika 15. Primjer purifikacije uzoraka pomoću magnetnih kuglica.

(Izvor: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s00253-006-0675-0.pdf?pdf=button>)

#### 3.3.5. Indeks PCR – DNA metabarkodiranje

DNA metabarkodiranje molekularna je metoda čiji je cilj korištenjem specifičnih molekularnih oznaka (DNA regija) utvrditi prisutnost pojedinog taksona u istraživanom organskom materijalu. Sve češće je upotrebljavana posljednjih godina u području ekologije (Valentini i sur., 2009). “Repovi” na PCR produktima ciljano su mjesto za vezivanje barkod početnica.

Nakon purifikacije, metabarkodiranje je provedeno dodatkom 2  $\mu$ l P5CS 13-24 “forward” (1:100) i P7CS 1-32 “reverse” (1:100) (Tablica 16) početnica u 2  $\mu$ l PCR uzorka. Nakon dodavanja početnica uzorci su stavljeni u PCR uređaj na 10 ciklusa sa sljedećim postavkama:

1. Denaturacija pri 95 °C, 15 min
2. Denaturacija pri 95 °C, 0:30 min
3. Sparivanje početnica pri 58 °C, 1 min
4. Elongacija pri 72 °C, 1 min
5. Ponavljanje 2.-4. koraka 9 puta
6. Ekstenzija pri 72 °C, 5 min
7. Inkubacija 12 °C, 20 min

Tablica 16. Sekvence P5 i P7 početnica.

Početnica	Sekvenca (5' → 3')
P5CS 13-24	AAT GAT ACG GCG ACC ACC GA
P7CS 1-32	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT

Kako bi se provjerila uspješnost metabarkodiranja, provedena je gel elektroforeza s novim PCR produktima.

Produkti su uspješno vizualizirani te je 136 uzoraka poslan na Illumina MiSeq (PE300) sekvenciranje u Genomics Service Unit u Ludwig-Maximilians Universität München (LMU) Bio-center u Njemačkoj gdje su uzorci prije analize pročišćeni i kvantificirani.

### 3.3.6. Obrada sekvenci

U ovom potpoglavlju opisani su postupci obrade sekvenci provedeni od strane osoblja Instituta za integrativna istraživanja, na University of Natural Resources and Life Sciences u Beču.

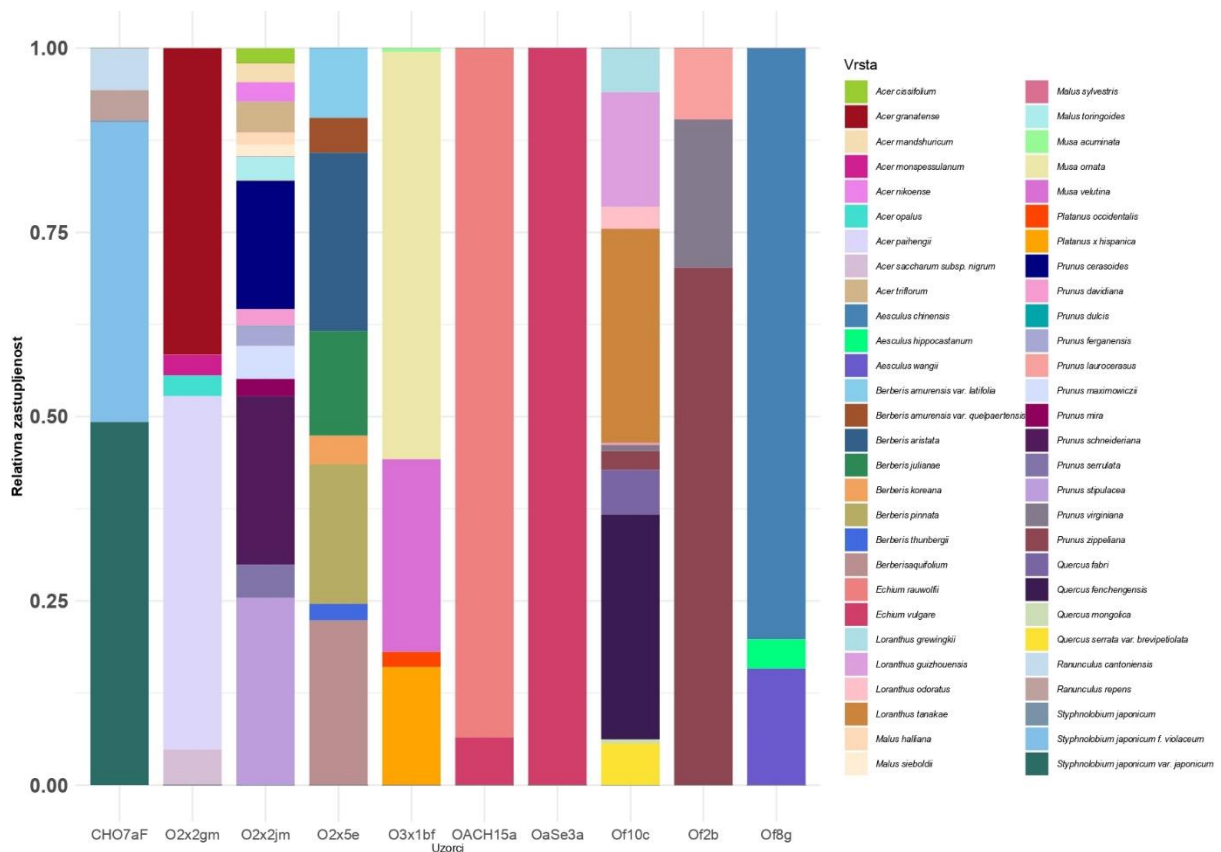
Rezultati s Illumina sekvenciranja dobiveni su u obliku FASTQ datoteka. Podvrgnuti su procesu koji je uključivao kvalitetu kontrole, skraćivanje i spajanje parova, identifikaciju sekvenci te razdvajanje podataka u datoteke; jedna datoteka za jedan par početnica. Uz dobivene podatke provedena je BLAST analiza uz lokalnu TrnL, rbcL, ITS2 i 16S bazu podataka („ABOL – Austrian Barcode of Life“). Sekvence koje nisu uključene u lokalnu bazu podataka, analizirane su pomoći NCBI baze (National Center for Biotechnology Information) te naknadno dodane lokalnoj bazi. S obzirom na opseg podataka, za daljnji prikaz rezultata, odabrane su početnice rbcL i 16S.

Rezultati sekvenciranja na Illumina MiSeq platformi obrađeni su u programskom jeziku R 4.3.1. (R Core Team, 2023) koristeći phyloseq (McMurdie i Holmes, 2013) paket za analizu sekvenci i filogenetičkih odnosa te ggplot2 (Wickham, 2016) paket za vizualizaciju i grafički prikaz dobivenih rezultata.

## 4. Rezultati

### 4.1. Početnice rbclA F / rbclR 506



S obzirom da su za identifikaciju peludi korištena tri različita para početnica, za obradu rezultata je odabran jedan par (rbclA F/rbclR 506) koji je dao najviše podataka o organizmima prisutnim u uzorcima (identifikacija do razine biljnog roda). Analiziran je 51 uzorak od čega je 10 uzoraka imalo podudarnost sekvenci s bazom podataka od minimalno 97 %. Ostalih 41 uzoraka nije prikazano u rezultatima. Par početnica rbclR koristio se za identifikaciju biljnih vrsta u ostacima peludi u fecesu pčela (Graf 17). U fecesu pčela identificirano je sveukupno 56 vrsta (Slika 18). Najzastupljenija vrsta je *Echium vulgare* (10,65 %), zatim *Prunus zippelina* (7,28 %) te *Acer paihengii* (4,79 %).



Graf 17. Grafički prikaz relativne zastupljenosti biljnih vrsta u uzorcima fecesa (OTU<sub>97</sub>).



## Vrsta

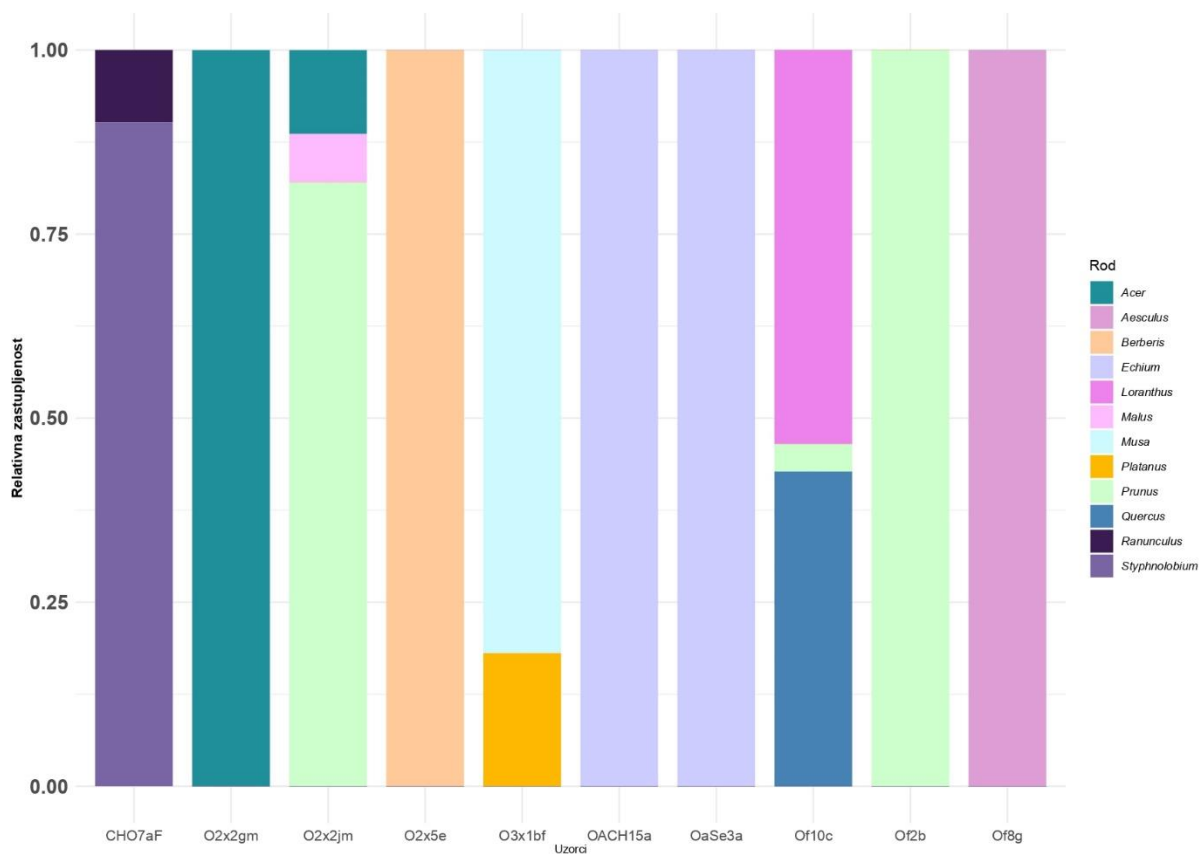
	<i>Acer cis-sifolium</i>		<i>Malus sylvestris</i>
	<i>Acer granatense</i>		<i>Malus toringoides</i>
	<i>Acer mandshunicum</i>		<i>Musa acuminata</i>
	<i>Acer monspessulanum</i>		<i>Musa ornata</i>
	<i>Acer nikoense</i>		<i>Musa velutina</i>
	<i>Acer opalus</i>		<i>Platanus occidentalis</i>
	<i>Acer paihengii</i>		<i>Platanus x hispanica</i>
	<i>Acer saccharum subsp. nigrum</i>		<i>Prunus cerasoides</i>
	<i>Acer triflorum</i>		<i>Prunus davidiana</i>
	<i>Aesculus chinensis</i>		<i>Prunus dulcis</i>
	<i>Aesculus hippocastanum</i>		<i>Prunus ferganensis</i>
	<i>Aesculus wangii</i>		<i>Prunus laurocerasus</i>
	<i>Berberis amurensis var. latifolia</i>		<i>Prunus maximowiczii</i>
	<i>Berberis amurensis var. quepaertensis</i>		<i>Prunus mira</i>
	<i>Berberis aristata</i>		<i>Prunus schneideriana</i>
	<i>Berberis julianae</i>		<i>Prunus serrulata</i>
	<i>Berberis koreana</i>		<i>Prunus stipulacea</i>
	<i>Berberis pinnata</i>		<i>Prunus virginiana</i>
	<i>Berberis thunbergii</i>		<i>Prunus zippeliana</i>
	<i>Berberisaquifolium</i>		<i>Quercus fabri</i>
	<i>Echium rauwolfii</i>		<i>Quercus fenchengensis</i>
	<i>Echium vulgare</i>		<i>Quercus mongolica</i>
	<i>Loranthus grewingkii</i>		<i>Quercus serrata var. brevipetiolata</i>
	<i>Loranthus guizhouensis</i>		<i>Ranunculus cantoniensis</i>
	<i>Loranthus odoratus</i>		<i>Ranunculus repens</i>
	<i>Loranthus tanakae</i>		<i>Styphnolobium japonicum</i>
	<i>Malus halliana</i>		<i>Styphnolobium japonicum f. violaceum</i>
	<i>Malus sieboldii</i>		<i>Styphnolobium japonicum var. japonicum</i>

Slika 18. Popis vrsta identificiranih u fecesu pčela.

Vrste identificirane uz pomoć rbcLa F/rbcLr 506 početnica pripadaju 12 biljnih rodova (Slika 19). Najzastupljeniji rodovi su *Echium* (27,42 %), *Prunus* (21,15 %) i *Acer* (11,14 %). Najmanje zastupljen rod je *Malus* (0,66 %) (Graf 20).

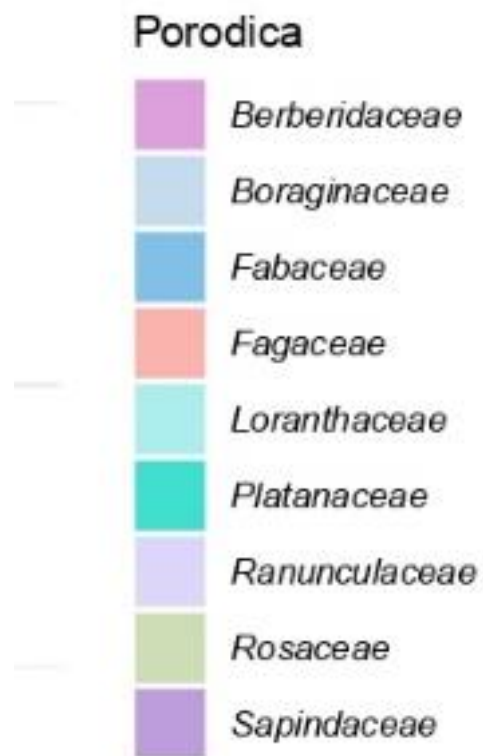


Slika 19. Popis rodova identificiranih u fecesu pčela.

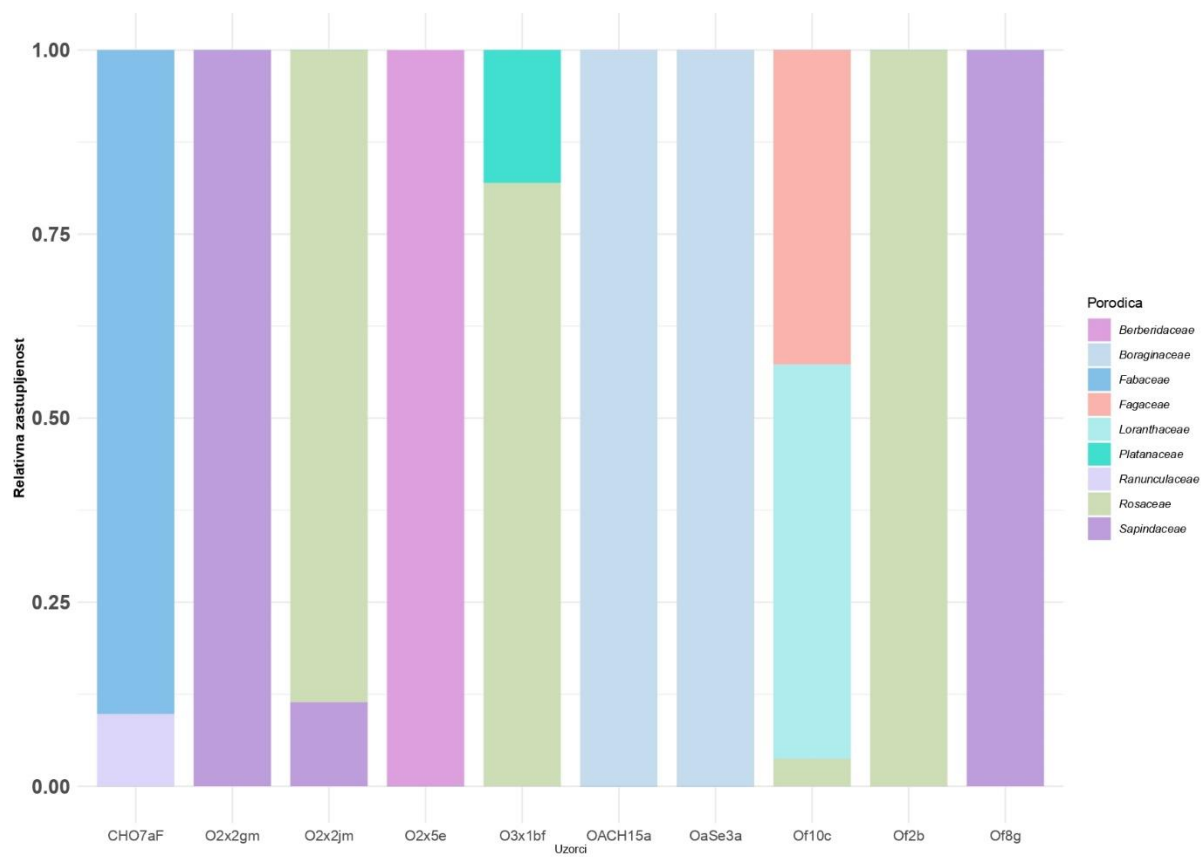


Graf 20. Relativna zastupljenost biljnih rodova u uzorcima fecesa.

Identificirano je 9 biljnih porodica pomoću rbcLa F/rbclr 506 početnica (Slika 21). Najzastupljenija porodica je Rosaceae (27,42 %), zatim Sapindaceae (21,15 %), Boraginaceae (20 %). Najmanje zastupljena porodica je Ranunculaceae (0,98 %) (Graf 22)



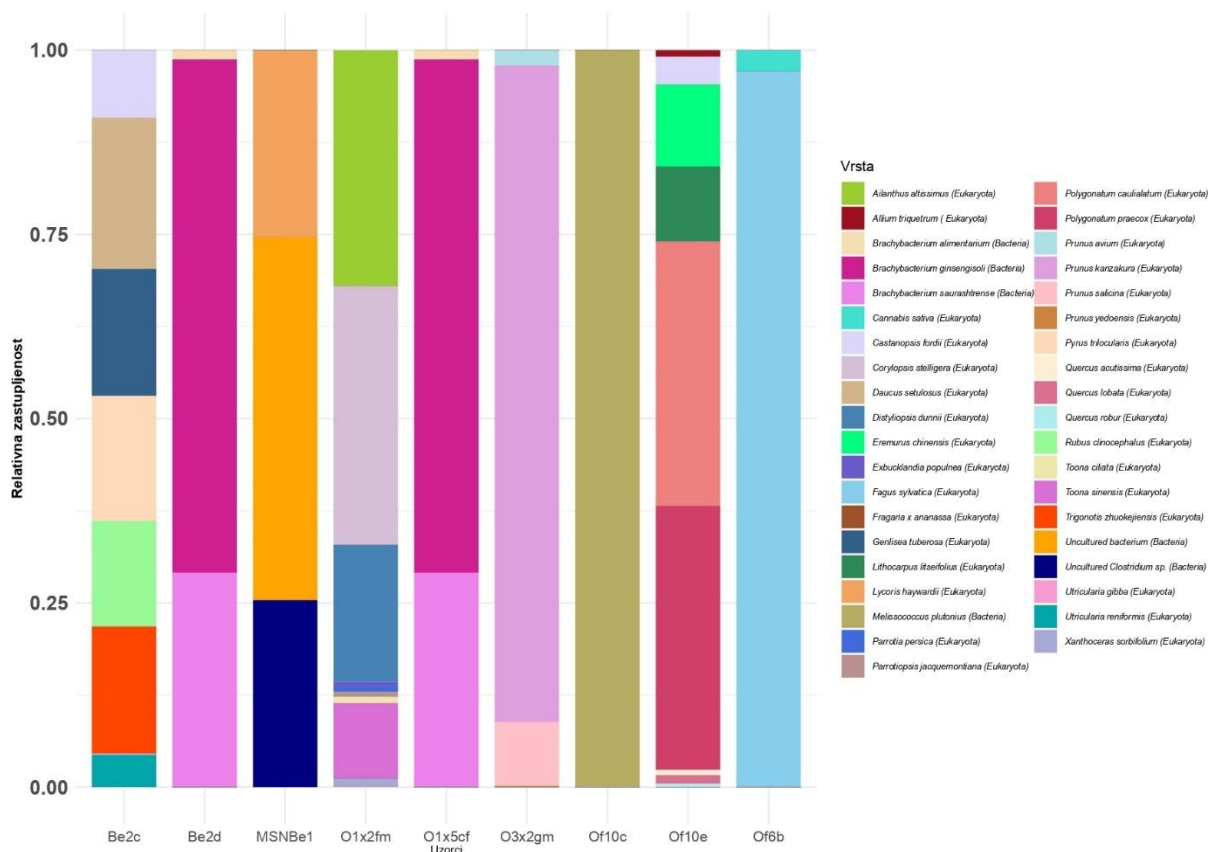
Slika 21. Popis biljnih porodica identificiranih u fecesu pčela



Graf 22. Relativna zastupljenost biljnih porodica u uzorcima fecesa.

## 4.2. Početnice 16S 347-803 F / 16S 347-803 R

Par početnica 16S 347-803 korišten je za identifikaciju bakterijskog sastava fecesa pčela OTU<sub>95</sub>. Početnice su također targetirale kloroplastnu DNA u uzorcima fecesa što nije bio cilj, ali je dalo veći uvid u biljnu preferenciju pčela (Graf 23). Identificirano je 6 vrsta bakterija i 33 biljnih vrsta (Slika 24). Najzastupljenija vrsta bakterija je *Brachybacterium ginsengisoli* (15, 48 %), zatim *Melissococcus plutonius* (11,11 %) te *Brachybacterium saurashtrense* (6,47 %).



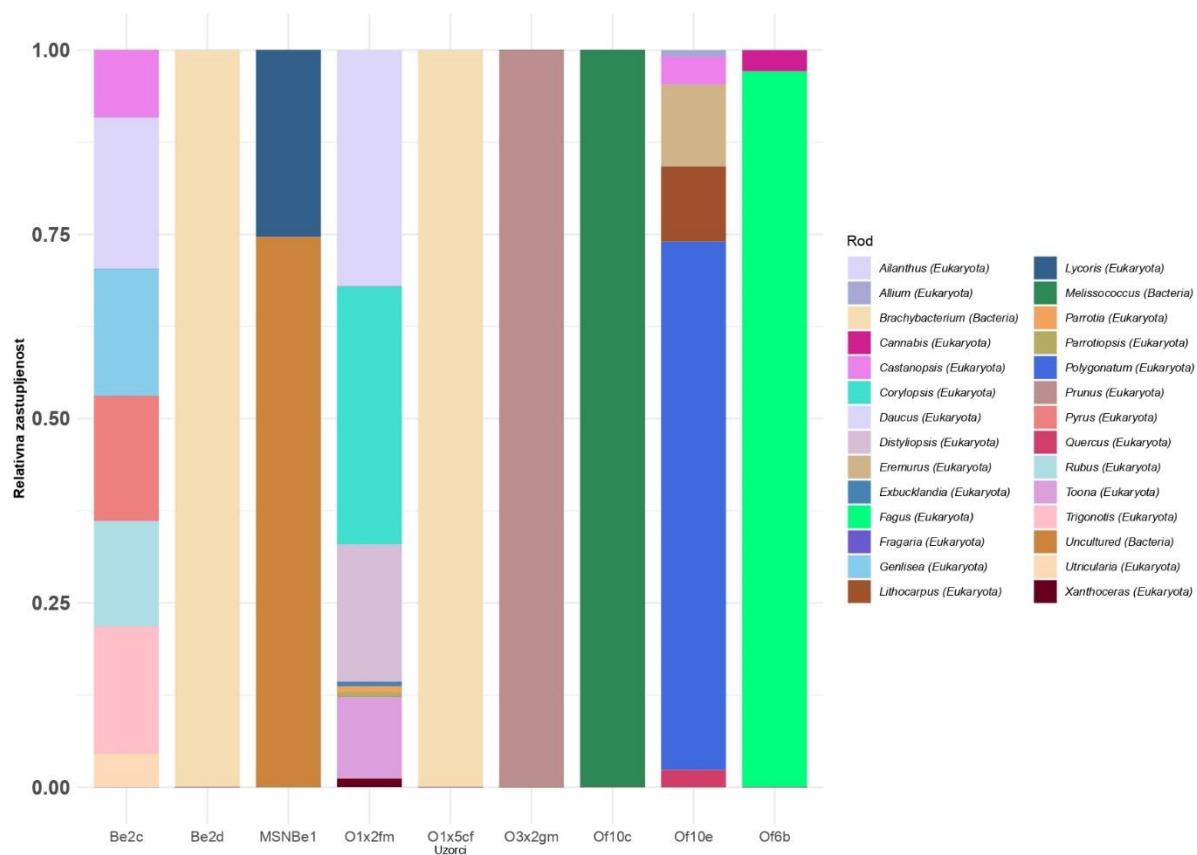
Graf 23. Relativna zastupljenost bakterijskih i biljnih vrsta u uzorcima fecesa (OTU<sub>95</sub>).

## Vrsta

 <i>Ailanthus altissimus</i> (Eukaryota)	 <i>Polygonatum caulialatum</i> (Eukaryota)
 <i>Allium triquetrum</i> (Eukaryota)	 <i>Polygonatum praecox</i> (Eukaryota)
 <i>Brachybacterium alimentarium</i> (Bacteria)	 <i>Prunus avium</i> (Eukaryota)
 <i>Brachybacterium ginsengisoli</i> (Bacteria)	 <i>Prunus kanzakura</i> (Eukaryota)
 <i>Brachybacterium saurashtrense</i> (Bacteria)	 <i>Prunus salicina</i> (Eukaryota)
 <i>Cannabis sativa</i> (Eukaryota)	 <i>Prunus yedoensis</i> (Eukaryota)
 <i>Castanopsis fordii</i> (Eukaryota)	 <i>Pyrus trilocularis</i> (Eukaryota)
 <i>Corylopsis stelligera</i> (Eukaryota)	 <i>Quercus acutissima</i> (Eukaryota)
 <i>Daucus setulosus</i> (Eukaryota)	 <i>Quercus lobata</i> (Eukaryota)
 <i>Distyliopsis dunnii</i> (Eukaryota)	 <i>Quercus robur</i> (Eukaryota)
 <i>Eremurus chinensis</i> (Eukaryota)	 <i>Rubus dinocephalus</i> (Eukaryota)
 <i>Exbucklandia populnea</i> (Eukaryota)	 <i>Toona ciliata</i> (Eukaryota)
 <i>Fagus sylvatica</i> (Eukaryota)	 <i>Toona sinensis</i> (Eukaryota)
 <i>Fragaria x ananassa</i> (Eukaryota)	 <i>Trigonotis zhuokejiensis</i> (Eukaryota)
 <i>Genlisea tuberosa</i> (Eukaryota)	 <i>Uncultured bacterium</i> (Bacteria)
 <i>Lithocarpus litseifolius</i> (Eukaryota)	 <i>Uncultured Clostridium sp.</i> (Bacteria)
 <i>Lycoris haywardii</i> (Eukaryota)	 <i>Utricularia gibba</i> (Eukaryota)
 <i>Melissococcus plutonius</i> (Bacteria)	 <i>Utricularia reniformis</i> (Eukaryota)
 <i>Parrotia persica</i> (Eukaryota)	 <i>Xanthoceras sorbifolium</i> (Eukaryota)
 <i>Parrotiopsis jacquemontiana</i> (Eukaryota)	

Slika 24. Popis biljnih i bakterijskih vrsta identificiranih u fecesu pčela.

Relativna zastupljenost rodova identificiranih pomoću 16S početnica navedena je na Grafu 24. Rodovi koji pripadaju bakterijama čine 41,62 % relativnog udjela, a rodovi koji pripadaju eukariotima (biljkama) čine 58,38 % (Slika 25). Najzastupljeniji rodovi bakterija su *Brachybacterium* (22,22 %) i *Melissococcus* (11,11 %). Najzastupljeniji biljni rod je *Prunus* (11,11 %) te *Fagus* (10,79 %).



Graf 24. Relativna zastupljenost bakterijskih i biljnih rodova u uzorcima fecesa.






















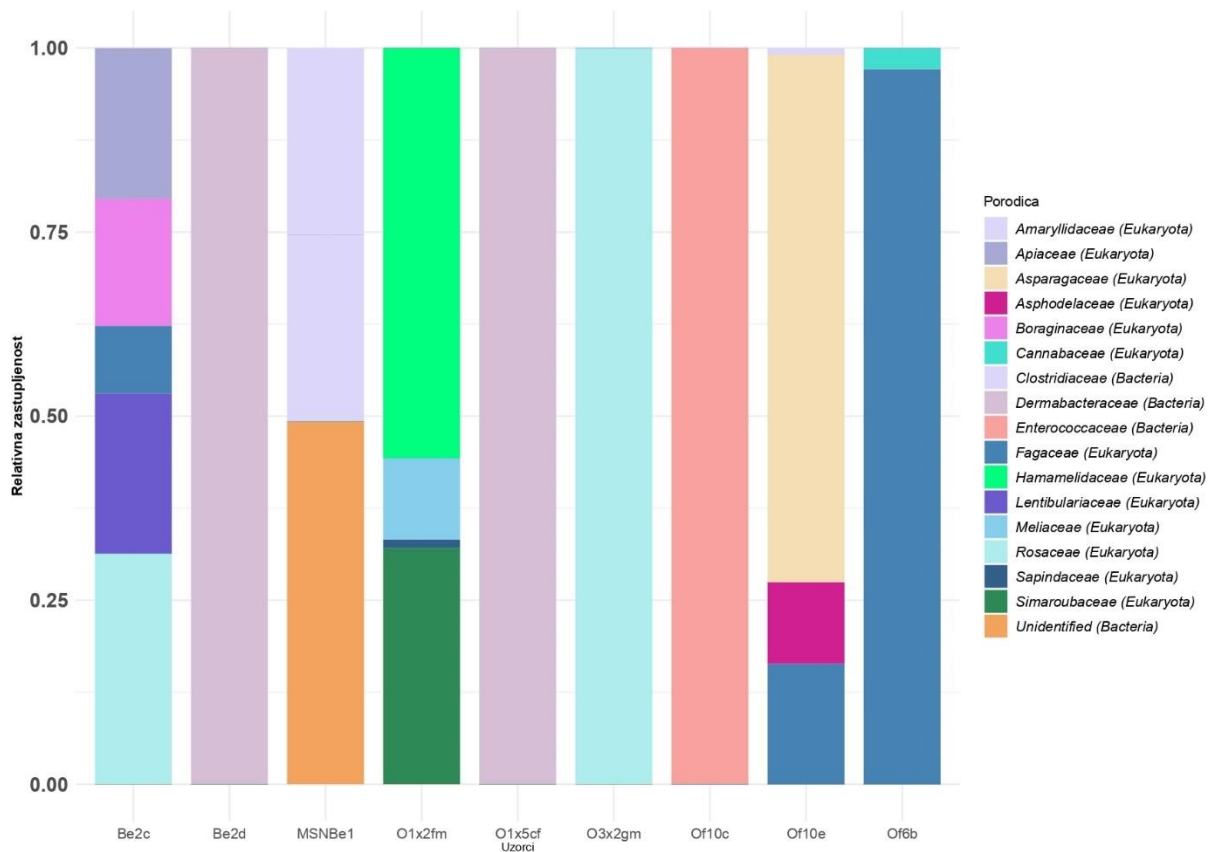
Slika 25. Popis biljnih i bakterijskih rodova identificiranih u fecesu pčela.

Identificirani rodovi pripadaju u 4 porodice bakterija i 13 rodova biljaka (Slika 26). U uzorcima fecesa pčela najzastupljeniji je bakterijski rod *Dermabacteraceae* (22,22 %) te rodovi biljaka *Rosaceae* (14,59 %) i *Fagaceae* (13,63 %) (Graf 27).

Porodica

	<i>Amaryllidaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Apiaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Asparagaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Asphodelaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Boraginaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Cannabaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Clostridiaceae (Bacteria)</i>
	<i>Dermabacteraceae (Bacteria)</i>
	<i>Enterococcaceae (Bacteria)</i>
	<i>Fagaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Hamamelidaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Lentibulariaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Meliaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Rosaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Sapindaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Simaroubaceae (Eukaryota)</i>
	<i>Unidentified (Bacteria)</i>

Slika 26. Popis biljnih i bakterijskih vrsta identificiranih u fecesu pčela uz pomoć 16S početnica.



Graf 27. Relativna zastupljenost biljnih i bakterijskih porodica u uzorcima fecesa.

### 4.3. Analiza biljnih preferencija

Uzevši u obzir rezultate dobivene uz rbcL i 16S početnice, najčešće identificirane biljne porodice u fecesu pčela su Rosaceae, Sapindaceae, Fabaceae i Boraginaceae. Manji udio čine Berberidaceae, Loranthaceae, Fagaceae, Asparagaceae i Hamamelidaceae te nakon njih Musaceae, Platanaceae, Ranunculaceae, Lentibulariaceae, Apiaceae, Amarillidaceae, Simaroubaceae, Asphodelaceae, Meliaceae i Cannabaceae.

### 4.4. Rezultati analiza prema vrstama pčela

#### 4.4.1. *Hoplitis adunca*

U uzorcima fecesa pčele *Hoplitis adunca* uz rbcL početnice identificirane su vrste biljaka *Echium vulgare* i *Echium rauwolfii* koji pripadaju porodici Boraginaceae. Uz 16S početnice identificirano je 7 vrsta biljaka koje pripadaju porodicama Apiaceae, Boraginaceae, Fagaceae, Lentibulariaceae i Rosaceae. Bakterije identificirane iz fecesa pčele *H. Adunca* su *Brachybacterium alimentarium*, *Brachybacterium ginsengisoli* i *Brachybacterium saurashtrense* (Dermabacteraceae).

#### 4.4.2. *Osmia bicornis*

U uzorcima fecesa pčele *Osmia bicornis* identificirano je uz rbcL početnice 47 biljnih vrsta koje pripadaju porodicama Sapindaceae, Rosaceae, Berberidaceae, Loranthaceae i Fagaceae. Uz 16S početnice identificirano je 17 biljnih vrsta iz porodica Hamamelidaceae, Meliaceae, Sapindaceae, Simaroubaceae, Rosaceae, Amaryllidaceae, Asparagaceae, Asphodelaceae, Fagaceae i Cannabaceae. Od bakterija identificirane su *Brachybacterium ginsengisoli* i *Brachybacterium saurashtrense* (Dermabacteraceae) te *Melissococcus plutonius* (Enterococcaceae).

#### **4.4.3. *Megachile sculpturalis***

Iz uzoraka fecesa pčele *Megachile sculpturalis* pomoću rbcL početnica identificirano je 4 biljne vrste iz porodica Fabaceae i Ranunculaceae. Uz 16S početnice identificirane su dvije bakterije; Uncultured *Clostridium* sp. i Uncultured bacterium. Od biljnih vrsta identificirana je samo *Lycoris haywardii* (Amaryllidaceae).

## 5. Rasprava

Na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je da molekularne analize uz Illumina sekvenciranje predstavljaju dobar izbor metode za kvalitativnu analizu biljnih, ali u ovom slučaju ne i bakterijskih, rodova i vrsta u uzorcima fecesa pčela. Najviše biljnih vrsta identificirano je iz fecesa pčele *Osmia bicornis*, zatim *Megachile sculpturalis* te najmanje iz fecesa vrste *Hoplitis adunca*.

Keller i sur. (2021.) navode kako su biljke koje solitarne pčele posjećuju izvori mikrobiološkog prijenosa i da mogu uvelike doprinijeti nutritivnoj kvaliteti peludi, detoksifikaciji i razgradnji peludi prilikom ishrane. Haider i sur. (2014) istraživali su pčele roda *Osmia* i njihove biljne preference prilikom ishrane. Analizirajući pelud sakupljenu s abdomena pčela, ustanovili su da pčele vrste *Osmia bicornis* imaju visoku preferenciju prema biljaka porodica Ranunculaceae i rodu *Quercus*. Ostali identificirani uzorci peludi pripadali su biljnim porodicama Fabaceae, Cistaceae, Papaveraceae, Aceraceae, Brassicaceae, Rosaceae i Lamiaceae. *Osmia bicornis* u ovom istraživanju također pokazuje preferenciju prema biljkama roda *Quercus*, kao i porodicama Ranunculaceae, Fabaceae i Rosaceae, što je sukladno rezultatima Haider i sur. (2014). U ovom istraživanju porodica Rosaceae s pripadajućim rodom *Prunus* sp. čini najveći udio identificiranih biljaka iz fecesa pčele *O. bicornis*. Splitt i sur. (2021) navode kako pčele vrste *O. bicornis* uzgojene u ruralnim područjima, u usporedbi s urbanim, sakupljaju raznovrsniju pelud. Također navode kako *O. bicornis* u urbanim područjima najčešće sakuplja pelud s drveća dok u ruralnim područjima sakupljaju pelud i sa zeljastih vrsta. Napominju kako je za dobrobit *O. bicornis* važno saditi biljke iz porodice Rosaceae. To je potvrđeno ovim istraživanjem gdje je osim porodice Rosaceae, utvrđena preferencija solitarnih pčela prema rodovima Sapindaceae, Fabaceae i Boraginaceae i Ranunculaceae.

Rod *Prunus* obuhvaća mnoge kultivirane vrste u područjima umjerene klime koje su često uzgajane u našim područjima, a obuhvaća voćke poput šljive, nektarine, breskve, trešnje i višnje (Natić i sur., 2020). U porodicu Rosaceae osim roda *Prunus* pripadaju i rodovi *Malus* (jabuke), *Rubus* (kupine, maline) i *Fragaria* (jagode) (Sytsma, 2023).

Porodica Sapindaceae obuhvaća rod *Aesculus* u koji pripada kod nas prisutan u urbanim područjima *Aesculus hippocastanum* (divlji kesten). U Sapindaceae također pripada i rod javora, *Acer* sp. Najznačajnije vrste na našem području su parkovne vrste klen (*Acer campestre*), maklen (*Acer monspessulanum*), gorski (bijeli) javor (*Acer pseudoplatanus*), mliječ

(*Acer platanoides*), javor gluhač (*Acer obtusatum*), negundovac (*Acer negundo*), japanski javor (*Acer palmatum*) i šećerni javor (*Acer saccharum*) (Plantea, 2023).

Kosrištenjem 16 S početnica u ovom istraživanju identificirana je i vrsta *Xanthoceras sorbifolium* u fecesu pčele *H. adunca*. Rodovi *Acer* sp. i *Aesculus* sp. identificirani su iz fecesa *O. bicornis*.

Porodica mahunarki, Fabaceae, treća je najveća porodica među kritosjemenjačama, a obuhvaća više od 700 rodova i oko 20 000 vrsta u cijelom svijetu (Britannica, 2023). Pomoću rbCL početnica u uzorcima fecesa identificirana je vrsta *Styphnolobium japonicum*, japanska sofora, listopadno stablo koje se u Europi počelo uzgajati u 18. stoljeću, a sadi se u parkovima i većim dvorištima. Pčele rado posjećuju ovo stablo sakupljajući s njega nektar koji sadrži 54 % šećera (Plantea, 2023). Bila Dubaić i Lanner (2021) te Quaranta i suradnici (2014) u svojim radovima navode kako je ova biljka preferabilni izvor hrane za *M. sculpturalis* i *O. bicornis* što je i u ovom istraživanju potvrđeno.

Porodica Boraginaceae (oštroliste) obuhvaća otprilike 140 rodova od čega su mnoge vrtne ukrasne biljke (Berry, 2023), a među njima je i rod ježevica, *Echium*. Na našim područjima najpoznatija vrsta roda *Echium* je *Echium vulgare* (lisičina), višegodišnja zeljasta biljka prirodno rasprostranjena na području južne i srednje Europe. Pčele ju obilaze zbog mnogo nektara s čak 30-45 % šećera kojeg biljka proizvodi (Plantea, 2023). Ovim istraživanjem dokazana je prisutnost roda *Echium* u fecesa pčele *H. adunca*. Takav rezultat sukladan je navodima Burger i sur. (2010) o specijaliziranoj ishrani *H. adunca* isključivo biljkama roda *Echium*.

Porodica žabnjakovki, Ranunculaceae, je porodica trajnih zeljastih biljaka, rjeđe drvenastih grmova ili povijuša, koja obuhvaća 60 rodova s oko 1700 vrsta (Struna, 2023). Jedan od najpoznatijih rodova je *Ranunculus*, prirodno rasprostranjen na području Europe i Azije. Staništa su mu vlažne livade i pašnjaci, u potoke i kanale. Pčele rado posjećuju cvjetove ove porodice s kojih sakupljaju dosta peluda i malo nektara (Plantea, 2023).

Rad Tepera i sur. (2008) fokusiran je na identificiranje biljaka iz fecesa pčele *Megachile rotundata*, pripadnika porodice Megachilidae. U istraživanju su autori uspješno identificirali 46 biljnih taksona. Među rezultatima navode između ostalog identificirane porodice Fabaceae i Rosaceae, od čega Fabaceae ističu kao preferabilni izvor hrane. Rod *Ranunculus* također je identificiran iz fecesa pčele *M. sculpturalis*. Naši rezultati sukladni su navedenom istraživanju jer su u fecesu pčele *M. sculpturalis* identificirane biljke iz porodice Fabaceae, međutim brojnost identificiranih vrsta navedene porodice u ovom istraživanju je značajno manja

(identificirane četiri biljne vrste). Pretpostavka je kako takav rezultat ima veze s činjenicom da veliku većinu drveća na području Europe čine biljke porodice Rosaceae (IUCN, 2019).

Rezultati ukazuju na veliku raznolikost biljnih vrsta posjećenih od strane pčele *Osmia bicornis* što ukazuje na njezinu važnost kao oprašivača u urbanim područjima; gradskim i privatnim vrtovima, balkonima, parkovima, ali i potencijal za primjenu kao oprašivača poljoprivrednih površina.

Obzirom da je u uzorcima fecesa kod vrsta *Megachile sculpturalis* i *Osmia bicornis* utvrđen kontakt s biljkama porodice Rosaceae možemo govoriti o mogućnosti potencijalnog kontakta između ovih dviju vrsta pčela. To je važno zbog činjenice da vrsta *M. sculpturalis* ima invazivni karakter (Quaranta i sur., 2014; Bila Dubaić i Lanner, 2021), a broj uočenih jedinki diljem Europe je sve veći. Uočeno je kako upravo ta vrsta uništava već postojeća gnijezda autohtonih vrsta kako bi sagradila svoja što može dovesti do ugroze domaćih vrsta solitarnih pčela, primjerice *Osmia bicornis* i *Hoplitis adunca* (Bila Dubaić i Lanner, 2021).

Od bakterijskih vrsta iz uzoraka fecesa triju vrsta solitarnih pčela identificirani su *Brachy bacterium saurash tre nse*, *Brachy bacterium ginsengisoli*, *Melissococcus plutonisu*, i *Clostridium* spp.

*Brachy bacterium saurash tre nse* (porodica Dermabacteraceae) je Gram-pozitivna aerobna bakterija izolirana s korijena halofitne biljke *Salicornia brachiata*, na čiji rast ima promotivan učinak poboljšavajući usvajanje dušika iz tla (Gontia i sur., 2011). *B. ginsengisoli* je Gram-pozitivna aerobna bakterija izolirana iz tla u Koreji (Hoang i sur., 2014). Podaci o interakciji roda *Brachy bacterium* s pčelama nisu do sada utvrđeni.

Rod *Clostridium* (porodica Clostridiaceae) predstavlja raznoliku skupinu Gram-pozitivnih, mezofilnih anaerobnih vrsta. Pojavljuju u različitim ekološkim uvjetima te mogu uvelike doprinosti poboljšanju rasta biljaka; omogućuju fiksaciju dušika i solubilizaciju fosfata. U industrijskoj proizvodnji koriste se za proizvodnju biohidrogena, acetona, biobutanola, biogoriva i dr. (Figueiredo i sur., 2020). S druge strane, prisustvo pojedinih vrsta roda *Clostridium* (*C. botulinum*, *C. difficile*) u pčelinjim proizvodima, poglavito medu, smatra se opasnim i nepoželjnim jer konzumacijom može izazvati trovanja ljudi i životinja (Nakano i sur., 1994; Matović i sur., 2019). Prisutnost *Clostridium* spp. uzorcima ovog rada podudara se s do sad istraživanim bakterijama kod solitarnih pčela. Istraživanja Kokota i sur. (2019) navode prisutnost porodica Acetobacteraceae, Bacillaceae, Burkholderiaceae, Clostridiaceae,



Comamonadaceae, Enterobacteriaceae, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae, Methylobacteriaceae, Moraxellaceae, Sphingomonadaceae i Oxalobacteraceae.

*Melissococcus plutonius* iz porodice bakterija Enterococcaceae aerobna je Gram-pozitivna bakterija koja uzrokuje zaraznu bolest europsku gnjiloću pčelinjeg legla. Karakteristični znakovi bolesti su uginule i/ili promijenjene ličinke pčela. Bolest se dijagnosticira kliničkim pregledom pčelinje zajednice te izdvajanjem i identificiranjem uzročnika (Kovačić, 2014). Spore *M. plutonius* u propaljoj pčelinjoj ličinki infektivne su više desetaka godina. Bolest se širi mehaničkom kontaminacijom košnice te može biti prenesena s pčele na pčelu putem kontakta s izmetom zaraženih ličinki ili odraslih jedinki koje su preživjele zarazu u ličinačkom stadiju (Svjetska organizacija za zdravlje životinja, 2023; Hrvatska enciklopedija, 2023). Ravoet i sur. (2014) navode kako su *Varroa destructor* i virusi koji infestiraju košnice medonosnih pčela također pronađene i kod jedinki solitarnih pčela te navode kako solitarne pčele mogu predstavljati „rezervoar“ za patogene medonosnih pčela. Prevladavajući oblik prijenosa mikroorganizama među jedinkama medonosnih pčela je oralno-fekalnim putem i kontaktom s košnicom. Kod solitarnih pčela nema međugeneracijskog kontakta među jedinkama, a ličinke nemaju međusobnog kontakta s obzirom da se razvijaju u zasebnim ograđenim kompartmentima. Usprkos tome, odrasla jedinka, polažući jajašca u kompartmentima ostavlja sakupljenu pelud te putem salivacije prenosi mikroorganizme koji mogu imati pozitivan utjecaj na razvoj ličinki doprinoseći obrani od okolišnih patogena (Kokota i sur., 2019). Crijevnom mikrobiotom pčele dominira 8 do 10 bakterijskih filotipova (Wong i Moran, 2016; Ellegaard i Engel, 2019; Zhang i sur., 2022). Rezultati ovog istraživanja ukazuju na malenu uspješnost identifikacije bakterija u fecesu pčela što implicira na greške u provedbi istraživanja; potencijalne greške u filtriranju podataka, obradi sekvenci ili manjkavosti baze podataka s kojom su sekvence uspoređivane.

Unatoč identificiranim nedostacima ovo istraživanje doprinosi razumijevanju ekologije solitarnih pčela i njihovih interakcija s okolišem jer pruža dragocjene podatke o njihovim biljnim i bakterijskim partnerima u urbanim i ruralnim sredinama. Do sada nije provedeno mnogo istraživanja koja su se fokusirala na ovo specifično područje. Ovakvi preliminarni rezultati naglašavaju važnost očuvanja solitarnih pčela, kao i raznolikosti biljaka i mikroorganizama u njihovim ekosustavima, posebno u urbanim sredinama gdje se često zanemaruju.

## 6. Zaključak

Analize biljnih preferencija solitarnih vrsta pčela *H. adunca*, *O. bicornis* i *M. sculpturalis* ukazuju na učestalo posjećivanje biljaka rodova *Prunus*, *Acer* i *Echium*. Navjeći broj biljnih vrsta identificiran je iz fecesa pčele *Osmia bicornis*.

Kod pčela vrste *Osmia bicornis* utvrđena je prehrambena preferencija prema porodici Rosaceae te pripadajućem rodu *Prunus*. Pčele vrste *Hoplitis adunca* pokazuju preferenciju prema rodu *Echium* sp. što se podudara s podacima iz postojećih literaturnih izvora. Kod pčela vrste *Megachile sculpturalis* utvrđena je preferencija prema rodu *Ranunculus* (porodica Ranunculaceae).

Analiza 16S rRNA gena ukazuje na prisutnost bakterije *Melissococcus plutonius* i roda *Brachybacterium* kod pčela vrste *O. bicornis* te roda *Clostridium* kod pčela vrste *M. sculpturalis*.

Navedeni rezultati ukazuju na prisutnost bakterijske zaraze kod solitarnih pčela, a koje su do sada istraživane samo kod socijalnih (medonosnih) pčela. S obzirom da solitarne pčele dolaze u kontakt s medonosnim te nerijetko posjećuju iste biljke, potrebno je provesti više istraživanja vezanih uz mikrobiotu želuca solitarnih pčela kako bi se moglo pravovremeno spriječiti potencijalno širenje zaraza među vrstama. S obzirom na važnost solitarnih pčela i njihov doprinos u ulozi oprašivača, nužno je obratiti više pažnje na njihovu biologiju i ekologiju kako bi se održao i povećao, broj njihovih populacija bez kojih cvatnja i biljni prinos u cijelom svijetu ne bi bili mogući.

## Popis literature

1. Alberdi, A., Aizapuria, O., Gilbert, M.T.P., Bohmann, K. (2018). Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 9, 134-147.
2. Beaudelaine Kengni, S., Fohouo, F.N.T., Ngakou, A. (2015). Impact of the foraging activity of *Apis mellifera adansonii* Latreille (Hymenoptera: Apidae) and *Bradyrhizobium* fertilizer on pollination and yield components of *Glycine max* L. (Fabaceae) in the field. *International Journal of Biological Research*, 3(2), 64-71.
3. Berry, P.E. (2023). Boraginaceae, plant family. *Britannica* <<https://www.britannica.com/plant/Boraginaceae>> Pristupljeno 23.6.2023.
4. Bila Dubaić, J., Lanner, J. (2021). *Megachile sculpturalis* (Hymenoptera: Megachilidae): A Valuable Study Organism for Invasive Pollinators and the Role of Beekeepers in Ongoing Monitoring Programs. *Bee World*, 98, 78-82.
5. *Britannica* (2023). Amaryllidaceae, plant family. *Britannica* <<https://www.britannica.com/plant/Amaryllidaceae>> Pristupljeno 27.6.2023.
6. Burger, H., Ayasse, M., Haberlein, C.M., Schulz, S., Dotterl, S. (2010). *Echium* and *Pontechium* specific floral cues for host-plant recognition by the oligolectic bee *Hoplitis adunca*. *South African Journal of Botany*, 76(4), 788-795.
7. Centar za biologiju pčela (2022). Azijska pčela smolarica. <<https://sites.google.com/bio.bg.ac.rs/srbee/azijska-pcela-smolarica?authuser=0>> (pristupljeno: 23.11.2022).
8. Ćosić, J. (2014). DNA barkodiranje kao metoda u taksonomskoj identifikaciji biljnih i životinjskih vrsta. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
9. Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., Quan, P., Briese, T., Hornig, M., Geiser, D.M., Martinson, V., vanEngelsdorp, D., Kalksterin, A.L., Drysdale, A., Hui, J., Zhai, J., Cui, L., Hutchison, S.K., Simons, J.F., Egholm, M., Pettis, J.S., Lipkin, W.I. (2007). A Metagenomic Survey of Microbes in Honey Bee Colony Collapse Disorder. *Science*, 318, 283-287.
10. Dosch, C., Manigk, A., Streicher, T., Tehel, A., Paxton R.J., Tragust, S. (2021). The Gut Microbiota Can Provide Viral Tolerance in the Honey Bee. *Microorganisms* 9(4), 871.
11. Ellegaard, K.M., Engel, P. (2019). Genomic diversity landscape of the honey bee gut microbiota. *Nature Communications*, 10, 446.
12. Engel, P., Martinson, V.G., Moran, N.A. (2012) Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *PNAS*, 109(27), 11002-11007.
13. Exotic Bee ID (2022). *Osmia bicornis*. <[https://idtools.org/exotic\\_bee/index.cfm?packageID=1185&entityID=9060](https://idtools.org/exotic_bee/index.cfm?packageID=1185&entityID=9060)> Pristupljeno 1.7.2023.

14. Exotic Bee ID (2022). *Osmia cornuta*. <[https://idtools.org/exotic\\_bee/index.cfm?packageID=1185&entityID=9063](https://idtools.org/exotic_bee/index.cfm?packageID=1185&entityID=9063)> Pristupljeno 1.7.2023.
15. Exotic Bee ID (2023). *Hoplitis*. <[https://idtools.org/exotic\\_bee/index.cfm?packageID=1181&entityID=8962](https://idtools.org/exotic_bee/index.cfm?packageID=1181&entityID=8962)> Pristupljeno 27.7.2023.
16. Figueiredo G.G.O., Lopes, V.R., Romano, T., Camara, M.C. (2020). Chapter 22 - Clostridium. Beneficial Microbes in Agro-Ecology, 477-491.
17. Gontia, I., Kavita, K., Schmid, M., Hartmann, A., Jha, B. (2011). *Brachybacterium saurashtrense* sp. nov., a halotolerant root-associated bacterium with plant growth-promoting potential. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, 2799-2804.
18. Gorton Linsley, E. (1958). The ecology of solitary bees. A Journal of Agricultural Science, 27(19).
19. Greenleaf, S.S., Kremen, C. (2006). Wild bees enhance honey bees' pollination of hybrid sunflower. PNAS, 103(37), 13890-13895.
20. Haider, M., Dorn, S., Sedivy, C., Muller, A. (2014). Phylogeny and floral hosts of a predominantly pollen generalist group of mason bees (Megachilidae: Osminiini). Biological Journal of the Linnean Society, 111, 78-91.
21. Hoang, V., Kim, Y., Nguyen, N., Yang, D. (2014). *Brachybacterium ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(9), 3063-3068.
22. Hrvatska enciklopedija (2023). Gnjiloća pčelinjeg legla. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje <<https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=22447>> Pristupljeno 30.6.2023.
23. IUCN (2019). European Red List of Trees. European Union.
24. Keller, A., Grimmer, G., Steffan-Dewenter, I. (2013). Diverse microbiota identified in whole intact nest chambers of the red mason bee *Osmia bicornis* (Linnaeus 1758). PLoS One, 8(10).
25. Keller, A., McFrederick, Q. S., Dharampal, P., Steffan, S., Danforth, B.N., Leonhardt, S.D. (2021). (More than) Hitchhikers through the network: The shared microbiome of bees and flowers. Current Opinion In Insect Science, 44, 1-8.
26. Kesy, M., Banaszak-Cibicka, W., Dylewski, L., Fliszkiewicz, M. (2023). Effect of *Osmia bicornis* supplemental pollination on seed yield of forest seed orchards. Apidologie, 54.
27. Kline, O., Joshi, N.K. (2020). Mitigating the Effects of Habitat Loss on Solitary Bees in Agricultural Ecosystems. Agriculture, 10(4), 115.
28. Koch, H., Schmid-Hempel, P. (2011). Bacterial Communities in Central European Bumblebees: Low Diversity and High Specificity. Microbial Ecology, 62(1), 121-133.
29. Kovačić, M. (2014). Europska gnjiloća medonosne pčele. Veterinarski fakultet, Zagreb.

30. Kronic, M., Stanisavljević, Lj., Pinzauti, M. (2005). The accompanying fauna of *Osmia cornuta* and *Osmia rufa* and effective measures of protection. *Bulletin of Insectology*, 58(2), 141-152.
31. Kučinić, M. (2022). DNA barkodiranje bioraznolikosti hrvatske faune, <[http://www.pmf.unizg.hr/biol/dna\\_barkodiranje](http://www.pmf.unizg.hr/biol/dna_barkodiranje)> (Pristupljeno: 05.01.2023).
32. Kwong, W.K., Moran, N.A. (2016). Gut microbial communities of social bees. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 374-384.
33. Matović, K., Mišić, D., Karabasil, N., Nedić, N., Dmitrić, M., Jevtić, G., Ćirić, J. (2019). *Clostridium botulinum* spores in European honey bees from Serbia. *Journal of Agricultural Research*, 58(3), 420-426.
34. McGee, K.M., Robinson, C., Porter, T.M., Compson, Z.G., Hajibabaei, M., Baird, D.J. (2022). eDNA and Bioassessment of Rivers. *Encyclopedia of Inland Waters (Second Edition)*, 2, 537-548.
35. McMurdie, P.J., Holmes, S. (2013). An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* 8(4).
36. Megachilidae (2023). Integrated Taxonomic Information System – Report. <[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=154365#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=154365#null)> Pristupljeno: 10.6.2023.
37. Nakano, H., Kizaki, H., Sakaguchi, G. (1994). Multiplication of *Clostridium botulinum* in dead honey-bees and bee pupae, a likely source of heavy contamination of honey. *International Journal of Food Microbiology*, 21(3), 247-252.
38. Natić, M., Dabić, D., Zagorac, I., Ćirić, M., Meland, M., Rabrenović M., Fotirić Akšić, M. (2020). Cold pressed oils from genus *Prunus*. *Cold Pressed Oils*, 56, 637-658.
39. Nicole, S., Negrisolo, E., Eccher, G., Mantovani, R., Patarnello, T., Erickson, D.L., Kress, W.J., Baracaccia G. (2012). DNA Barcoding as a Reliable Method for the Authentication of Commercial Seafood Products. *Food Technology and Biotechnology*, 50(4), 387-398.
40. Nieto, A., Roberts, S.P.M., Kemp, J., Rasmont, P., Kuhlmann, M., García Criado, M., Biesmeijer, J.C., Bogusch, P., Dathe, H.H., De la Rúa, P., De Meulemeester, T., Dehon, M., Dewulf, A., Ortiz-Sánchez, F.J., Lhomme, P., Pauly, A., Potts, S.G., Praz, C., Quaranta, M., Radchenko, V.G., Scheuchl, E., Smit, J., Straka, J., Terzo, M., Tomozii, B., Window, J., Michez, D. (2014). European red list of bees, European Union.
41. Nieto, A., Roberts, S.P.M., Kemp, J., Rasmont, P., Kuhlmann, M., García Criado, M., Biesmeijer, J.C., Bogusch, P., Dathe, H.H., De la Rúa, P., De Meulemeester, T., Dehon, Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3), 321-326.
42. Ostap-Chec, M., Kierat, J., Kuszewska, K., Woyciechowski, M. (2021). Red mason bee (*Osmia bicornis*) thermal preferences for nest sites and their effects on offspring survival. *Apidologie*, 52, 707-719.
43. Pčela samica (2023). Zoo Zagreb. <<https://zoo.hr/pcela-samica-osmia-rufa-osmia-cornuta/>> Pristupljeno: 10.6.2023.

44. Plantea (2023). Javor, *Acer*. Plantea. <<https://www.plantea.com.hr/javor/>> Pristupljeno 14.6.2023.
45. Plantea (2023). Lisičina, *Echium vulgare*. Plantea <<https://www.plantea.com.hr/lisicina/>> Pristupljeno 23.6.2023.
46. Plantea (2023). Žabljak ljuć, *Ranunculus acris*. Plantea <<https://www.plantea.com.hr/zabnjak-ljutic/>> Pristupljeno 25.6.2023.
47. Quaranta, M., Sommaruga, A., Balzarini, P., Felicioli, A. (2013). A new species for the bee fauna of Italy: *Megachile sculpturalis* continues its colonization of Europe. *Bulletin of Insectology*, 67(2), 287-293.
48. R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
49. Raclariu, A.C., Heinrich, M., Ichim, M.C., de Boer, H. (2017). Benefits and Limitations of DNA barcoding and Metabarcoding in Herbal Product Authentication. *Phytochemical Analysis*, 29(2), 123-128.
50. Ravoet, J., De Smet, L., Meeus, I., Samghe, G., Wenseleers, T., de Graaf, D.C. (2014). Widespread occurrence of honey bee pathogen in solitary bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 122, 55-58.
51. Raw, A., O'Toole, C. (1979). Errors in the Sex of Eggs laid by the Solitary Bee *Osmia rufa* (Megachilidae). *Behaviour*, 70(1/2), 168-171.
52. Roberts., S. (2016). *Hoplitis adunca* (Panzer, 1798). BWARS. <<https://bwars.com/bee/megachilidae/hoplitis-adunca>> Pristupljeno 27.7.2023.
53. Snider, A.M., Bonisoli-Alquati, A., Perez-Umphrey, A., Stouffer, P.C., Taylor, S.S. (2022). Metabarcoding of stomach contents and fecal samples provide similar insights about Seaside Sparrow diet. *Ornithological Applications*, 124, 1-12.
54. Splitt, A., Skorka, P., Strachecka, A., Boranski, M., Teper, D. (2021) Keep trees for bees: Pollen collection by *Osmia bicornis* along the urbanization gradient. *Urban Forestry and Urban Greening*, 64.
55. Struna (2023). Žabnjaci. Struna – Hrvatsko strukovno nazivlje <<http://struna.ihjj.hr/naziv/zabnjaci/33776/>> Pristupljeno 25.6.2023.
56. Sytsma. K.J. (2023). Rosaceae, plant family. Britannica. <<https://www.britannica.com/plant/Rosaceae>> Pristupljeno 14.6.2023.
57. Teper, D. (2008). Food plants of *Megachile rotundata* L. determined based on palinological analysis of faeces. *Journal of Apicultural Science*, 52(1), 73-81.
58. Valentini, A., Pompanon, F., Taberlet, P. (2008). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), 110-117.
59. Voulgari-Kokota, A., Grimmer, G., Steffan-Dewenter, I., Keller, A. (2019). Bacterial Community structure and succession in nests of two megachilid bee genera. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(1).
60. Voulgari-Kokota, A., McFrrederick, Q.S., Stefan-Dewenter, I., Keller, A. (2019). Drivers, Diversity and Functions of the Solitary Bee Microbiota. *Trends in Microbiology*, 27(12), 1034-1044.

61. Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York
62. World Organisation for Animal Health (2023). Diseases of bees. <<https://www.woah.org/en/disease/diseases-of-bees/>> Pristupljeno 30.6.2023.
63. Zhang, Z., Mu, X., Shi, Y., Zheng, H. (2022). Distinct Roles of Honeybee Gut Bacteria on Host Metabolism and Neurological Processes. *Microbiology Spectrum*, 10(2), 1-15.
64. Zurbuchen, A., Bachofen, C., Muller, A., Hein., S., Dorn., S. (2010). Are landscape structures insurmountable barriers for foraging bees? A mark-recapture study with two solitary pollen specialist species. *Apidologie*, 41(4), 497-508.

## Životopis

Marija Andrijana Galešić rođena je 21.1.1997. u Zagrebu. Od 2011. do 2016. godine pohađa Srednju školu za medicinske sestre Mlinarska u Zagrebu nakon čega upisuje Agroekologiju na Agronomskom fakultetu Zagreb. Tijekom svog obrazovanja dostiže C1 razinu poznavanja engleskog jezika u govoru i pismu. Dugogodišnji je volonter u izviđačkoj organizaciji te načelnica

Odreda izviđača Sljeme. 2021. godine postaje instruktor voditelj programa I. stupnja prema kriterijima Svjetske organizacije izviđačkog pokreta. U slobodno vrijeme bavi se plesom.