

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Aleksander LONGO

**IZRAŽANJE IMUNSKIH GENOV V RAZLIČNIH
RAZVOJNIH FAZAH KRANJSKE ČEBELE (*Apis
mellifera carnica*) PO IZPOSTAVITVI PESTICIDOMA
KUMAFOS IN PROKLORAZ**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Aleksander LONGO

**IZRAŽANJE IMUNSKIH GENOV V RAZLIČNIH RAZVOJNIH FAZAH
KRANJSKE ČEBELE (*Apis mellifera carnica*) PO IZPOSTAVITVI
PESTICIDOMA KUMAFOS IN PROKLORAZ**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologija

**IMMUNE GENE TRANSCRIPTION LEVELS IN HONEY BEE (*Apis
mellifera carnica*) AFTER TREATMENT WITH PESTICIDES
CUMAPHOS AND PROCHLORAZ**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes - Biotechnology

Ljubljana, 2015

Magistrska naloga je zaključek magistrskega študija – 2. stopnja Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani na oddelku za zootehniko.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorico magistrske naloge imenovala prof. dr. Mojco Narat, za so-mentorico dr. Ivanko Cizelj in za recenzenta prof. dr. Aleša Gregorca.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biotehnologijo

Članica: prof. dr. Mojca NARAT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: doc. dr. Ivanka CIZELJ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Aleš GREGORC

Kmetijski inštitut Slovenije

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Aleksander LONGO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

SD	Du2
DK	UDK 577.27(043.2)=163.6
KG	biotehnologija/genetika/čebele/ <i>Apis mellifera carnica</i> /izražanje imunskih genov/kumafos/prokloraz/ <i>Varroa destructor</i>
AV	LONGO, Aleksander, univerzitetni diplomirani biotehnolog
SA	NARAT, Mojca (mentorica)/ CIZELJ, Ivanka (so-mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2015
IN	IZRAŽANJE IMUNSKIH GENOV V RAZLIČNIH RAZVOJNIH FAZAH KRANJSKE ČEBELE (<i>APIS MELLIFERA CARNICA</i>) PO IZPOSTAVITVI PESTICIDOMA KUMAFOS IN PROKLORAZ
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija)
OP	X, 44 str., 7 pregl., 17 sl., 22 pril., 19 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Kranjska čebela <i>Apis mellifera carnica</i> je v našem okolju avtohtona čebelja podvrsta. Čebele so vseskozi izpostavljene vrsti patogenih organizmov. V okolju, kjer se zadržujejo, so konstantno prisotni številni pesticidi, ki se uporabljajo na poljih za zaščito kmetijskih pridelkov ali za zatiranje čebeljih patogenih organizmov. Pršica varoja napada čebelo <i>Apis mellifera</i> in povzroča veliko ekonomsko škodo v čebelarstvu. Za zatiranje tega škodljivca se med drugim uporablja akaricid kumafos. V okolju, kjer se zadržujejo čebele, je pogosto prisoten fungicid prokloraz, ki ga kmetje uporabljajo za zatiranje plesni na kulturnih rastlinah. V našem delu smo v poskusnem čebelnjaku vzgojili štiri čebelje družine. Eno smo izpostavili akaricidu kumafosu, drugo fungicidu proklorazu in tretjo njuni kombinaciji. Četrta družina je bila kontrolna, zato je nismo izpostavili nobenemu pestocidu. V raziskovalnem delu nas je zanimalo, kako omenjena pesticida vplivata na izražanje imunskih genov pri čebeli (<i>Apis mellifera carnica</i>). Izolirali smo RNA v različnih razvojnih stopnjah čebele, jo prepisali v cDNA in s pomočjo metode qPCR analizirali, kako so se izražali geni <i>PGRP</i> , <i>PPO</i> , <i>abaecin</i> , <i>defenzin</i> , <i>hexam</i> , <i>basket</i> in <i>domeless</i> . Ugotovili smo, da se omenjeni geni povišano oz. znižano izražajo v čebelah, ki so bile izpostavljene pesticidom. Naše ugotovitve so deloma skladne s podatki, ki smo jih zasledili v literaturi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDK 577.27(043.2)=163.6

CX biotechnology/genetika/honey bees/*Apis mellifera carnica*/immune gene expresion/cumaphos/prochloraz/*Varroa destructor*

AU LONGO, Aleksander

AA NARAT, Mojca (supervisor)/ CIZELJ, Ivanka (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology

PY 2015

TY IMMUNE GENE TRANSCRIPTION LEVELS IN HONEY BEE (*APIS MELLIFERA CARNICA*) AFTER TREATMENT WITH PESTICIDES CUMAPHOS AND PROCHLORAZ

DT M. Sc. Thesis (Masters Study Programmes – Biotechnology)

NO X, 44 p., 7 tab., 17 fig., 20 ann., 19 ref.

LA sl

Al sl/en

AB In Slovenia *Apis mellifera carnica* is an autochthonous breed of bees. Bees are constantly exposed to numerous pathogenic organisms. The environment where bees feed and collect pollen is often full of pesticides that are used on crops. Pesticides are also used to control bee pathogens. Varroa mite that infects honey bee (*Apis mellifera*) is responsible for a large economic deficit. To control this pest, beekeepers use acaricide cumaphos. Honey bee is often exposed to fungicide prochloraz that farmers use to control fungal infection on crops. In our experiment we obtained four bee families. Two of them we exposed to cumaphos and prochloraz respectively, one was exposed to their combination and one was a control group and wasn't exposed to any pesticide. In our work we wanted to find out how these two pesticides effect immune gene expression in *Apis mellifera carnica*. We obtained RNA of honey bee in different development stages. We then translated RNA into cDNA and used qPCR to analyse expression levels of immune genes *PGRP*, *PPO*, *abaecin*, *defenzin*, *hexam*, *basket* and *domeless*. We concluded that treated bees are likely to have different levels of gene expression to control group, as data in literature suggests.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
SLOVARČEK.....	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KRANJSKA ČEBELA (<i>APIS MELLIFERA CARNICA</i>).....	3
2.1.1 Pomen kranjske čebele.....	3
2.1.2 Razvojne stopnje čebele	3
2.1.3 Viri hranil.....	5
2.2 IMUNSKÉ POTI IN OBRAMBNI MEHANIZMI PRI ČEBELAH	5
2.2.1 Imunska pot Toll	6
2.2.2 Imunski poti Imd in JNK.....	7
2.2.3 Imunska pot JAK/STAT	8
2.2.4 Genetsko ozadje imunskega odziva pri čebelah	9
2.3 OKUŽBE, KI OGROŽAJO ČEBELE	9
2.3.1 <i>Varroa destructor</i>	10
2.3.1.1 Življenski cikel <i>V.destructor</i>	10
2.3.1.2 <i>V. destructor</i> in virusne okužbe.....	11
2.3.1.3 Metode za zatiranje <i>V. destructor</i>	12
2.4 FITOFARMACEVTSKA SREDSTVA IN NJIHOV VPLIV NA ČEBELE	12
2.4.1 Kumafos	12
2.4.2 Prokloraz.....	13
2.4.3 Ostala fitofarmacevtska sredstva.....	13
2.5 DELOVNE HIPOTEZE	13
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 NAČRT EKSPERIMENTA	15
3.1.1 Protokol tretiranja čebel s proklorazom in kumafosim (perizinom)	15
3.1.2 Protokol tretiranja čebeljih družin:	15
3.2 IZOLACIJA RNA	19
3.2.1 Priprava homogenizata vzorcev čebel in čebelje	19
3.2.2 Izolacija RNA.....	19
3.3 MERJENJE KONCENTRACIJE RNA IN DOLOČANJE NJENE ČISTOSTI.....	19

3.4 REDČENJE VZORCEV NA ENAKO	20
3.5 PREPISOVANJE V CDNA	20
3.6 OLIGONUKLEOTIDNI ZAČETNIKI	21
3.7 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	22
3.8 OBDELAVA QPCR REZULTATOV	24
3.9 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	26
4 REZULTATI	27
4.1 KONCENTRACIJA VZORCEV RNA IN NJIHOVA ČISTOST	27
4.2 ANALIZA QPCR REZULTATOV	27
5 RAZPRAVA	35
5.1 IZRAŽANJE V IMUNSKI POTI TOLL	35
5.1.1 Gen <i>PGRP</i>	35
5.1.2 Gen <i>abaecin</i>	35
5.1.3 Gen <i>defenzin</i>	36
5.1.4 Gen <i>PPO</i>	36
5.2 IZRAŽANJE V IMUNSKI POTI IMD IN JNK	37
5.2.1 GEN <i>hexam</i>	37
5.2.2 Gen <i>basket</i>	37
5.3 IZRAŽANJE V IMUNSKI POTI JAK/STAT	38
5.3.1 Gen <i>domeless</i>	38
6 SKLEPI	39
7 VIRI	42
ZAHVALA	45
PRILOGE	46

KAZALO SLIK

Sl. 1: Razvojne stopnje delavke medonosne čebele (Chan, 2012).	3
Sl. 2: Grafični prikaz imunske poti Toll pri <i>A.melliferi</i> (Evans in sod., 2006).	7
Sl. 3: Grafični prikaz Imd, JNK in JAK/STAT signalnih poti pri <i>A.melliferi</i> (Evansin sod., 2006).	8
Sl. 4: Razvojne stopnje <i>V. destructor</i> (Rosekrantz in sod., 2009).....	10
Sl. 5: Odrasla ženska pršica <i>V. destructor</i> na trupu čebele delavke (Rosekrantz in sod., 2009).	11
Sl. 6: Shema protokola tretiranja čebeljih družin	17
Sl. 7: Del satovja, posneto med pobiranjem vzorcev	18
Sl. 8: Celotno satovje, posneto med pobiranjem vzorcev	19
Sl. 9: Primer rezultata PCR reakcije v grafični obliki (agilent technologies, 2012).	23
Sl. 10. Princip qPCR, kjer je prag postavljen nad ozadje fluorescence in Cq predstavlja cikel pri katerem vzorec doseže prag (agilent technologies, 2012).....	24
Sl. 11: Izražanja gena <i>PGRP</i> glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.	28
Sl. 12: Izražanja gena <i>abaecin</i> glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.....	29
Sl. 13: Izražanja gena <i>defenzin</i> glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.	30
Sl. 14: Izražanja gena <i>PPO</i> glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.....	31
Sl. 15: Izražanja gena <i>hexam</i> glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.....	32
Sl. 16: Izražanja gena <i>basket</i> glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.	33
Sl. 17: Izražanja gena <i>domeless</i> glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.....	34

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Število paralognih genov (nekateri med njimi smo analizirali v naši raziskavi), ki sodelujejo pri imunosti, glede na vrsto žuželke (Evans in sod., 2006: 649).	9
Pregl. 2. Število pridobljenih vzorcev, izpostavljenih pesticidom, glede na razvojno stopnjo <i>A. mellifera carnica</i>	18
Pregl. 3. Protokol za tretiranje RNA z DNazo (DNase I, RNase free, Thermo scientific)...	21
Pregl. 4. Priprava osnovne zmesi za prepis RNA v cDNA	21
Pregl. 5. Osnovna zmes za redčitveno vrsto cDNA	22
Pregl. 6. Geni, ki smo jih povzeli iz literature in naj bi se različno izražali pod vplivom kumafosa, prokloraza oziroma varoje (Gregorc in sod., 2012: 1047).....	22
Pregl. 7. Izražanje genov glede na razvojno stopnjo čebele in tip pesticida	41
Pregl. 8. Primer postopka izračuna ΔCq reference pri odrasli čebeli.....	46
Pregl. 9. Primer postopka izračuna za ΔCq za <i>HEXAM</i> gen pri odrasli čebeli	47
Pregl. 10. Koncentracija RNA, izmerjene z napravo NanoVue (<i>NanoVue</i>) TM Plus spectrofotometers GE Healthcare.....	48
Pregl. 13. Vrednosti E in učinkovitost v %, izračunane iz naklona umeritvenih krivulj	51
Pregl. 14. Vrednosti ΔCq vzorcev glede na gen.....	51
Pregl. 15. ΔCq referenčne vrednosti vzorcev	52
Pregl. 16. Izražanje gena <i>PGRP</i> v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom.	52
Pregl. 17. Vrednosti signifikance za gen <i>PGRP</i> (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti).....	52
Pregl. 18. Izražanje gena <i>Abaecin</i> v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom.....	53
Pregl. 19. Vrednosti signifikance za gen <i>Abaecin</i> (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti).....	53
Pregl. 20. Izražanje gena <i>Defenzin</i> v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom	53
Pregl. 21. Vrednosti signifikance za gen <i>Defenzin</i> (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti).....	54
Pregl. 22. Izražanje gena <i>PPO</i> v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom.....	54

Pregl. 23. Vrednosti signifikance za gen <i>PPO</i> (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti).....	54
Pregl. 24. Izražanje gena <i>Hexam</i> v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom.....	55
Pregl. 25. Vrednosti signifikance za gen <i>Hexam</i> (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti).....	55
Pregl. 26. Izražanje gena <i>Basket</i> v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom.....	55
Pregl. 27. Vrednosti signifikance za gen <i>Basket</i> (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti).....	56
Pregl. 28. Izražanje gena <i>domeless</i> v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom.....	56
Pregl. 29. Vrednosti signifikance za gen <i>Domeless</i> (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti).....	56

SLOVARČEK

B1 – buba ena

B2 – buba dva

BM1 – buba matice ena

CCD – sindrom propada čebeljih družin (ang. Colony Collapse Disorder)

cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kislina

Cq – cikel kvantifikacije (ang. quantification cycle)

DWV – virus deformiranih kril (ang. Deformed Wings Virus)

hexam – heksamerni protein

IAPV – Izraelski virus akutne paralize (ang. Israeli Acute Paralysis Virus)

KBV – Kašmirski čebelji virus (ang. Kashmir Bee Virus)

L2 – ličinka dva

OČ – odrasla čebela

PGRP – protein, ki prepozna peptidoglikan (ang. Peptidoglycan Recognition Protein)

PIAS – proteinski inhibitor aktiviranega STAT (ang. Protein Inhibitor of Activated STAT)

PPO – profenoloksidaza

qPCR – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (ang. Quantification Polymerase Chain Reaction)

QRP – feromon, ki ga izloča matica (ang. Queen Retinue Pheromone)

RNA – ribonukleinska kislina

SBV – virus mešičkaste zalege (ang. Sacbrood Virus)

SOCS – zaviralec citokinske signalizacije

STAT – transkripcijski faktor

1 UVOD

Medonosna čebela *Apis mellifera* (kasneje *A. mellifera*) je pomembna za biološko ravnotežje v naravnem okolju zaradi oprasovanja, za človeka pa tudi zaradi čebeljih pridelkov. Medonosna čebela oprasi 70-80 % cvetov kulturnih žužkocvetk, zato je količina pridelka v veliki meri odvisna od aktivnosti in števila prisotnih čebel nabiralk. V intenzivni pridelavi poljščin se uporablja mnogo kemikalij za zaščito rastlin pred škodljivci. Za večino od njih učink na čebele ni preučen natančno, predvsem za subletalne doze in dolgotrajno izpostavljenost oz. za dolgoročne učinke (Nakrst in sod., 2015); (Chan, 2012). Ekonomska vrednost oprasovanja je petnajstkrat do tridesetkrat večja kot je vrednost vseh čebeljih pridelkov skupaj. Opazno odmiranje čebeljih družin, ki se dogaja povsod po svetu, vzbuja skrb pridelovalcev in ekološko ozaveščene javnosti. Odmiranje čebel lahko poteka nenadno, zaradi okoljskih dejavnikov, ki škodujejo čebelam na paši, lahko pa postopoma s pešanjem družin. Škodljivi dejavniki so lahko okužbe (npr. z varjo, nosečo, čebeljimi virusi) in uporaba fitofarmaceutskih (akaricidov, fungicidov) ter drugih sredstev, ki so lahko strupena za čebele (Nakrst in sod., 2015); (Chan, 2012).

Pršice iz rodu *Varroa* so relativno nov parazit za medonosno čebelo, zato se ravnovesje med zajedavcem in gostiteljem še ni vzpostavilo. Čebelarji s tem patogenim organizmom, ki je odgovoren za največje izgube čebeljih družin v zadnjih desetletjih, še nimajo dovolj izkušenj za njegovo uspešno zatiranje. Varja se je razširila po vsem svetu v relativno kratkem času, kar je verjetno posledica globalizacije apikulturnih pridelkov. Danes je težko najti čebeljo družino, ki ne bi bila napadena s tem parazitom. Avstralija je edino agrikulturno pomembno območje, kjer se varja še ne pojavlja. V Sloveniji najdemo predvsem *Varroa destructor* (Andreson in Trueman, 2000). Uporaba proizvodov za zatiranje varj predstavlja za čebelarje veliko finančno obremenitev (Rosenkranz in sod., 2010).

Za zatiranje pršic iz družine *Varroa* se lahko uporablja akaricid kumafos. Fungicid prokloraz je imidazol, ki se uporablja za zatiranje plesni kulturnih rastlin. Najpogosteje se fungicidi uporabljajo na območjih, kjer uspeva vinska trta. Vinska trta je zelo občutljiva na glivne bolezni, med katerimi sta najpogostejša peronospora (povzroča jo gliva *Plasmopara viticola*) in oidij (povzroča jo gliva *Uncinula necator*). V Sloveniji je veliko vinorodnih območij. Čebele pogosto sobivajo v okolju, kjer je trta glavna kulturna rastlina, zato je stik čebel s fungicidi neizogiben. Fungicidi negativno vplivajo na čebele delavke, ki se

prehranjujejo s cvetnim prahom rastlin, in se preko cvetnega prahu, ki ga čebele primešajo v hrano za zalego, prenašajo tudi na nižje razvojne stopnje (Gregorc in sod., 2012).

Kot pri mnogih insektih poznamo tudi pri čebeli *A. mellifera* tri različne imunske poti, to so Toll, JAK/STAT ter Imd/JNK. Geni *PGRP* (ang. peptidoglikan recognition protein), *abaecin*, *defenzin* in *PPO* (ang. prophenoloxidase) sodelujejo pri imunski poti Toll, gen *domeless* pri imunski poti JAK/STAT, gena *basket* in *hexam* (ang. hexameric storage protein) pa pri imunski poti Imd in JNK (Evans in sod., 2006).

Namen naloge je bil ugotoviti, kako kumafos in prokloraz vplivata na stopnjo izražanja genov *PGRP*, *abaecin*, *defenzin*, *PPO*, *domeless*, *basket* in *hexam* v različnih razvojnih stopnjah zdravih in z *V. destructor* napadenih čebel. Preučevali smo kranjsko čebelo, *Apis mellifera carnica*, ki je v našem okolju avtohtona podvrsta čebele in je zato problem propada čebeljih družin toliko bolj aktualen.

2 PREGLED OBJAV

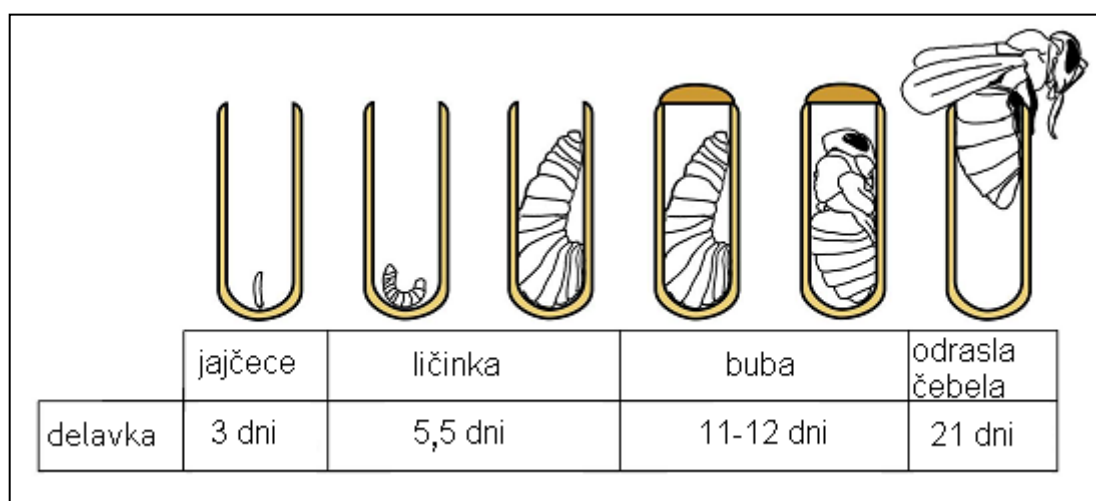
2.1 KRANJSKA ČEBELA (*APIS MELLIFERA CARNICA*)

2.1.1 Pomen kranjske čebele

Širše območje sedanje Slovenije je prostor, od koder izhaja čebela kranjica, imenovana tudi kranjska sivka – *Apis mellifera carnica*. Morfološko je zelo podobna evropski *Apis mellifera mellifera*, od nje se razlikuje v barvi hitinskih obročkov zadka, dolžini rilčkov in barvi dlačic na hrbtu. V zimskih mesecih porabi manj hrane, spomladi pa se hitreje razvije in ustvari družino. Kranjska čebela je v Sloveniji zaščiten. Čebelarjem na slovensko ozemlje ni dovoljeno vnašati drugih čebeljih pasem. V Sloveniji potekajo študije, ki na podlagi genetskih, morfoloških in gospodarskih lastnosti čebel omogočajo selekcijo in vzrejo čebel (Gregorc in sod., 2002).

2.1.2 Razvojne stopnje čebele

Čebela gre v svojem razvoju skozi štiri stopnje: jajčece, ličinka, buba in odrasla čebela (Slika 1).



Slika 1. Razvojne stopnje delavke medonosne čebele (Chan, 2012: 4).

Matica izleže oplojena jajčeca v celice satovja, kjer se bodo razvile čebele delavke in neoplojena jajčeca v celice satovja, ki so večje in se bodo iz njih razvili troti. Jajčeca, iz katerih se bodo razvile matice, leže v vnaprej pripravljen matičnik, če v družini vlada rojilno razpoloženje ali če čebele matico prelegajo. Ko se iz jajčeca izleže ličinka, jo čebele delavke hranijo pet do šest dni in nato zaprejo pokrov celice satovja. Tu se ličinka zabubi in se v enajstih do dvanajstih dneh razvije v odraslo čebelo (Chan, 2012).

Jajčece nastane v ovarijih matici iz zarodnih celic, ki se diferencirajo v oocite in nato v jajčne celice. Troti oprašijo matico med letom. Ko oplojeno jajčece zori, porablja hranila, ki so shranjena v negovalnih celicah. Zrela jajčna celica meri v dolžino 1,3-1,8 mm in ima na eni strani odebeljen del, ki se kasneje razvije v glavo odrasle čebele. Matica nato izleže zrelo jajčece v celico satovja (Chan, 2012).

V naslednjih treh dneh se razvije ličinka. V tej fazi so celice satovja odprte in delavke hranijo ličinke z velikimi količinami hrane. Ličinka gre skozi pet razvojnih stopenj. Ličinka se dnevno levi, kar ji omogoča hitro rast. Čas hranjenja je odvisen od končne oblike odrasle čebele. Hranjenje bodoče delavke traja pet do šest dni, medtem ko hranjenje matice in trota traja štiri dni in pol oziroma kar šest dni in pol. Ličinka trota zaužije nekoliko več ogljikovih hidratov. Šesti dan čebele delavke zaprejo odprtino na vrhu celice z voskom in ličinke se zabubijo. V obdobju bube se razvijejo noge, glava, antene in trup. Obdobje bube traja običajno osem do devet dni, nato se iz bube razvije delavka ali trota. Obdobje bube, ki se razvije v matico, traja le štiri do pet dni. Po zadnji levitvi bube je čebela odrasla in pregrize pokrov iz voska. Mlade trote hranijo delavke še nekaj dni po tem, ko se izležejo, nato so prepuščeni sami sebi. Razvoj matice, delavke in trota torej traja približno 16, 21 oziroma 24 dni (Chan, 2012).

Matica izloča feromon QRP (ang. queen retinue pheromone), s katerim spodbuja delavke, da skrbijo zanjo in jo skozi celotno življenje hranijo izključno z matičnim mlečkom. Preko hormonov, ki jih oddaja, lahko matica zatire razvoj ovarijev pri ličinkah navadnih čebel delavk in prepreči razvoj nove matice. Ženske ličinke so v prvih treh dneh razvoja totipotentne, njihov nadaljnji razvoj pa določa količina in vrsta hrane v fazi ličinke. Delavke zaznajo smrt matice v 24 urah in lahko vzgojijo novo matico iz preostalih jajčec. Ličinka matice je hranjena z večjimi količinami matičnega mlečka, ki nastaja v hipofaringealni in mandibularni žlezi čebel delavk, ki skrbijo za matico. Ličinke matice zaužijejo v prvih treh dneh 13 % več hrane, medtem ko po šestih dneh kar 40 % več hrane kot ličinke navadne delavke. Tudi sestava hrane je različna. Delavke dobijo mešanico matičnega mlečka, medu in cvetnega prahu, medtem ko je ličinka matice hranjena izključno z matičnim mlečkom. Različna hrana torej ni posledica, temveč vzrok za ločitev delavke od matice (Cameron in sod., 2013).

Raziskave na *A. mellifera* so pokazale, da se 59 % ličink razvije v matice, če so umetno hranjene le z matičnim mlečkom. Dokazano je, da pri diferenciaciji sodeluje protein rojalaktin, pa tudi inzulin in inzulinu podoben hormon (Chan, 2012).

2.1.3 Viri hranil

Prehrana je ključna pri razvoju in diferenciaciji čebele, pomembna pa je tudi za zdravje čebelje zalege oziroma kolonije. Osnovna prehrana vsebuje proteine, ogljikove hidrate, minerale, maščobe, vitamine in vodo. Glavni vir proteinov je cvetni prah, vir ogljikovih hidratov pa je nektar, ki ga čebele spremenijo v med. Na vseh razvojnih stopnjah čebele se poleg hranil s hrano vnašajo snovi, ki lahko nanje negativno vplivajo, npr. prokloraz in kumafos (Chan, 2012).

2.2 IMUNSKÉ POTI IN OBRAMBNI MEHANIZMI PRI ČEBELAH

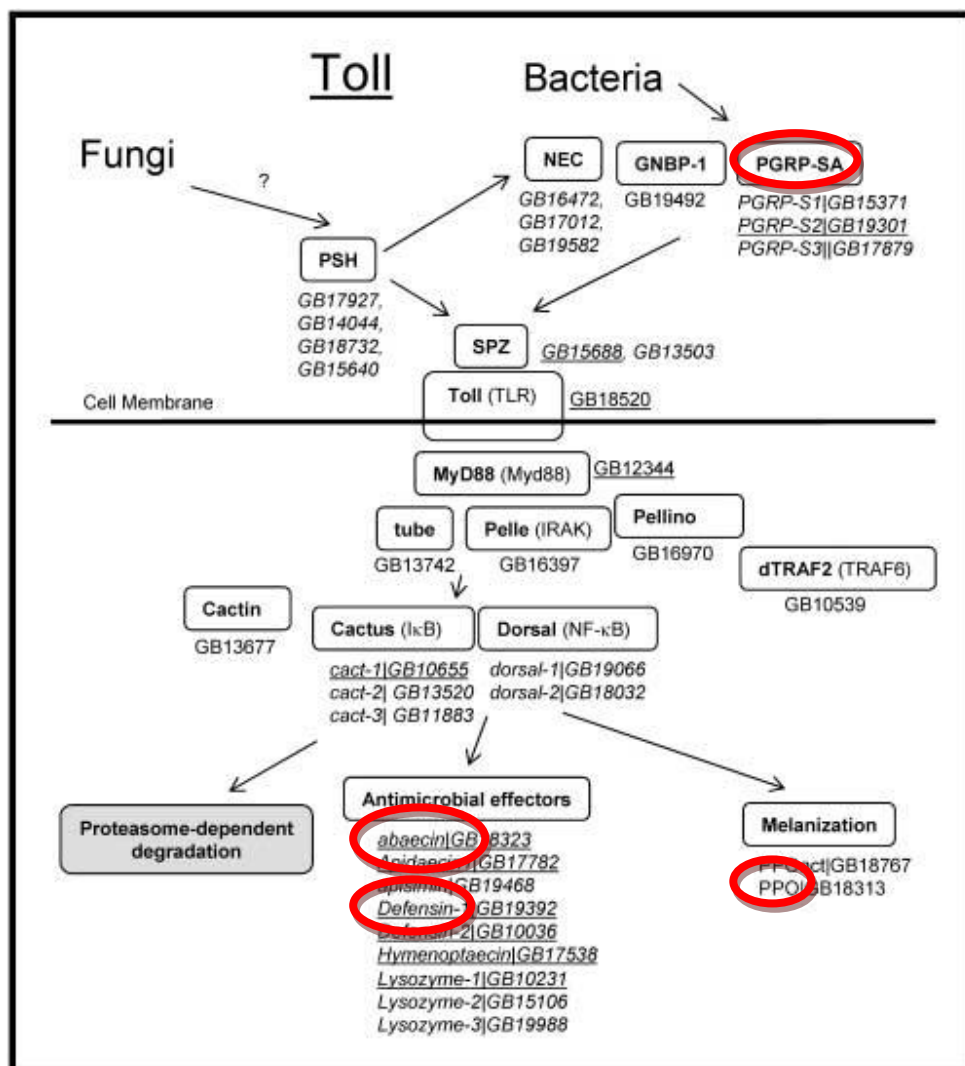
Čebele so v vseh razvojnih stopnjah izpostavljene številnim patogenim organizmom. Kot mnoge druge socialne žuželke so čebele sposobne dveh vrst obrambe pred patogenimi organizmi. Poznamo obrambi na stopnji skupine in na stopnji posamezne čebele. Higijensko vedenje čebel in negovanje zalege je del skupinske obrambe pred patogenimi organizmi. Delavke skrbijo, da se kužni material in nečistoče s potencialnimi patogenimi organizmi redno odstranjujejo iz panja. Takšni vedenjski mehanizmi zmanjšajo tveganje za razvoj bolezni. Sposobne so tudi obrambe na nivoju posamezne čebele. Mnoge žuželke so zaščitene s plastjo protimikrobnega izločka, ki se nahaja na njihovi povrhnjici. Podobno kot sesalci imajo v prebavilih okolje, ki je toksično za patogene mikroorganizme. Če ti kljub temu vstopijo v hemolimfo, se aktivira imunski sistem. Imunski sistem medonosne čebele *A. mellifera* je primerljiv z imunskim sistemom *Drosophila melanogaster* in številnih drugih žuželk, kjer poznamo tri različne imunske poti: Toll, Imd (ang. immune deficiency pathway) in JNK (ang. jun-kinase) ter JAK/STAT (ang. Janus kinase/Signal Transducer – Activator of Transcription) Produkti teh poti sodelujejo pri procesih kot so izločanje protimikrobnih peptidov, fagocitoza, melanizacija in encimska razgradnja antigenov. Melanizacija je edinstvena in prirojena vrsta imunskega odziva pri členonožcih, kjer pride do nastanka in odlaganja pigmenta melanina na patogene mikroorganizme (Evans in sod., 2006).

2.2.1 Imunska pot Toll

Aktivacija imunskega odziva preko receptorja Toll je bila prvič opažena pri vinski mušici. Tollu podobne receptorje (ang. toll-like receptors, v nadaljevanju TLR), ki so funkcijsko podobni receptorjem Toll, pa najdemo pri številnih drugih organizmih, med drugim tudi pri *A. melliferi*. V literaturi pogosto opazimo, da ima *A. melliferi* receptorje Toll in TLR.

Patogeni mikroorganizmi preko značilnih peptidnih motivov sprožijo konformacijske spremembe proteinov, ki se nahajajo v hemolimfi in se nato vežejo na receptor Toll (nameščen v membrani celice), s tem pa sprožijo kaskado, katere produkti uničijo patogene mikroorganizme. Imunska pot preko receptorja Toll sprožijo gram pozitivne bakterije in nekatere glive (Michael in sod., 2001).

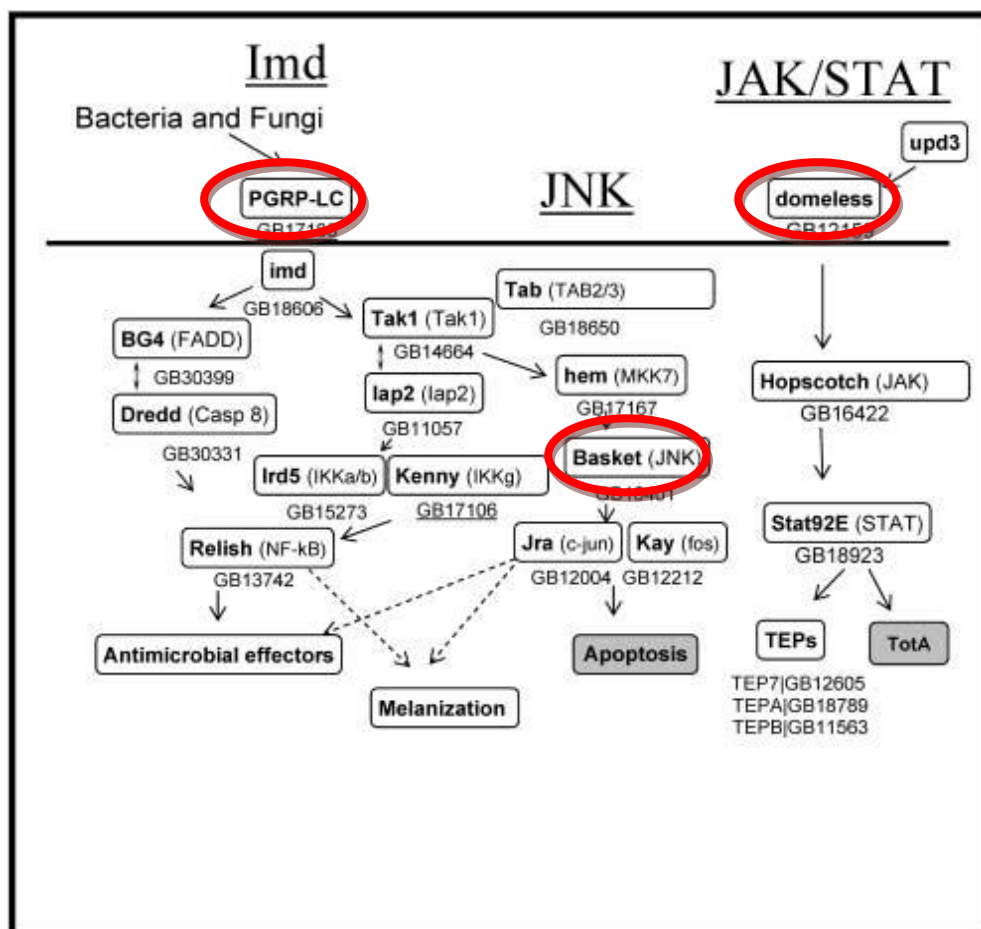
Proteini, ki aktivirajo receptorje Toll in TLR pri insektih, so molekule, ki jih imenujemo Spaetzle. *D. melanogaster* ima šest različnih molekul Spaetzle, ki delujejo kot ligandi na različnih receptorjih Toll in TLR. Pri *A. melliferi* poznamo dve takšni molekuli, ki ju kodirata ortologna gena (Slika 2). Raziskava je pokazala (Michael in sod., 2001), da se okužba čebele z gram pozitivnimi bakterijami kaže v povečanem izražanju gena *PGRP*. Protein, ki ga kodira gen *PGRP*, prepozna bakterijski peptidoglikan in aktivira proteaze, ki razcepijo molekulo Spaetzle, da se ta lahko veže na receptor Toll oz. TLR. Po vezavi molekule Spaetzle na receptor Toll ali TLR pride do konformacijske spremembe receptorja Toll oz. TLR. Aktivirajo se številne znotrajcelične domene smrti (ang. death domain), ki skupaj z aktiviranim receptorjem tvorijo receptorski kompleks. Pri imunski poti Toll sodelujejo še znotrajcelične komponente Tollip, Pellino, Cactin in TRAF-2 in druge, ki jih najdemo tako pri *D. melanogaster* kot pri *A. melliferi*. Končni produkti te imunske poti so protimikrobni peptidi (Abaecin, Defenzin) in melanizacijske molekule PPO (ang. polyphenol oxidase) (Evans in sod., 2006).

Slika 2. Grafični prikaz imunske poti Toll pri *A.mellifera* (Evans in sod., 2006: 647).

2.2.2 Imunski poti Imd in JNK

Imunsko pot Imd aktivira peptidoglikan prepoznavni protein PGRP-LC (ang. peptidoglycan recognition protein). Preko transkripcijskega faktorja Relish se sproži prepis vseh glavnih protimikrobnih genov pri *D. melanogaster*. Kljub dolgoletnemu prepričanju, da je imunska pot Imd specifična za Gram negativne bakterije, je danes jasno, da lahko gram pozitivne bakterije s diaminopimelinskim kislinim peptidoglikanom povzročijo podobno močan imunski odziv. Nekoliko slabši imunski odziv lahko sprožijo tudi drugi peptidoglikani in celo nekatere glive. Poleg aktivacije prepisa peptida Relish, ki sproži protimikrobni in melanizacijski odziv, pa imunska pot Imd sproži tudi aktivacijo komponent signalne poti JNK (Slika 3). Raziskave so pokazale, da lahko ta imunska pot

povzroči povišano oziroma znižano izražanje protimikrobnih peptidov in proteinov, ki sodelujejo pri melanizaciji (Gupta, 2008).



Slika 3. Prikaz Imd, JNK in JAK/STAT signalnih poti pri *A. mellifera* (Evans in sod., 2006: 647).

2.2.3 Imunska pot JAK/STAT

Signalna pot JAK/STAT je del prirojene imunosti medonosne čebele, ki je odgovorna za fagocitozno aktivnost. Ta signalna pot je aktivirana s citokinu podobnimi krvnimi molekulami. Pri *D. melanogaster* to pot sproži zunajcelični, glikozilirani protein Upd. Ta protein služi kot ligand za transmembranski receptor Domeless, ki omogoči začetek signalne poti JAK/STAT. Čeprav Upd ligand ni bil pri *A. mellifera* nikoli potrjen, lahko glede na podobnosti v imunskih poteh z vinsko mušico sklepamo o njegovi prisotnosti in vlogi glavnega aktivacijskega liganda. Funkcija gena *Domeless* je podobna funkciji gena *PGRP* pri imunski poti preko receptorja Toll oz. TLR. Nedavno je bilo dokazano, da pot JAK/STAT služi tudi pri protivirusnem odzivu vinske mušice (Evans in sod., 2006).

2.2.4 Genetsko ozadje imunskega odziva pri čebelah

Pri *A. mellifera* so ohranjene vse znane imunske poti, ki jih najdemo pri *D. melanogaster* in drugih žuželkah. Posebnost je ta, da je število paralognih genov, ki kodirajo proteine imunskega sistema, manjše (Preglednica 1). Pri vinski mušici najdemo 196 takšnih genov, pri komarju (*A. gambiae*) 209, pri *A. mellifera* pa le 71. *A. mellifera* ima manjše število paralognih genov pri dvanajstih od sedemnajstih znanih genskih družinah (Evans in sod., 2006).

Preglednica 1. Število paralognih genov (nekateri med njimi smo analizirali v naši raziskavi), ki sodelujejo pri imunosti, glede na vrsto žuželke (Evans in sod., 2006: 649).

Genska družina \ Živalska vrsta	<i>A. mellifera</i> (medonosna čebela)	<i>D. melanogaster</i> (vinska mušica)	<i>A. gambiae</i> (komar)
Prepoznavanje			
<i>PGRP-S</i>	3	7	3
<i>PGRP-L</i>	1	6	4
Fibrinogenska domena	2	13	57
Signalizacija			
<i>Cactus</i>	3	1	1
<i>Dorsal</i>	2	2	1
<i>Serpin</i>	7	28	14
Efektorji			
<i>PPO</i>	1	3	9
<i>Defenzin</i>	2	4	1
skupno	71	196	209

2.3 OKUŽBE, KI OGROŽAJO ČEBELE

Čebele so pogosto izpostavljene številnim patogenim organizmom. Zelo problematična je pršica *V. destructor*, ki je poleg patogenosti tudi vektor za številne virusne okužbe, med njimi DWV (ang. deformed wings virus), KBV (ang. Kashmere bee virus) in drugi (Francis in sod., 2013).

Čebelam so nevarne tudi bakterije, ki povzročajo bolezni. Primer takšne gram pozitivne bakterije je *Peanibacillus larvae*, ki povzroča bolezen imenovano huda gniloba. Gliva *Aspergillus flavus* povzroča bolezen okamenele zalege. Povzročitelj nose mavosti, ki je v našem okolju zelo pogosta bolezen, pa je mikrosporidij *Nosema ceranae*.

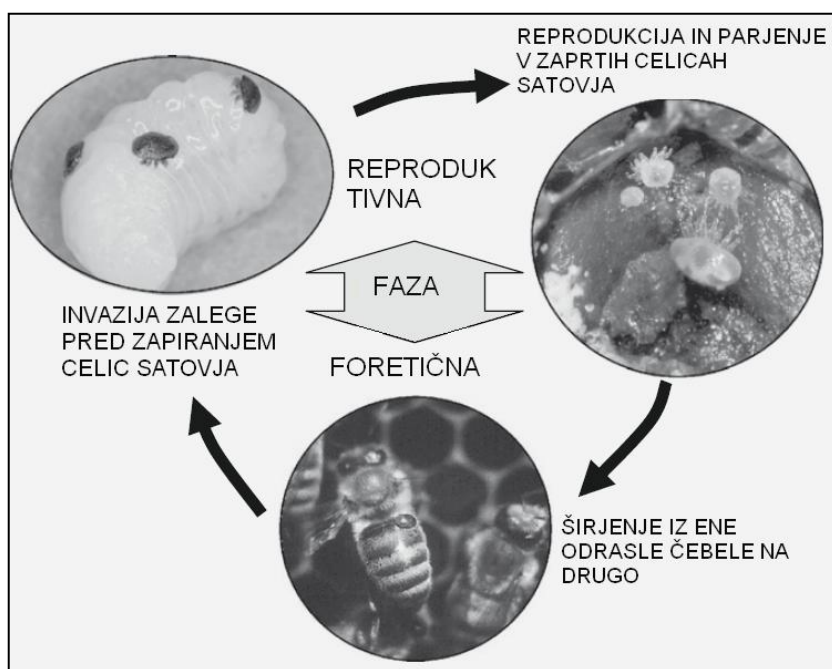
2.3.1 *Varroa destructor*

Varroa destructor je pršica, ki zajeda kranjsko čebelo. Pršica se je v relativno kratkem obdobju razširila po svetu in je pri nas trenutno eden glavnih čebeljih škodljivcev.

2.3.1.1 Življenski cikel *V. destructor*

Pršica *V. destructor* potrebuje za preživetje gostitelja. V razvojnem ciklu parazita ženskega spola poznamo dve ločeni stopnji. Prva je foretična faza, ki poteka na odrasli čebeli, druga je reprodukcijska faza, ki poteka v zapečatenih satnih celicah trotov, delavk in matic (Slika 4). Fazi moškega spola in nimfe pršice *V. destructor* trajata le kratek čas in potekata izključno v pokritih satnih celicah. Pršice *V. destructor* pijejo hemolimfo ličink in bub znotraj zapečatenih celic satovja in odraslih čebel, kjer so navadno skrite pod krili (Rosekrantz in sod., 2009).

Simptome, ki se pojavljajo kot posledica napadenosti z *V. destructor*, imenujemo varoza. Posledice okužbe so skrajšana življenjska doba in zmanjšana teža čebele (Francis in sod., 2013).



Slika 4. Razvojne stopnje *V. destructor* (Rosekrantz in sod., 2009: 98).



Slika 5. Odrasla ženska pršica *V. destructor* na trupu čebele delavke (Rosekrantz in sod., 2009: 99).

Okužene čebele imajo moteno vodno ravnovesje. Zmanjšan delež vode v telesu je posledica povečane izgube vode zaradi spremembe sestave ogljikovodikov v kutikuli odrasle čebele. Dehidracija poruši ravnovesje v čebeli in poslabša njeno splošno zdravje (Annoscia in sod., 2012).

2.3.1.2 *V. destructor* in virusne okužbe

V literaturi pogosto zasledimo tezo, da je kombinacija okužbe z *V. destructor* in virusi glavni razlog za umiranje čebeljih družin, ki smo jim priča v zadnjem desetletju. Pršice *V. destructor* so zelo učinkoviti vektorji za prenos virusnih okužb. Od pojava *V. destructor* v Evropi se je število virusnih okužb v čebeljih kolonijah močno povečalo. Med pomembnejši virusi, ki se prenašajo z *V. destructor*, so DWV, KBV, SBV (ang. Sacbrood virus) in IAPV (ang. Israeli acute paralysis virus) (Francis in sod., 2013).

Dokazano je, da je kombinacija napadenosti z *V. destructor* in DWV eden glavnih vzrokov za propade čebeljih družin (Francis in sod., 2013).

Za epidemije CCD (ang. colony collapse disorder) je delno odgovorna *V. destructor*, ki je vektor številnih virusov (Zhang in sod., 2010).

Antimikrobna peptida *Abaecin* in *Defenzin* se v imunskih celicah čebele povečano izražata ob okužbah, vendar ne sorazmerno s številom pršic, ki jo napadajo. To pomeni, da ni imunski odziv ob močni napadenosti nič močnejši kot ob šibki. Možnosti preživetja kolonije so tako pri večji napadenosti čebele z *V. destructor* manjše (Zhang in sod., 2010).

2.3.1.3 Metode za zatiranje *V. destructor*

Trenutno se za zatiranje *V. destructor* uporabljajo fizikalne in genetske metode. Pogosta pa je predvsem uporaba pesticidov, natančneje akaricidov. Med fizikalne metode spadajo dimljenje panjev, toplotni postopki in naprave, ki ujamejo pršice. Ti postopki so zahtevni in zamudni, omogočajo pa le delno zaščito. Biotehnološki razvoj trenutno poteka v smeri vzreje čebelje populacije, odporne na *V. destructor*. Odpornost bi zmanjšala tudi sekundarne okužbe z bakterijami in virusi, ki se pojavijo posledično zaradi slabšega zdravja čebel, napadenih z *V. destructor* (Zhang in sod., 2010).

V naravi obstajajo genetske predispozicije za večjo odpornost proti *V. destructor* in sicer pri azijski čebeli *Apis cerana*, ki je njen prvotni gostitelj. Med značilnostmi, ki pripomorejo k večji odpornosti *A. cerane*, so njeno obnašanje, čistilni nagon in njen razvojni krog, ki je časovno naravnan tako, da parazitu ne ustreza. Genetske značilnosti *A. cerane*, ki so odgovorne za to odpornost, za enkrat še niso znane. Ko bodo genetski mehanizmi poznani, bodo čebelarji lahko izvajali usmerjeno vzrejo, s katero bodo dosegli večjo odpornost čebeljih družin *A. mellifere* (Zhang in sod., 2010).

2.4 FITOFARMACEVTSKA SREDSTVA IN NJIHOV VPLIV NA ČEBELE

Čebele se hranijo z nektarjem in cvetnim prahom rastlin, ki so izpostavljene pesticidom. Preko hrane te učinkovine vstopijo v čebelji organizem in v čebeljo zalego, ki jo hranijo čebele delavke. Fungicidi, protimikrobne učinkovine in akaracidi, slednji se uporabljajo za zatiranje *V. destructor*, so vsak zase za čebelo relativno nenevarni, njihov medsebojni učinek pa je še slabo raziskan in potencialno škodljiv.

Poleg ostalih pesticidov se v okolju pojavljajo tudi ostanki insekticidov, ki so za čebelo strupeni. Tako *V. destructor* kot *A. mellifera* spadata v deblo členonožcev, zato sredstva proti zatiranju *V. destructor* delujejo škodljivo tudi na *A. mellifero* (Johnson in sod., 2013).

2.4.1 Kumafos

Akaricidi so sredstva za zatiranje pršic. Kumafos je sintetični akaricid, ki se v našem okolju uporablja za zatiranje *V. destructor* in ga poleg tau-fluvalinata najpogosteje najdemo v čebelji zalegi. Kumafos uvrščamo v razred pesticidov, ki jih imenujemo organofosfati. Delujejo tako, da onemogočijo delovanje encimov holinoesteraz, ki so pri insektih pomembni za delovanje živčnega sistema. Organofosfati uspešno zatirajo *V. destructor*, onemogočajo pa delovanje encimov tudi pri *A. mellifero*. Čebelarji jih kljub

temu uporabljajo, saj so trenutno najbolj učinkovito sredstvo za zatiranje pršic *V. destructor* (Johnson in sod., 2013).

2.4.2 Prokloraz

Pri vzgoji kulturnih rastlin se za zatiranje bakterijskih okužb in mikrosporidijev uporabljajo protimikrobne učinkovine, za zatiranje glivičnih okužb pa fungicidi. Primer takega fungicida je prokloraz. Fungicidi se uporabljajo ob cvetenju rastlin, ravno v obdobju, ko se na njih hranijo čebele. Prokloraz zavira glivni citokrom P450, ki je monooksigenaza, odgovorna za sintezo ergosterolov. Prokloraz dokazano deluje tudi na čebelji citokrom P450. Njegov vpliv na izražanje čebeljih genov pa je slabo raziskan (Johnson in sod., 2013).

Deluje tudi na druge organizme. Študije na podganah kažejo vplive na spolne hormone in spremenjena genska izražanja v prostati. Uvrščamo ga med imidazolne fungicide. Najpogosteje se uporablja v Evropi, Avstraliji, Aziji in Južni Ameriki (Vinggaard in sod., 2006).

2.4.3 Ostala fitofarmacevtska sredstva

Za zatiranje okužbe z *V. destructor* se uporabljajo še akaricid amitraz (formamidin), različni insekticidi ter organski proizvodi kot so organska, oksalna in mravljinčna kislina (Johnson in sod., 2013).

Fumagilin se dodaja saharoznem sirupu za kontrolo *Noseme apis* in *Noseme ceranae*. Oksitetraciklin se dodaja sladkorju v prahu za kontrolo pohlevne gnilobe čebelje zalege in drugih bakterijskih okužb. Čebelarji v obdobjih pred pobiranjem medu ne smejo uporabljati teh učinkovin, posledično se velikokrat zgodi, da jih aplicirajo simultano v času, ko je uporaba dovoljena (Johnson in sod., 2013).

2.5 DELOVNE HIPOTEZE

Učinki prokloraza in kumafosa na stopnjo izražanja genov so relativno slabo raziskani. Vseeno pa smo v literaturi zasledili nekaj informacij o tem, kako se določeni geni izražajo v prisotnosti omenjenih proizvodov in/ali ob napadenosti z *V. destructor*.

V raziskavi (Boncristiani in sod., 2012) so dokazali povišano izražanje gena *basket*, ko so bile čebele izpostavljene akaricidu kumafosu. Študija je obravnavala odrasle čebele in ne ostalih razvojnih stopenj. Predpostavljamo, da bomo povišano izražanje gena *basket*

opazili pri vzorcih odraslih čebel, ki smo jih izpostavili akaricidu. Podobne rezultate pričakujemo tudi pri ostalih razvojnih stopnjah.

Ličinke, izpostavljene kumafosu, kažejo višje stopnje izražanja gena *PPO*, ki kodira ključni encim, odgovoren za melanizacijo patogenih mikroorganizmov. Ob prisotnosti fungicida pa kažejo ličinke nižjo stopnjo izražanja istega gena (Gregorc in sod., 2012). V isti študiji so pokazali, da se v nasprotju z večino protimikrobnih genov ob prisotnosti pesticidov izražanje gena *hexam* zniža. Povišano izražanje gena *PPO* pričakujemo pri naših vzorcih ličink, ki smo jih izpostavili akaricidu kumafosu, medtem ko pričakujemo znižano izražanje pri vzorcih, ki smo jih izpostavili proklorazu. Za gen *hexam* pričakujemo nižje izražanje v prisotnosti prokloraza in kumafosa.

Študija (Gregorc in sod., 2012) je med drugim pokazala, da je izražanje gena *PGRP* v prisotnosti pesticidov in kombinaciji pesticidov z *V. destructor*, povišano. Pričakujemo, da bodo imele čebele, ki so bile izpostavljene pesticidoma oz. pesticidoma in *V. destructor*, spremenjeno izražanje tega gena.

Gena *abaecin* in *defenzin* imata ob okužbi z *V. destructor* močno povišano izražanje (A. Gregorc, 2012). V skladu s to študijo pričakujemo povišano izražanje obeh genov pri naših vzorcih, ki so bili napadeni s pršico.

Richards in sodelavci so leta 2012 dokazali, da je pri čebeli izražanje gena *domeless* ob okužbi z *V. destructor* povišano. Nekaj čebel je bilo v času, ko so bile izpostavljene pesticidu, okuženih s pršico *V. destructor*. Pri teh vzorcih pričakujemo povišano izražanje gena *domeless*.

Pričakujemo, da bodo imele čebele in njene razvojne stopnje, ki smo jih izpostavili pesticidom, spremenjeno izražanje preiskovanih genov glede na kontrolo. Predvidevamo, da bodo te spremembe podobne kot so jih opisali v zgoraj omenjenih študijah, če izvajamo odstopanja, ki jih lahko pričakujemo, glede na nekoliko drugače zastavljene poizkuse.

3 MATERIALI IN METODE

Iz ene čebelje družine smo naredili 4 nove družine ter odstranili matico in zalego, ki pa smo jo zamenjali z novo zalego iz druge čebelje družine, da smo imeli enak genetski material. Matice v poskusu ni bilo, zato so čebele poskušale vzrediti novo matico, zaradi česar je bilo kar nekaj težav. Po eno družino smo izpostavili kumafosu, proklorazu oziroma njuni kombinaciji, ene družine pa nismo tretirali in smo jo uporabili za kontrolo. Za vzorce smo vzeli čebele v različnih razvojnih stopnjah. Vsak vzorec posebej smo homogenizirali s pomočjo kovinske terilnice. Izolirali smo RNA in jo prepisali v cDNA. Za analizo izražanja genov smo uporabljali kvantitativno metodo Real-Time PCR.

3.1 NAČRT EKSPERIMENTA

3.1.1 Protokol tretiranja čebel s proklorazom in kumafosim (perizinom)

HRANA ZA ČEBELE:

Za 500g pogače smo uporabili:

- 20g jajčnega rumenjaka iz bio jajc (vir holesterola)
- 40 g kvasa (FALA, Bonopan d.o.o.) (vir B vitaminov)
- 65 g sojinega sira (BIOTUFU, GRANOVITA) (vir beljakovin)
- 360 g sladkorja v prahu (brez dodatkov proti strjevanju)
- 5 ml vode
- 10 g olivnega olja z acetonom (s 5mg prokloraza ali brez)

Sojin sir smo dobro pretlačili z žlico ter dobro premešali vse komponente pogače.

Priprava predraztopine prokloraza: 5mg prokloraza (Sigma Aldrich) smo raztopili v 1 ml acetona ter dodali do 10 g olivnega olja (rafinirano olivno olje Costa d'Oro).

Končna koncentracija prokloraza je bila 10 µg/g hrane.

3.1.2 Protokol tretiranja čebeljih družin:

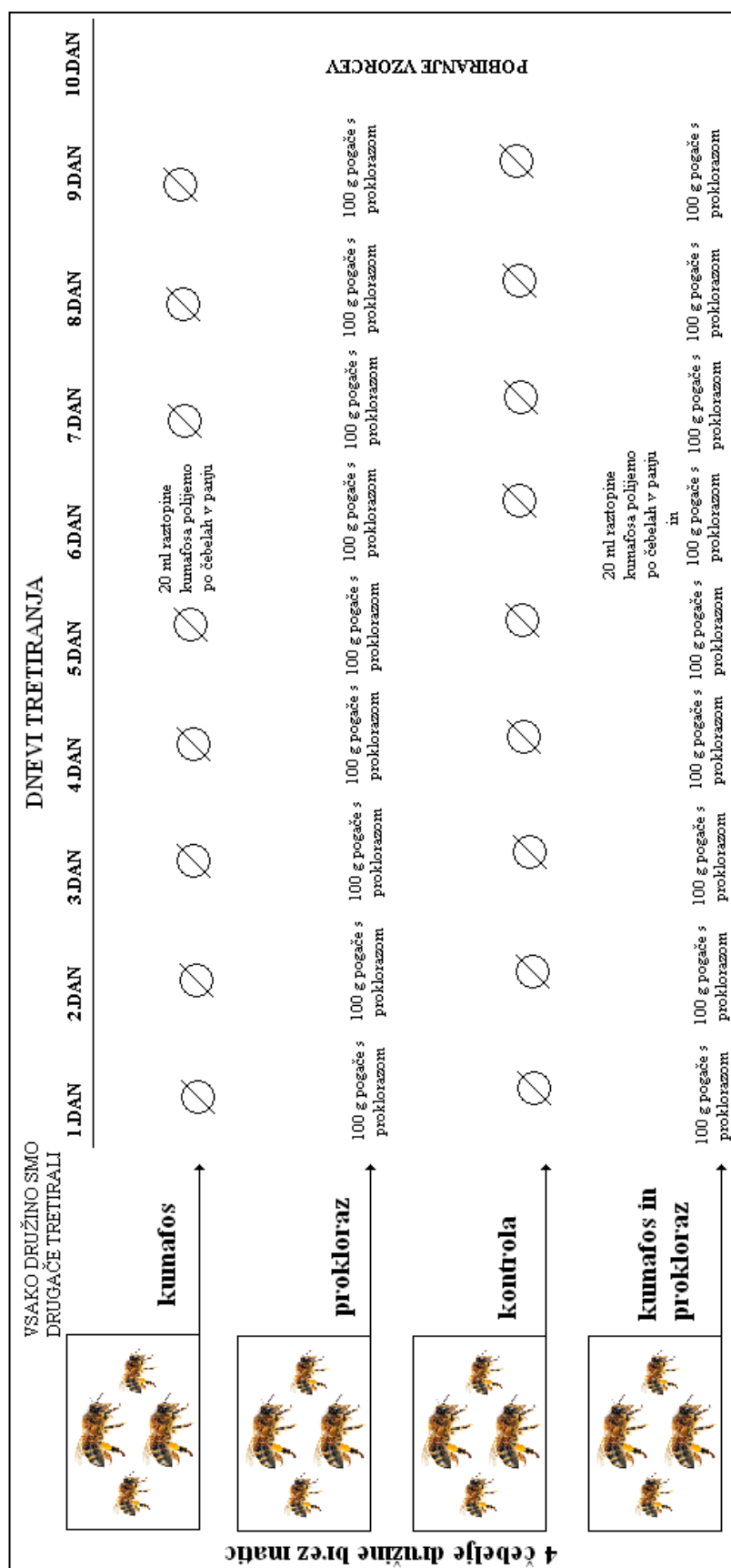
- Teden pred poskusom so bile na novo narejene 4 čebelje družine.
- Vsak dan smo v panje dali po 100g pogače: dvema družinama smo dali pogačo s proklorazom, dvema pa pogačo brez prokloraza. Pogače ni smelo zmanjkati, zato sta bile dve družini ves čas, kronično izpostavljeni proklorazu. Porabo hrane smo vsak dan tehtali.

- Šesti dan smo dve družini (eno, ki je bila izpostavljena proklorazu ter eno, ki ni bila tretirana) enkratno tretirali še perizinom (kumafosom) po navodilih proizvajalca: emulzijo 3,2 % kumafosa smo 50-krat razredčili z vodo, ter pokapali 20 ml te raztopine po čebelah v panju.
- Deseti dan smo pobrali odrasle čebele, ličinke in bube.

Štiri družine so bile tretirane na naslednje načine:

1. čebelja družina brez tretmanov (Kontrolna)
2. čebelja družina s kumafosom
3. čebelja družina s proklorazom
4. čebelja družina s kumafosom in proklorazom

Načrt poskusa je grafično prikazan na sliki 6.

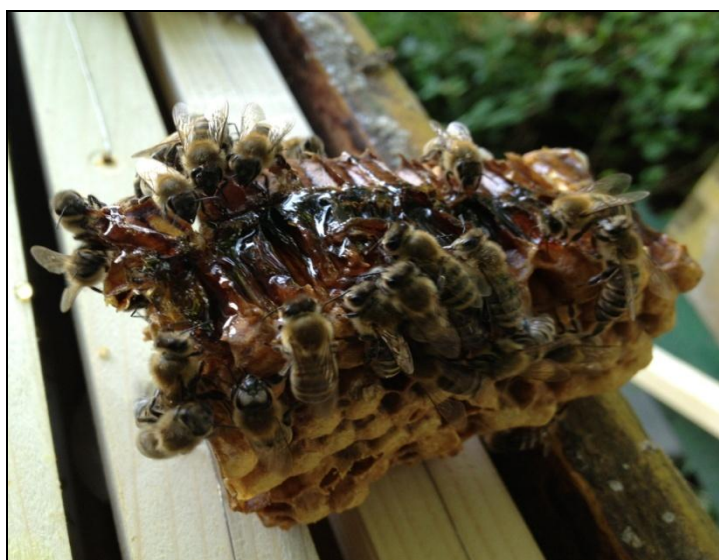


Slika 6. Shema protokola tretiranja čebeljih družin

Poskus smo izvedli v začetku avgusta 2013. Po končanem poskusu smo pobrali vzorce tretiranih čebel v različnih razvojnih stopnjah. Vzorce smo takoj po pobiranju zamrznili s tekočim dušikom in jih shranili na -80°C , da bi čim bolj omejili razgradnjo RNA z RNazami. Pridobili smo naslednje vzorce čebel in čebelje zalege (preglednica 2):

Preglednica 2. Število pridobljenih vzorcev, izpostavljenih pesticidom, glede na razvojno stopnjo *A. mellifera carnica*

tretma razvojna stopnja čebele	Prokloraz in kumafos	Prokloraz kumafos in varoja	prokloraz	prokloraz in varoja	kumafos	kumafos in varoja	kontrola	kontrola in varoja
Ličinka 1	8							
Ličinka 2	23	1	2		2		9	1
Buba 1	6				4		4	
Buba 2	6				10	5	5	1
Odrasla čebela	5		5		5		5	
Ličinka matice 1			1					
Ličinka matice 2			5				1	
Buba matice 1			2		2		1	
Buba matice 2					1			
Buba matice 3							1	



Slika 7. Del satovja, posneto med pobiranjem vzorcev



Slika 8. Celotno satovje, posneto med pobiranjem vzorcev

3.2 IZOLACIJA RNA

3.2.1 Priprava homogenizata vzorcev čebel in čebelje

Vzorci čebel in čebelje zalege smo zdrobili v kovinski terilnici, ohlajeni s tekočim dušikom, in prenesli v 2 ml eppendorfove epruvete. Takoj smo dodali 1,5 ml reagenta TRIzol, ki zagotavlja integriteto prisotne RNA, medtem ko razgradi ostale dele celic. Ob dodatku reagenta TRIzol smo vzorce vsakega posebej temeljito resuspendirali, da smo zagotovili dober stik celic z reagentom, ki onemogoči delovanje RNaz. Homogenizirali smo vsak vzorec posebej.

3.2.2 Izolacija RNA

Po dodatku reagenta TRIzol smo vzorcem dodali kloroform in jih pri 4°C centrifugirali 15 min na 12.000 g. Izoblikovale so se tri plasti. Odpipetirali smo zgornjo bistro plast, pri čemer smo pazili, da v pipeto nismo zajeli srednje oziroma spodnje plasti. Zgornjo plast, ki je vsebovala RNA, smo uporabili za izolacijo RNA s kompletom reagentov PureLink RNA isolation blagovne znamke AMBION.

3.3 MERJENJE KONCENTRACIJE RNA IN DOLOČANJE NJENE ČISTOSTI

Koncentracijo in čistost RNA vzorcev smo izmerili s pomočjo naprave *NanoVueTM* Plus spectrophotometers GE Healthcare. Nečistoče v vzorcih so lahko posledica ostankov celic, ki jih nismo uspeli odstraniti ali pa so ostanki reagentov, s katerimi smo vzorce tretirali.

Med nečistočami so pomembni predvsem alkoholi, ki lahko motijo proces prepisovanja v cDNA.

Za oceno čistosti DNA oziroma RNA smo izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm ter izračunali njuno razmerje. Vrednost $\sim 1,8$ pomeni »čisto« DNA, razmerje $\sim 2,0$ pa »čisto« RNA. Nižje razmerje lahko pomeni prisotnost proteinov oziroma drugih nečistoč, ki absorbirajo valovno dolžino okoli 280 nm.

Pri merjenju razmerja z NanoVue lahko pride do odstopanj, ki so posledice:

- sprememb v kislosti vzorca. Majhne spremembe v pH raztopine lahko povzročijo spremembe v razmerju 260/280. Bolj kisle raztopine bodo povzročile 0.2-0.3 nižje meritve, medtem ko bazične povzročijo 0.2-0.3 višje.
- nenatančnih spektrofotometrov. Predvsem odstopanje v valovni dolžini 280 lahko povzroči znatno odstopanje pri razmerju. Veliko spektrofotometrov ima klasificirano svojo natančnost na ± 1 nm, kar lahko pri razmerju 260/280 pripelje do odstopanja do 0.4.
- različnega razmerja nukleotidov v vzorcu. Nukleotidi, ki sestavljajo DNA in RNA, močno vplivajo na razmerje 260/280. Zavedati se moramo, da sta razmerji 1,8 in 2,0 okvirni vrednosti in da je navadno RNA razmerje mnogo višje, zaradi večje vsebnosti Uracila kot Timina.

3.4 REDČENJE VZORCEV NA ENAKO

Vzorci z visoko koncentracijo RNA (≥ 300 ng/ μ l), smo predhodno 10-krat redčili, da smo dobili količine, ki smo jih lahko odpipetirali. Nato smo, upoštevajoč pripravo vseh reakcijskih mešanic, vse vzorce redčili na željeno koncentracijo - 10 ng/ μ l.

PRIMER:

Izhodiščna koncentracija RNA v vzorcu je bila 60 ng/ μ l. V reakcijo za tretiranje z DNazo smo odpipetirali 3.3 μ l, da smo dobili 200 ng RNA v 10 μ l reakcijski mešanici. Vzeli smo vseh 10 μ l reakcijske mešanice oziroma 200 ng RNA in naredili 20 μ l reakcijsko mešanico za prepis RNA v cDNA. Tako smo dobili željeno koncentracijo cDNA 10 ng/ μ l.

3.5 PREPISOVANJE V CDNA

Pred začetkom postopka prepisovanja RNA v cDNA smo vzorce tretirali z DNazo, ki je razgradila morebitne ostanke DNA, ki bi kasneje motili postopek RT-PCR.

Preglednica 3. Protokol za tretiranje RNA z DNAzo (DNAse I, RNAse free, Thermo scientific)

Reagent	Količina
RNA	200 ng
10x pufer	2 µl
DNAze I.	2 µl
voda brez nukleaz	do 20 µl

Mešanico smo:

- inkubirali 30 min na 37°C
- nato dodali 2 µl EDTA
- inkubirali še dodatnih 10 min na 65°C, da smo inaktivirali DNA-zo

Prepis RNA v cDNA smo naredili po protokolu visoko kapacitetnega kompleta reagentov za cDNA reverzno transkripcijo od podjetja Applied Biosystems (ang. high capacity cDNA reverse transcription kit).

Preglednica 4. Priprava osnovne zmesi za prepis RNA v cDNA

Reagent	Količine, potrebne za 1 vzorec
10x RT pufer	2 µl
25x dNTP	0,8 µl
10x RT random primers	2 µl
reverzna transkriptaza	1 µl
RNAzni inhibitor	1 µl
voda brez nukleaz	3,2 µl

3.6 OLIGONUKLEOTIDNI ZAČETNIKI

Na osnovi zbranih podatkov iz literature smo pri IDT (integrated DNA technologies, Inc.) naročili 24 parov oligonukleotidnih začetnikov. Vsakega od oligonukleotidnih začetnikov smo redčili z vodo brez nukleaz (ang. nuclease free water), da smo dobili delovno redčitev oligonukleotidnih začetnikov (10 µM). Oligonukleotidne začetnike smo validirali. Naredili smo redčitveno vrsto cDNA, ki je kasneje služila za izris umeritvene krivulje ter izračun učinkovitosti (efficiency) oligonukleotidnih začetnikov, ki nam pove kako uspešno se izbrani deli cDNA podvajajo. Nato smo pripravili osnovno zmes za qPCR:

Preglednica 5. Osnovna zmes za redčitveno vrsto cDNA

Reagenti	Količina za eno reakcijo
voda brez nukleaz	2,4 µl
1. primer	0,3 µl
2. primer	0,3 µl
syber green	5 µl
cDNA	2 µl

V literaturi smo zasledili številne gene, ki imajo pri izpostavljenosti organizma pesticidom oziroma *V. destructor* povišano oziroma znižano izražanje. Naročili smo oligonukleotidne začetnike teh genov in z njimi preverjali izražanje genov pri vzorcih čebel, ki so bile izpostavljene pesticidoma kumafosu in proklorazu.

Preglednica 6. Geni, ki smo jih povzeli iz literature in naj bi se različno izražali pod vplivom kumafosa, prokloraza oziroma varoje (Gregorc in sod., 2012: 1047).

GEN	VIŠJE IZRAŽANJE	NIŽJE IZRAŽANJE	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
<i>PPOact</i>	imadacloprid	acetone	GTTTGGTCGACGGAAGAAAA	CCGTCGACTCGAAATGGTAT
	coumaphos	amitraz		
	myclobutanil	chlorprifos		
	chlorothanonil	fluvalinate		
		glikofosfat		
		simazin		
<i>PGRP</i>	chlorothanonil	fluvalinate	TAATTCATCATTCGGCGACA	TGTTTGTCCTCATCTCTTCC
	imadacloprid			
<i>Hexam</i>	imadacloprid	glikofosfat	GGACAATTGGATCTGCTCGT	GTGTTGCTCCGCTTTTCAG
	fluvalinate	simazin		
	coumaphos			
	myclobutanil			
	amitraz			
<i>DWV</i>	myclobutanil	chlorothanonil	GAGATTGAAGCGCATGAACA	TGAATTCAGTGTCGCCATA
	acetone	glikofosfat		
	imadacloprid			

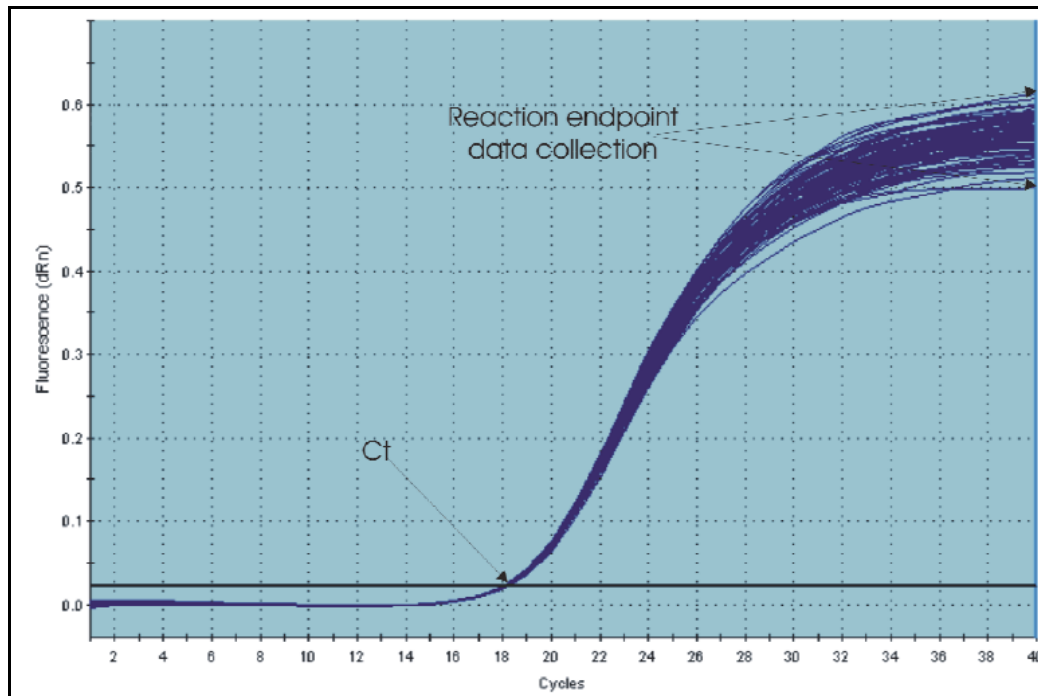
3.7 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Tehnologijo, ki nam omogoča pomnoževanje specifičnega dela vzorca DNA, imenujemo PCR (ang. polymerase chain reaction). qPCR (ang. quantitative polymerase chain reaction) je oblika PCR, ki temelji na dejstvu, da se količina specifičnega dela prvotne DNA (oziroma RNA, ki smo jo prepisali v cDNA) v vzorcu z vsakim temperaturnim ciklom podvoji. Količina namnoženega produkta je premo sorazmerna količini fluorescence, ki jo

oddaja reporterska molekula. Reporterske molekule smo dodali v obliki SYBER® green barvila. Po zaključenem procesu, ki ga sestavlja 30-40 temperaturnih ciklov, se zberejo podatki o intenziteti fluorescence. Iz količine namnožene DNA lahko sklepamo na začetno količino DNA v vzorcu (Bolha in sod., 2012).

Zaradi neučinkovitosti podvajanja med zadnjimi cikli lahko pri tej metodi pride do nekoliko neskladnih rezultatov (Slika 9). To se zgodi, ko je večina reagentov že porabljenih in so reakcijski inhibitorji nakopičeni. Takšni učinki se med vzorci razlikujejo, kar pripelje do razlik v fluorescenčnih vrednostih, ki niso povezane z začetno koncentracijo DNA. Te metode ne uporabljamo, ko želimo dobiti natančne meritve, zahtevane za kvantitativne analize. Vseeno pa je zelo uporabna za kvalitativne študije, kjer želimo le izvedeti, ali je tarčna sekvenca v vzorcu prisotna (Dušanić in sod., 2012).

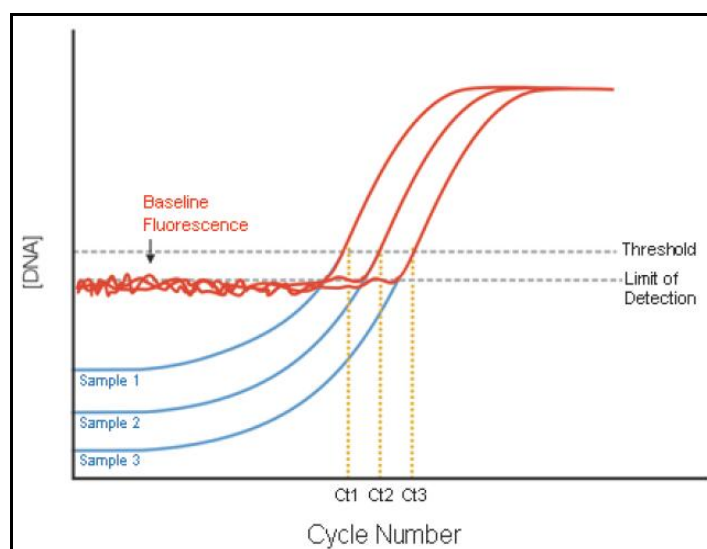
Bolj natančna je metoda, kjer merimo fluorescenco v vsakem ciklu reakcije posebej, kar nam omogoča kvantifikacijo med eksponentno fazo. Tu ne prihaja do neskladij zaradi kopičenja inhibitorjev, pomanjkanja reagentov ali inaktivacije polimeraze (Dušanić in sod., 2012).



Slika 9. Primer rezultata PCR reakcije v grafični obliki (introduction..., 2012: 3).

Z vsakim pomnoževalnim ciklom se enakomerno z namnoženim produktom poveča tudi količina fluorescence. Nato se uredijo rezultati vseh vzorcev na skupno začetno točko.

Temu pravimo popravek na osnovno črto (ang. baseline correction). Prag fluorescence je postavljen nad ozadje, a vseeno v linearno fazo PCR reakcije (slika 10). Cikel, pri katerem vrednost fluorescence sovпада s pragom fluorescence, imenujemo cikel kvantifikacije Cq (ang. threshold cycle Ct). Cq vrednost neposredno korelira z začetno koncentracijo tarče v vzorcu. Pri večji začetni koncentraciji DNA fluorescenca prej doseže Cq (agilent technologies, 2012).



Slika 10. Princip qPCR, kjer je prag postavljen nad ozadje fluorescence in Cq predstavlja cikel pri katerem vzorec doseže prag (introduction..., 2012: 4).

3.8 OBDELAVA QPCR REZULTATOV

Vzorci smo analizirali z napravo ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Vse vzorce smo analizirali v treh tehničnih ponovitvah. Rezultate smo uredili tako, da smo odstranili vzorce, ki se niso uspešno podvajali. Pri urejanju rezultatov za umeritveno krivuljo smo odstranili vzorce, ki so odstopali, da smo optimizirali naklon premice (slope) R^2 in učinkovitost E (ang. efficiency).

Učinkovitost podvojitve smo izračunali iz naklona premice standardne krivulje po formuli:

$$E = 10^{(-1/\text{naklon premice})} \quad \dots(1)$$

Idealno bi bilo, če bi se količina PCR produkta v vsakem ciklu PCR reakcije točno podvojila. V tem primeru bi bilo po vsakem ciklu dvakrat več kopij produkta, kar bi pomenilo, da je $E=2$. Iz tega sledi, da je optimalni naklon premice -3,32. Učinkovitost smo podali v odstotkih s formulo: učinkovitost = $(E-1) \times 100$. Za idealno bi torej pomenilo:

$$(2-1) \times 100 = 100 \% \quad \dots(2)$$

PRIMER

Pri genu *basket* smo imeli naklon umeritvene krivulje : -3,339

Vrednost E:

$$E = 10^{(-1/-3,339)} = 1,993$$

$$\text{Učinkovitost \%} = (1,993-1) \times 100 = 99,3 \%$$

Vrednosti učinkovitosti, vrednosti naklonov umeritvenih krivulj in vrednosti E so zbrane v Prilogi D.

Da bi lahko pokazali povišano oziroma znižano izražanje genov, smo izračunali spremembo izražanja (ang. fold change). V začetnih ciklih PCR je fluorescenca v ozadju, po določenem številu ciklov pa se namnoži toliko produkta, da sproži merljivo fluorescenco. Cikel, pri katerem se to zgodi, imenujemo prag ali Cq (cikel kvantifikacije). Za izračun spremembe izražanja (ang. fold change) smo uporabil naslednjo formulo (Pfaffl, 2001):

$$\frac{E_{\text{vzorca}}^{\Delta Cq_{\text{vzorca}}}}{E_{\text{reference}}^{\Delta Cq_{\text{reference}}}} \dots (3)$$

Za izračun referenčnih ΔCq smo uporabili vrednosti Cq treh referenčnih genov: *AKTIN*, *RP49* in *RPS5*. Izračunali smo geometrijsko sredino posameznih Cq vrednosti paralel, nato geometrijsko sredino dobljenih vrednosti (npr. OČ1), na koncu pa aritmetično sredino med vzorci (OČI 1, OČI 2, OČI 3, OČI 4 in OČI 5). Nato smo vrednosti, ki smo jih dobili pri vzorcih kontrolne skupine, odšteli od vrednosti, ki smo jih dobili pri vzorcih tretirane skupine. To smo ponovili za vsak vzorec posebej. Primer izračuna je prikazan v Prilogi A, izračunane vrednosti pa v Prilogi H.

Za izračun ΔCq vzorcev smo izračunali aritmetično sredino vseh Cq nekega vzorca tretirane skupine (upoštevali smo tehnične ponovitve in vzorce iste skupine) in aritmetično sredino Cq istega vzorca kontrolne skupine, nato pa vrednost vzorcev kontrolne skupine odšteli od vrednosti vzorcev tretirane skupine. Tako smo naredili za vsak vzorec posebej in dobili ΔCq za vsak vzorec posebej. Primer izračuna je prikazan v Prilogi B, izračunane vrednosti pa v Prilogi E.

Spremembo izražanja genov smo izračunali s formulo po Pfaffl-u (2011).

Primer izračuna za gen *hexam* pri odrasli čebeli I.

$$\frac{1,950^{-1,951}}{2,029^{-1,170}} = 0,681$$

Rezultate smo prikazali v grafikonih za vsak gen posebej.

3.9 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Signifikanca P oz. statistična značilnost nam pove, ali lahko s 95 % gotovostjo trdimo, da razlika med primerjavnima skupinama obstaja. Izračunane vrednosti P za vsak gen posebej so prikazane v Prilogah S, P, N, L, J, H in U. Če so vrednosti signifikance P manjše od 0,05, velja, da sta vzorca med seboj statistično značilno različna.

Statistično značilno podobne vrednosti so na grafih (Slike 11-17), znotraj ene razvojne stopnje čebele, označene z različnimi črkami. Če sta vzorca med seboj nista statistično značilna, sta na grafu označena z enako črko. Statistično značilnost smo računali znotraj ene razvojne stopnje čebele.

Standardno napako smo izračunali s pomočjo računalniškega programa Excel. V eni razvojni stopnji čebele smo uporabili pet enakih vzorcev, kjer je bilo to mogoče. Kjer vzorcev ni bilo dovolj, smo jih uporabili manj (najmanj eden). V qPCR smo vsak vzorec nanesli trikrat. Vse dobljene rezultate smo uredili tako, da smo dobljene Cq za vsak gen posebej odšteli od Cq referenčnih genov (*aktin*, *RPS5*, *RP49*). Nato smo znotraj teh rezultatov s statističnimi funkcijami STDEV in SQRT v programu Excel izračunali standardno napako. To smo na grafih prikazali s pomočjo statističnih okvirjev.

4 REZULTATI

4.1 KONCENTRACIJA VZORCEV RNA IN NJIHOVA ČISTOST

Po izolaciji RNA smo izmerili količino izolirane RNA v vzorcih. Da bi lahko rezultate med seboj primerjali, smo glede na izmerjeno količino RNA naredili redčitve in dobili enako koncentracijo RNA (10 ng/ μ l) v vseh vzorcih. Vzorci z vrednostmi razmerja (A260/A280 in A260/A230) nad 2,0 so bili dovolj čisti in smo jih uporabili za prepis v cDNA. Ostale vzorce smo shranili, a jih nismo uporabili. 59 % vzorcev je bilo dovolj čistih, da smo jih lahko uporabili.

Vzorci odraslih čebel so bili zelo čisti. Uporabili smo 95 % vzorcev odrasle čebele. Največ težav smo imeli z vzorci ličinke 2, kjer je bilo uporabnih le 25 % vzorcev. Da smo pri vsaki razvojni stopnji čebele in različni vrsti pesticida dobili po vsaj en vzorec, smo morali uporabiti vzorce, katerih razmerje A260/A230 je bilo nekoliko nižje od 2.0. Zanimivo je bilo, da je bilo pri ličinkah matice 2 dovolj čistih 100 % vzorcev. Pri bubah je bilo zadostno čistih 65 % vzorcev. Rezultati so prikazani v Prilogah C, D in E. Vzorce, ki smo jih izpostavili kumafosu, smo označili z rimsko številko III. Vzorce, ki smo izpostavili proklorazu, z rimsko številko II. Z rimsko številko I smo označili vzorce, ki smo jih izpostavili kombinaciji obeh pesticidov. Kontrola je bila označena z rimsko številko IV.

4.2 ANALIZA QPCR REZULTATOV

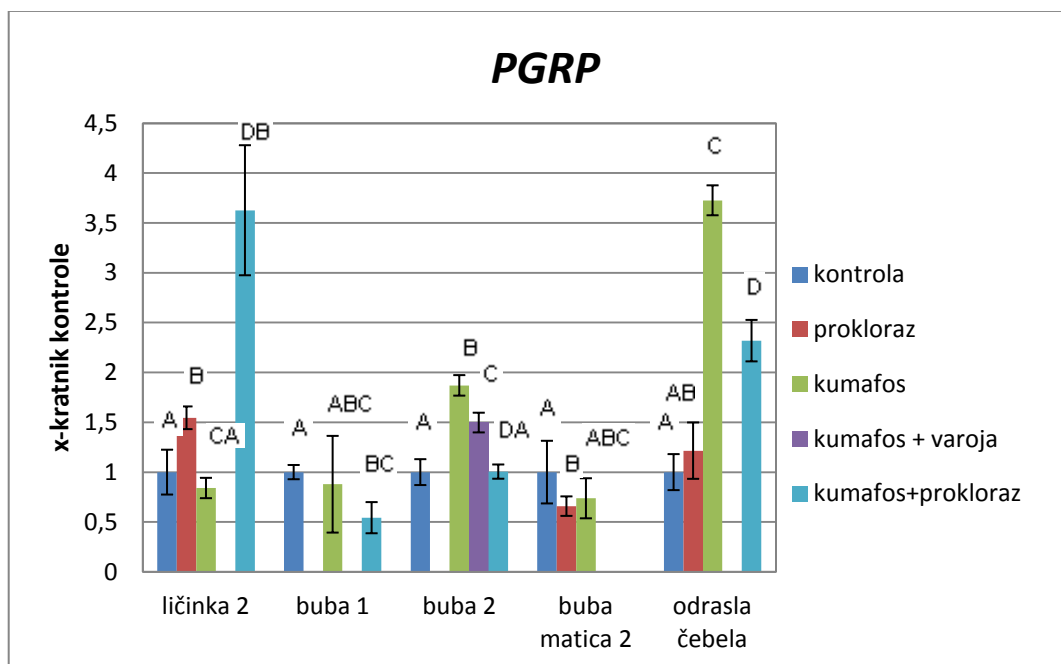
Analizirali smo gene, ki kodirajo peptide, udeležene v imunskih poteh Toll, Imd in JNK ter JAK/STAT. Nekateri proteini so signalni in sprožijo določeno imunsko pot. Takšen je npr. Domeless, ki sodeluje pri imunski poti JAK/STAT. Nekateri geni kodirajo efektorske proteine, npr. Defenzin in Abaecin, ali melanizacijske proteine npr. PPO. Transkripcijski faktorji, npr. Relish in Basket, aktivirajo prepis genov za efektorske peptide.

4.2.1 Izražanje gena *PGRP*

Pri odraslih čebelah smo opazili povišano izražanje gena *PGRP* (3.7-krat), ko so bile izpostavljene akaricidu kumafosu. Pri čebelah, ki smo jih izpostavili fungicidu proklorazu, se je izražanje povišalo za 1,2-krat. Tudi kombinacija obeh sredstev je povzročila dvakratno povišanje izražanja.

Pri ličinki 2 je kumafos povzročil znižanje izražanja gena za 15 %. Ličinke izpostavljene proklorazu, so imele povišano izražanje gena glede na kontrolo za okoli 60 %. Kombinacija obeh sredstev je povzročila 3,6–kratno povišanje izražanja.

Pri bubi 1 in bubi matice se je izražanje glede na kontrolo znižalo. Pri bubi 2 pa smo opazili povišanje izražanja ne glede na sredstvo, kateremu so bile bube izpostavljene (Slika 11). Vse točne vrednosti izražanja so zbrane v Prilogi G.



Slika 11. Izražanja gena *PGRP* glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.

4.2.2 Izražanje gena *abaecin*

Odrasle čebele so imele povišano izražanje gena *abaecin*, ko so bile izpostavljene kumafosu (~2–krat), proklorazu (~2,8–krat) in kombinaciji obeh (~1,5–krat)

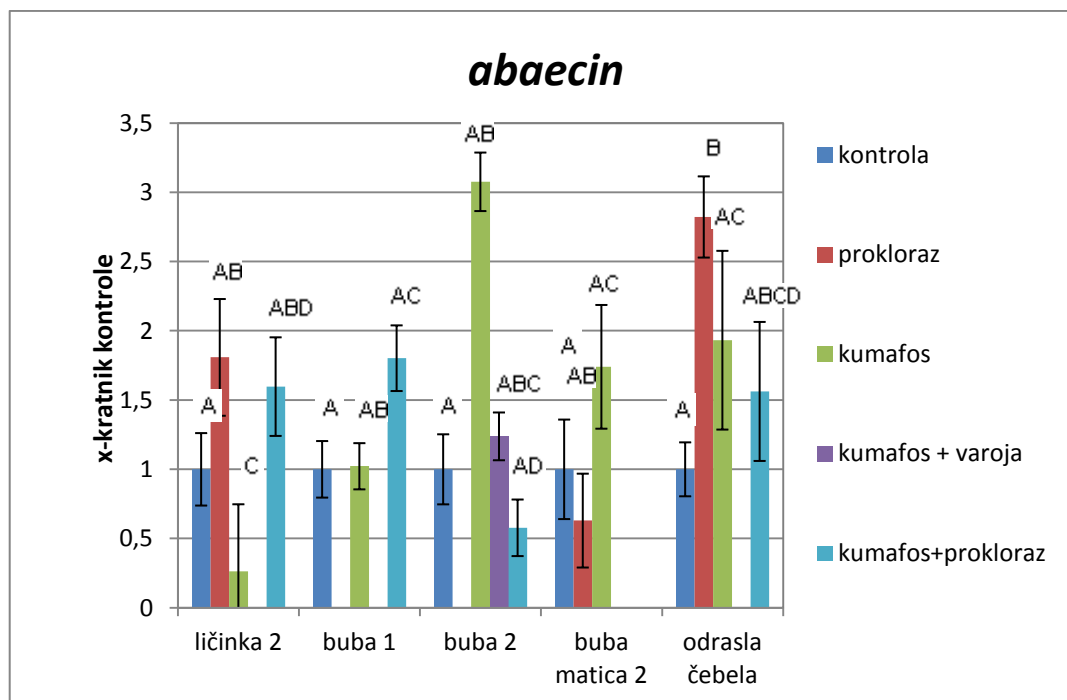
Ličinke 2 so imele povišano izražanje tega gena, ko smo jih izpostavili proklorazu (~1,8–krat) in kombinaciji sredstev (~1,5–krat). Ko smo jih izpostavili kumafosu, se je izražanje glede na kontrolo znižalo za ~80 %.

Pri bubi 1 je izražanje ostalo skoraj nespremenjeno pri bubah izpostavljenih kumafosu. Kumafos skupaj s proklorazom je povzročil ~1,8–kratno zvišanje izražanja, glede na kontrolo.

Bube 2, ki smo jih izpostavili kumafosu, so imele povišano izražanje gena (~3,1–krat). Kombinacija kumafosa in varoje je povzročila pri bubah 2 okoli 20 % porast izražanja. Pri

kombinaciji obeh pesticidov pa so imele skoraj polovično znižano izražanje glede na kontrolo.

Prokloraz je pri bubah matic izražanja gena *abaecin* skoraj prepolovil, kumafos pa je povišal izražanje približno 1,7-krat (Slika 12). Vse vrednosti stopenj izražanja za gen *abaecin* so zbrane v Prilogi I.



Slika 12. Izražanja gena *abaecin* glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.

4.2.3 Izražanje gena *defenzin*

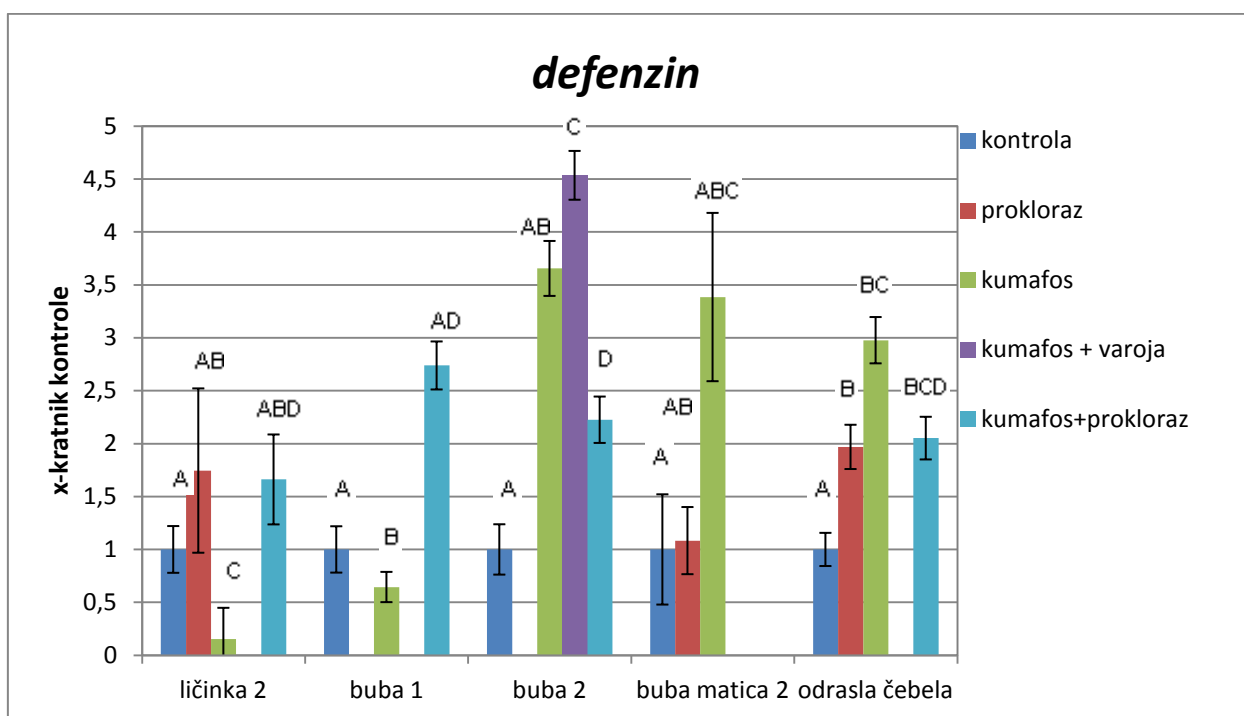
Pri odrasli čebeli je bilo izražanje gena *defenzin* v prisotnosti kumafosa 3-krat višje, v prisotnosti prokloraza in kombinacije obeh proizvodov pa 2-krat višje.

Pri ličinki 2 je kumafos povzročil skoraj 90 % znižanje izražanja gena (Slika 13), prokloraz in kombinacija pa ~ 1,7-krat povišanje izražanja.

Bube 1 so imele znižano izražanje gena *defenzin* v prisotnosti kumafosa in povišano (~2,8-krat), ko so bile izpostavljene obema pesticidoma.

Kumafos je pri bubah 2 povzročil povišanje izražanja (~3,7-krat). Na bubah 2, ki so bile napadene z varojo pa kar 4,5-krat. Kombinacija kumafosa in prokloraza je povišala izražanje gena ~ 2,2-krat.

Pri bubah matic prokloraz ni povzročil spremembe, kumafos pa je zvišal izražanje za skoraj 3,5-krat. Vse vrednosti izražanja za gen *defenzin* so zbrane v Prilogi K.



Slika 13. Izražanja gena *defenzin* glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.

4.2.4 Izražanje gena *PPO*

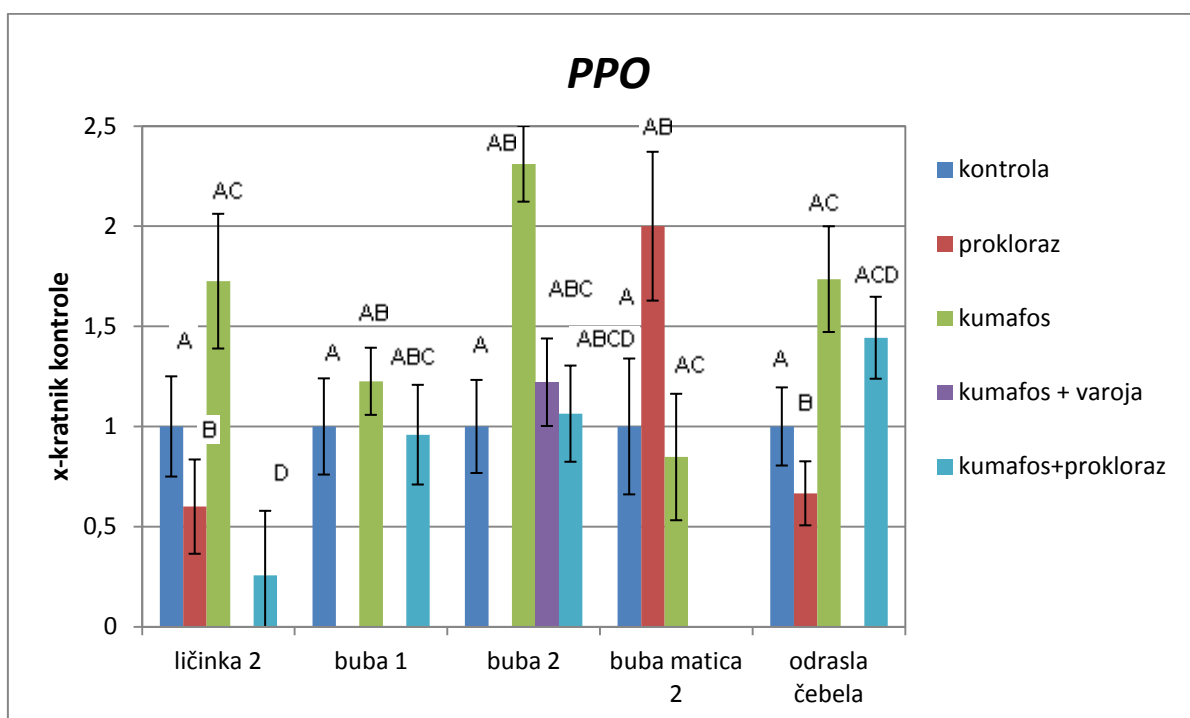
Pri odraslih čebelah smo opazili povišanje izražanje gena *PPO*, ko so bile izpostavljene kumafosu (~1,7-krat) in kombinaciji kumafosa in prokloraza (~1,4-krat). Izražanje se je glede na kontrolo znižalo pri čebelah, ki so bile izpostavljene proklorazu za 33 %.

Pri ličinkah 2, ki smo jih izpostavili kumafosu, se je izražanje povišalo (~1,75-krat). Ličinke 2, hranjene s proklorazom in kombinacijo prokloraza in kumafosa, so imele znižano izražanje gena (Slika 14).

Pri bubi 1 kombinacija pesticidov ni povzročila spremembe v izražanju. Majhno povišanje smo opazili pri bubah, ki so bile izpostavljene kumafosu.

Pri bubah 2 je bilo izražanje močno povišano (~2,3-krat), ko so bile izpostavljene kumafosu. Bube 2, ki so bile napadene z varojo in izpostavljene kumafosu, so kazale majhno povišanje izražanja gena, medtem ko kombinacija kumafosa in prokloraza ni povzročila sprememb.

Bube matice, ki smo jih hranili s proklorazom, so imele 100 % povišano izražanje gena *PPO*. Pri bubah maticah, kjer smo aplicirali kumafos, pa se je izražanje znižalo za približno 15 %. Vse vrednosti sprememb izražanja za gen *PPO* so zbrane v Prilogi M.



Slika 14. Izražanja gena *PPO* glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.

4.2.5 Izražanje gena *hexam*

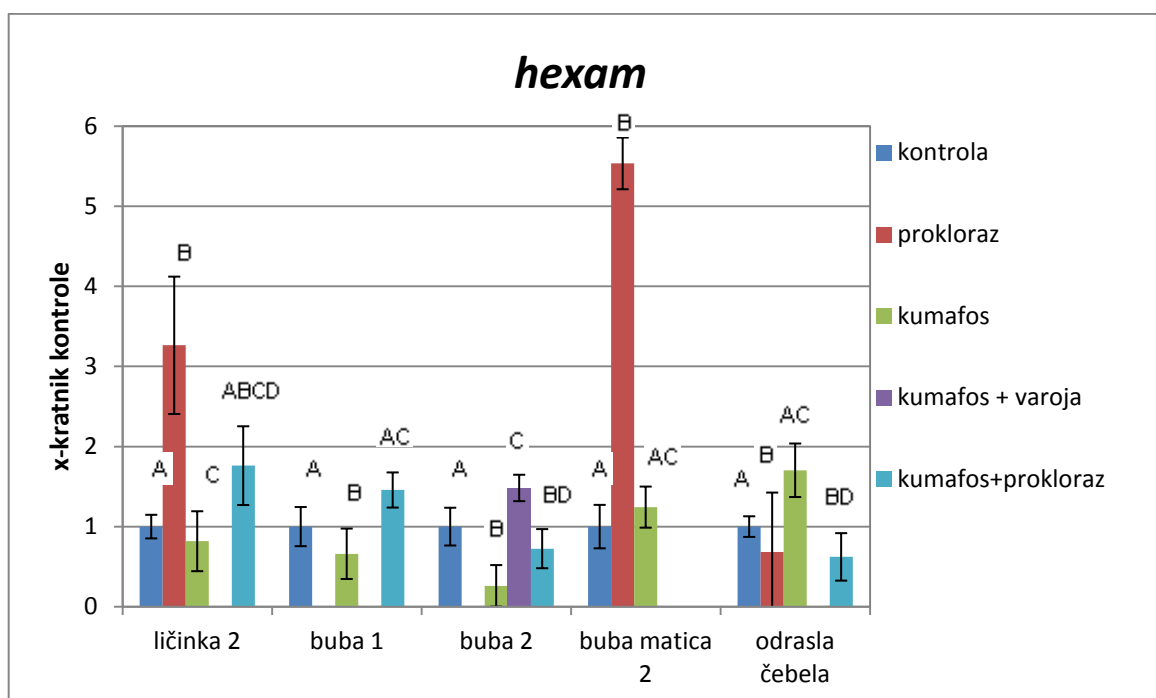
Odrasle čebele so imele 1,7-krat povišano izražanje gena *hexam*, če so bile izpostavljene kumafosu. Izražanje se je znižalo za 32 %, ko so bile hranjene s proklorazom in za 38 %, ko sta bila prisotna oba pesticida (Slika 15).

Ličinke 2 so imele 3,26–krat povišano izražanje, ko smo jih hranili s proklorazom. Ob aplikaciji obeh pesticidov, se je izražanje povišalo za 1,76–krat. Za 19 % pa se je izražanje znižalo pri ličinkah, ki so bile izpostavljene kumafosu.

Bube 1 so imele 1,46–krat povišano izražanje, ko smo aplicirali obe sredstvi. Ko pa smo v panj dodali kumafos, pa so bube 1 imele za 33 % znižano izražanje.

Bube 2 so imele za 28 % znižano izražanje, ko smo jih izpostavili obema pesticidoma. Ko smo aplicirali le kumafos, pa so imele bube 2 kar 74 % znižano izražanje gena *hexam*. Bube, ki so bile poleg kumafosa napadene tudi z varjo, pa so imele 48 % povišano izražanje gena

Vse bube matice 2 so imele povišano izražanje gena *hexam*. Pri vzorcih, ki smo jih hranili s proklorazom, kar 5.5-krat. Vse vrednosti sprememb izražanja za gen *hexam* so zbrane v Prilogi O.



Slika 15. Izražanja gena *hexam* glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.

4.2.6 Izražanje gena *basket*

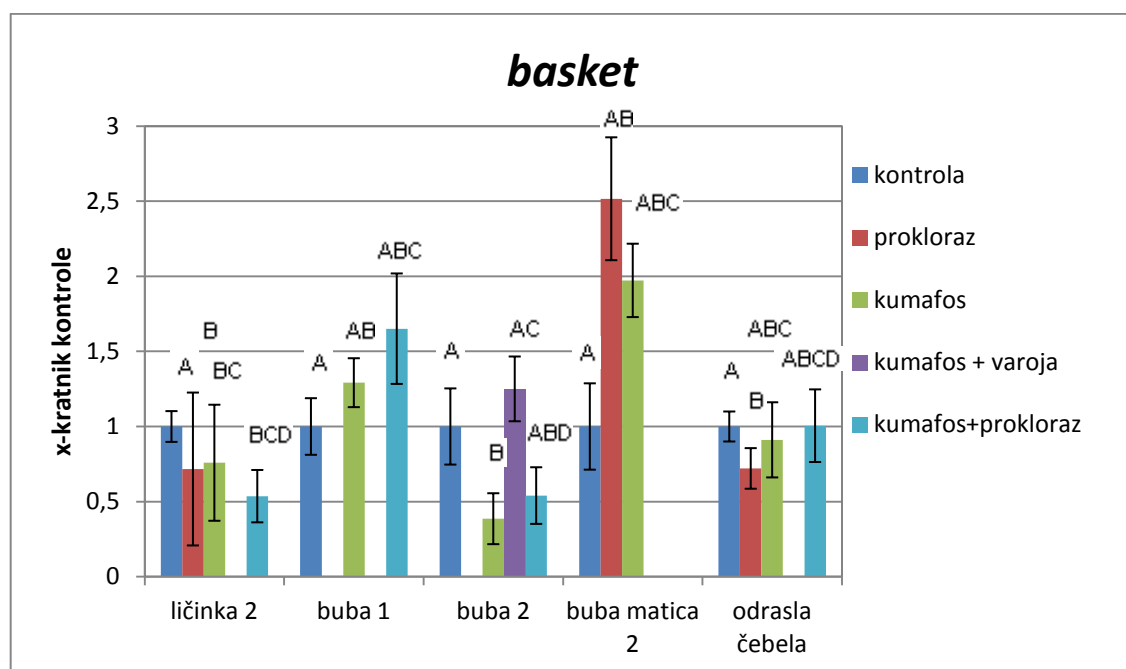
Odrasle čebele so imele znižano izražanje gena *basket* po tem, ko smo jih hranili s fungicidom proklorazom (~35 %) oz. jih izpostavili akaricidu kumafosu (~8 %). Pri čebelah, ki so bile izpostavljene obema pesticidoma, pa se izražanje ni spremenilo (Slika 16).

Ličinke 2 so imele znižano izražanje v vseh treh pogojih. Ličinke, hranjene s proklorazom za ~25 %, ličinke, izpostavljene kumafosu, pa za ~20 % nižje izražanje. Izražanje se je skoraj prepolovilo pri ličinkah, ki smo jim aplicirali oba proizvoda.

Bube 1 so imele za ~20 % višje izražanje, če so bile izpostavljene kumafosu, in za ~60 % višje, ko smo hkratno aplicirali prokloraz in kumafos.

Izražanje gena *basket* pri Bubah 2 se je znižalo za 46 %, ko so bile izpostavljene kombinaciji pesticidov in za 62 %, ko so bile izpostavljene le kumafosu. Za polovico se je povišalo izražanje, ko so bile bube okužene z varjo in izpostavljene kumafosu.

Bube matice 2 so imele 2,5-krat povišano izražanje, ko smo jih hranili s proklorazom, in 1,97-krat, ko smo jih izpostavili kumafosu. Vse vrednosti sprememb izražanja za gen *basket* so zbrane v Prilogi R.



Slika 16. Izražanja gena *basket* glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.

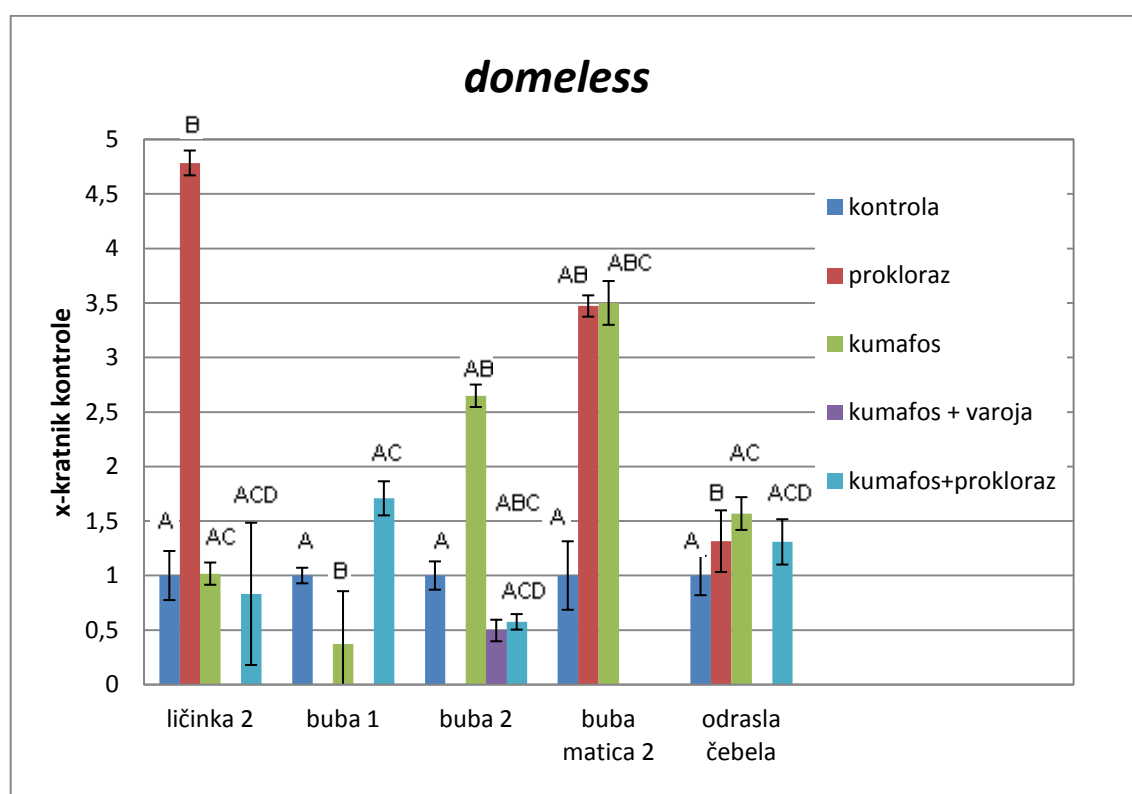
4.2.7 Izražanje gena *domeless*

Odrasle čebele so imele povišano izražanje gena *domeless*, ko smo jih hranili s proklorazom (za 31 %), aplicirali kumafos (za ~56 %) oz. jih izpostavili njuni kombinaciji (za ~30 %) (Slika 17).

Ličinke 2, ki smo jih hranili s proklorazom, so imele skoraj 5–krat višje izražanje. Pri ličinkah, ki smo jih prelili s kumafosom, do sprememb v izražanju ni prišlo. Pri izpostavitvi kombinaciji izdelkov pa smo opazili 17 % nižje izražanje.

Bube 1, ki smo jih prelili s kumafosom, so imele 63% znižanje izražanja gena *domeless*. Ko smo bube hranili s fungicidom in jih prelili z akaricidom, pa je bilo izražanje za ~71 % višje.

Bube 2 so imele 2,65–krat povišano izražanje gena, ko smo jih prelili s kumafosom. Kombinacija pesticidov ter kumafos skupaj z varojo pa sta izražanje pri bubi 2 prepolovila. Bube matice so imele ~3,5–krat višje izražanje, če so bile hranjene s proklorazom ali prelite s kumafosom. Vse vrednosti stopenj izražanja za gen *domeless* so zbrane v Prilogi T.



Slika 17. Izražanja gena *domeless* glede na vrsto pesticida in razvojno stopnjo čebel.

5 RAZPRAVA

5.1 IZRAŽANJE V IMUNSKI POTI TOLL

Geni, ki smo jih obravnavali in izhajajo iz imunske poti Toll, so *PGRP*, *abaecin*, *defenzin* in *PPO*. Opazovali smo njihovo izražanje pri čebelah in njihovih razvojnih stopnjah, ki so bile v času odvzema vzorcev izpostavljene pesticidom oz. napadene z *V. destructor*.

5.1.1 Gen *PGRP*

V študiji (Gregorc in sod., 2012) so dokazali, da je izražanje gena *PGRP* povišano, ko so čebele izpostavljene pesticidom in/ali pršici *V. destructor*.

Pri odraslih čebelah smo opazili povišano izražanje gena. Izražanje se je povišalo, ko so bile čebele izpostavljene kumafosu, proklorazu ali njuni kombinaciji. To je skladno s študijo, ki so jo opravili Gregorc in sodelavci (2012).

Pri ostalih razvojnih stopnjah je bilo izražanje povišano glede na kontrolo, a nižje kot pri odrasli čebeli. Takšni rezultati so precej nenavadni in se ne skladajo z rezultati, ki smo jih zasledili v omenjeni literaturi. Tu lahko poudarim, da poizkus v našem primeru ni bil zastavljen identično kot v drugih študijah. Število vzorcev, koncentracije pesticidov in nekateri drugi parametri so bili drugačni, zato taka odstopanja niso nenavadna.

Ličinka 2 pa je imela kar 3,5-krat višje izražanje, ko je bila izpostavljena mešanici obeh pesticidov. Takšen podatek je skladen s tistimi iz literature, ki smo jih zasledili (Gregorc in sod., 2012).

Če upoštevamo dejstvo, da imunska pot Toll sprožijo gram pozitivne bakterije, je druga možna razlaga, da so ličinke in bube naravno dosti bolj zaščitene (zaprte so v celicah satovja) pred okužbami s patogenimi gram pozitivnimi bakterijami kot odrasle čebele. Iz tega lahko sledi, da je povečanje izražanja gena *PGRP* pri odrasli čebeli zgolj posledica večji izpostavljenosti gram pozitivnim bakterijam, s katerimi so v vsakodnevnem stiku (Michael in sod., 2001).

5.1.2 Gen *abaecin*

Gram pozitivne bakterije sprožijo imunska pot Toll, katere efektorski gen je tudi *abaecin* (Michael in sod., 2001). Gen *abaecin* se povišano izraža, ko je čebela napadena s pršico *V. destructor* (Gregorc in sod., 2012). V študiji (Garrido in sod., 2013) so dokazali, da se pri ličinkah gen *abaecin* znižano izraža, če so izpostavljene kumafosu.

Vse odrasle čebele so imele povišano izražanje gena *abaecin*. Aktivacija imunske poti pri odraslih čebelah je lahko posledica večje izpostavljenosti gram pozitivnim bakterijam. Pri vzorcu, ki je bil napaden z *V. destructor*, smo opazili povišanje izražanja, kar je skladno s študijo (Gregorc in sod., 2012). Izražanje gena *abaecin* je bilo povišano pri večini vzorcev ne glede na to, ali so bili izpostavljeni kumafosu, proklorazu ali njuni kombinaciji. Pri vzorcu ličinke 2 pa so imeli naši vzorci močno znižano izražanje pri ličinkah, ki so bile izpostavljene kumafosu. Podobne rezultate so v svojem delu predstavili tudi Garrido in sodelacvi (2013).

5.1.3 Gen *defenzin*

Defenzin je efektorski protein imunske poti Toll. Podobno kot *abaecin* se tudi *defenzin* povišano izraža pri čebelah, ki so bile okužene s pršico *V. destructor* (Gregorc in sod., 2012).

Tudi tu se naši podatki skladajo s študijo, saj je imel vzorec bube 2, ki je bil izpostavljen kumafosom, hkrati pa okužen z *V. destructor*, več kot 4,5–krat povišano izražanje od kontrole. Bube, ki so bile izpostavljene le kumafosu, so tudi imele močno izražen gen *defenzin*. Vzorec je bil s kontrolo statistično značilen, zato lahko trdimo, da smo s tem potrdili ugotovitve omenjene raziskave. Ostali podatki so bili različni, le pri odrasli čebeli so imeli vsi vzorci povišano izražanje.

5.1.4 Gen *PPO*

PPO je ključni encim pri melanizacijskih reakcijah in ima pomembno vlogo pri obrambnem mehanizmu čebele. Sodeluje pri obrambi pred mikrobi in pri celjenju ran. Ranjeni členonožci so izpostavljeni mikrobnim polisaharidom, ki aktivirajo proteaze, te pa specifično aktivirajo prepis gena *PPO*, kar je zadnja stopnja v kaskadi Toll. Sledi melanizacija in tujki se ujamejo v kapsule in hemocitne nodule. Ličinke, izpostavljene kumafosu, kažejo višjo stopnjo izražanja gena *PPO*, medtem ko ličinke, izpostavljene fungicidu, nižjo (Gregorc in sod., 2012).

Podatki, ki smo jih dobili, so podobni z ugotovitvami omenjene raziskave. V vseh razvojnih stopnjah čebel, ki so bile izpostavljene kumafosu, smo opazili povišano izražanje, pri vzorcih bube 2 skoraj 2,5–krat. Izpostavitvev proklorazu pa je znižala izražanje gena *PPO*, le pri vzorcih bube matice je bilo ravno obratno.

5.2 IZRAŽANJE V IMUNSKI POTI IMD IN JNK

Imunska pot IMD in JNK je inducirana z gram negativnimi bakterijami. Signalni protein, ki je odgovoren za začetek poti, je *PGRP* (Gupka, 2008).

Pri tej poti smo analizirali gen za protein Basket, ki je del kaskade proteinov, ki vodijo do aktivacije končnih efektorskih proteinov. Analizirali smo tudi gen *hexam*.

5.2.1 GEN *hexam*

Študije so pokazale, da v nasprotju z večino protimikrobnih genov, kjer je število transkripcij ob prisotnosti pesticidov in okužbe z *V. destructor* povečano, imata *hexam* in citokrom (Cyp4g11) znižano izražanje (Gregorc in sod., 2012).

Skladno z ugotovitvami omenjene študije je bila v našem eksperimentu nižja stopnja izražanja gena *hexam* v primerjavi s kontrolno skupino zaznana pri relativno velikem številu vzorcev. Kljub temu vsi naši rezultati niso bili skladni s podatki iz literature. Določeno število vzorcev je imelo izražanje povečano. Najizraziteje je bilo izražanje gena *hexam* povečano pri vzorcu buba matica ob izpostavljenosti proklorazu. Tudi sicer je bilo izražanje vseh testiranih genov v vzorcu buba matica ob izpostavljenosti proklorazu povišano. Podobno smo povišano izražanje vseh testiranih genov opazili tudi pri vzorcih, ki so bili napadeni z *V. destructor*.

5.2.2 Gen *basket*

Basket je ortologni gen JUN NH2-terminalne kinaze (JNK), signalne komponente, ki sproži antimikrobni oz. melanizacijski obrambni mehanizem. Stopnja izražanja gena *basket* je bila ob izpostavljenosti kumafosu in timolu precej znižana (Boncristiani in sod., 2012).

Naši vzorci so imeli v razvojnih stopnjah bube 1 in bube matice izražanje gena *basket* povišano, kar ni v skladu z rezultati študije (Boncristiani in sod., 2012). Večina vzorcev bub matic se ni ujemalo z ugotovitvami drugih raziskav, zato lahko predpostavimo, da so naši rezultati verjetno posledica nekoliko drugače zastavljenega eksperimenta. Različen je bil predvsem protokol izpostavitve čebel pesticidom in število vzorcev, ki je bilo precej večje v raziskavi, ki so jo naredili Boncristiani in sodelavci. Raziskav na bubah matic je zelo malo, zato težko primerjamo naše rezultate z literaturo. Rezultati vzorcev ličink, bub 2 in odraslih čebel pa so podobni rezultatom, ki so jih dobili v omenjeni študiji. Njihovo izražanje je bilo ob izpostavitvi kumafosu v vseh treh primerih znižano.

5.3 IZRAŽANJE V IMUNSKI POTI JAK/STAT

Signalna pot JAK/STAT proži komplementu podobne faktorje in proliferacijo hemocit. To pot sprožijo citokinom podobne molekule, ki jih najdemo v krvnih celicah. Pri *Drosophila melanogaster* protein Upd deluje kot ligand, ki sproži to pot, rezultat pa je fagocitotzna aktivnost hemocit. Nedavno je bilo dokazano, da signalna pot JAK/STAT sodeluje pri protivirusnem odzivu *Drosophila*. To pot poznamo tudi pri *A. Melliferi*, ki jo sproži citokinski receptor *domeless*, ki je homologen genu *Upd* (Evans in sod., 2006).

5.3.1 Gen *domeless*

V raziskavi, ki so jo opravili Richards in sodelavci (2012), so pokazali, da imunska stimulacija vpliva na navade čebel delavk tako, da te postanejo bolj zavzete pri čiščenju zalege in bolj nagnjene k higieni. Dokazali so tudi, da se je stopnja izražanja gena *domeless* po izpostavljenosti *V. destructor* povečala.

V nasprotju s temi ugotovitvami so se v našem poizkusu vrednosti izražanja gena *domeless* pri vzorcih, izpostavljenih *V. destructor*, znižale. Takšen rezultat je nenavaden, posebej zato, ker so se ostali geni pri vzorcih, izpostavljenih *V. destructor*, močneje izražali. Vrednosti vzorcev, ki niso bili izpostavljeni *V. destructor*, so se povišale, kar je skladno s podatki, ki jih zasledimo v literaturi (Richards in sod., 2012). Pri odraslih čebelah je bilo izražanje gena *domeless* povišano ne glede na tip pesticida, ki jim je bil vzorec izpostavljen. Zanimivo je, da je kombinacija kumafosa in prokloraza manj vplivala na izražanje gena kot kumafos sam. Skoraj petkratno povečanje izražanja sem opazil pri vzorcu ličinka 2, ki je bila izpostavljena proklorazu. Podobno se je zgodilo tudi pri vzorcu buba matica. Tu so se močno povišale vrednosti izražanja tudi po izpostavitvi kumafosu.

Potrebno je omeniti, da je bilo število vzorcev, ki smo jih pobrali, glede na podobne študije, majhno. Za bolj zanesljive rezultate bi bilo potrebno izbrati večjo populacijo in narediti več ponovitev. Problem je bil predvsem ta, da nismo imeli v vseh razvojnih stopnjah enako število vzorčnih osebkov. Pri nekaterih smo imeli le en vzorec, kar je zelo malo, za statistično obdelavo podatkov. Tudi to je lahko vzrok, da smo določene rezultate težje pojasnili.

6 SKLEPI

Čebele so v svetovnem gospodarstvu nenadomestljiv člen. Skrbijo za opraševanje številnih kulturnih rastlin, ob tem pa dajejo hrano v obliki apikulturnih proizvodov.

Številni patogeni organizmi napadajo čebelo. *V. destructor* je pršica, ki na čebeli povzroča veliko škode. Proti temu škodljivcu čebelarji uporabljajo vrsto pesticidov, ki jih imenujemo akaricidi. Mednje spada tudi najpogosteje uporabljan kumafos.

Pesticidi se v okolju največkrat uporabljajo za zaščito poljščin. Tip pesticidov, ki se uporabljajo proti glivičnim boleznim, imenujemo fungicidi. Prokloraz je fungicid, ki se v kmetijstvu pogosto uporablja.

Cilj našega dela je bil ugotoviti ali se geni *PGRP*, *abaecin*, *defenzin*, *PPO*, *hexsam*, *basket* in *domeless*, ki so del imunskega odziva čebele, povišano oz. znižano izražajo, če je čebela v njenih različnih razvojnih stopnjah izpostavljena pesticidu kumafosu, proklorazu ali njuni kombinaciji. Pri razvojni stopnji buba 2 smo imeli tudi takšne bube, ki so bile napadene s pršico *V. destructor*. Te vzorce smo obravnavali ločeno, a jih vseeno primerjali z ostalimi.

V preglednici 7. so naši rezultati barvno prikazani. Z zeleno barvo so prikazane čebele oz. njene razvojne stopnje, ki so imele povišano izražanje danega gena glede na tip pesticida. Rezultate treh ponovitev vsakega vzorca smo združili v en rezultat, ki je bil prikazan tudi v grafikonih v poglavju rezultati. Temnejši odtenki prikazujejo močnejše povišanje izražanja. Z modro barvo so prikazane čebele, ki so imele pod enakimi pogoji znižano izražanje istih genov. Temnejša kot je barva, bolj se je izražanje gena znižalo. V primerih, ko ni bilo spremembe, smo te označili z rožnato barvo.

Opazili smo, da je večina vzorcev izkazovala povišanje izražanje preiskovanih genov. V preglednici zato prevladuje zelena barva. 60 % čebel in njihovih razvojnih stopenj je imelo povišano izražanje genov, 36 % je imelo izražanje znižano. Pri 4 % pa nismo opazili sprememb. Sklepamo lahko, da prisotnost pesticidov na čebele vpliva na genetskem nivoju. Ali je to za preživetje čebele dobro ali ne, pa iz našega eksperimenta ne moremo zaključiti.

Deleži se nekoliko razlikujejo glede na razvojne stopnje čebel. Najbolj odstopajo odrasle čebele in Ličinke 1. Odrasle čebele so imele 71 % povišano izražanje, 24 % znižano, pri 5

% pa nismo opazili sprememb. 48 % ličink 1 je imelo gene povišano izražene in 48 % znižano izražene. 4 % ličink ni odstopalo od kontrole.

Naši rezultati so delno skladni s podatki podobnih študij. Vplivi pesticidov na izražanje čebeljih genov so še relativno slabo raziskani. Predvsem vplivi na različne razvojne stopnje pod enakimi pogoji. Precej podatkov v literature najdemo o tem, kako pesticidi vplivajo na določeno razvojno stopnjo. Primerjave med njimi pa nismo zasledili. Veliko je še neznanega. Potrebne bodo nove študije, ki bodo pojasnile predvsem negativne vplive pesticidov na čebele, da bi se jim lahko čim bolj izognili. V našem delu smo pokazali, da pesticidi učinkujejo na čebele na nivoju izražanja genov. Ali je to za njihovo zdravje škodljivo ali ne, pa iz našega dela ne moremo zaključiti. Izsledke te in podobnih raziskav bo potrebno nadgraditi, da bomo lahko tudi na to vprašanje odgovorili.

Preglednica 7. Izražanje genov glede na razvojno stopnjo čebele in tip pesticida

	<i>PGRP</i>					BARVNA LESTVICA GLEDE NA POVIŠANJE OZ. ZNIŽANJE IZRAŽANJA		
	OČ	L2	B1	B2	BM			
kumafos							o	0
prokloraz							↑	0-1x
kum. & prok.							↑	1-2x
k + varoja							↑	2-3x
	<i>hexam</i>						↑	>3x
	OČ	L2	B1	B2	BM		↓	0-0,25x
kumafos							↓	0,25-0,5x
prokloraz							↓	0,5-0,75x
kum. & prok.							↓	>0,75x
kum. + varoja								
	<i>abacein</i>							
	OČ	L2	B1	B2	BM			
kumafos								
prokloraz								
kum. & prok.								
k + varoja								
	<i>basket</i>							
	OČ	L2	B1	B2	BM			
kumafos								
prokloraz								
kum. & prok.								
kum. + varoja								
	<i>defenzin</i>							
	OČ	L2	B1	B2	BM			
kumafos								
prokloraz								
kum. & prok.								
k + varoja								
	<i>PPO</i>							
	OČ	L2	B1	B2	BM			
kumafos								
prokloraz								
kum. & prok.								
kum. + varoja								
	<i>domeless</i>							
	OČ	L2	B1	B2	BM			
kumafos								
prokloraz								
kum. & prok.								
k + varoja								

7 VIRI

- Anderson D.L., Trueman J.W. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24, 3:165-189
- Annoscia D., Piccolo D.F., Nazzi F. 2012. How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *Journal of insect physiology*, 58, 12: 1548-1555
- Bolha L., Dušanić D., Narat M., Oven I. 2012. Comparison of methods for relative Quantification of gene expression using Real-Time PCR. *Acta agriculturae Slovenica*, 100, 2: 97-106
- Bonachristiani H., Underwood R., Schwarz R., Evans J.D., Pettits J., Van Engelsdorp D. 2012. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, 58: 613–620
- Cameron R.C., Duncan E.J., Dearden P.K.. 2013. Biased gene expression in early honeybee larval development. *BMC Genomics*, 14: 903
doi:10.1186/1471-2164-14-903 (januar 2015)
- Chan M.Y.M. 2012. Development and application of honey bee in vitro. M.Sc. Vancouver, The University of British Columbia: 122 str.
https://circle.ubc.ca/bitstream/handle/2429/42148/ubc_2012_spring_chan_manyi.pdf (januar 2015)
- Dušanić D., Bolha L., Narat M., Oven I. 2012. Setting up a gene expression study for tissue cells by method of quantitative Real-Time PCR. *Acta agriculturae Slovenica*, 100, 1: 19-28

Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark D. 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15, 5: 645–656

Francis R.M., Nielsen S.L., Kryger P. 2013. Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies. *PLOS ONE*, 8, 3: e57540
doi: 10.1371/journal.pone.0057540 (januar 2015)

Garrido P.M., Antunez K., Martin M., Porrini M.P., Zunino P., Equaras M.J. 2013. Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *Journal of Insect Physiology*, 59, 1: 113-9

Gregorc A., Evans J.D., Scharf M., Ellis J.D. 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology*, 58: 1042-1049

Gupta D. 2008. Peptidoglycan Recognition Proteins - Maintaining Immune Homeostasis and Normal Development, *Cell Host and Microbe*, 3: 273

Introduction to quantitative PCR. Methods and application guide. 2012. N.p., Agilent technologies: 1-6

Johnson R.M., Dahlgren L., Siegfried B.D., Ellis M.D. 2013. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bee (*Apis mellifera*). *PLOS ONE*, 8, 1: e54092
doi:10.1371/journal.pone.0054092 (januar 2015)

Michael T., Reichart J.M., Hoffman J.A., Royet J. 2001. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414: 756-759

Nakrst M., Smodiš-Škerl M., Gregorc A. Vpliv amitraza in kumafosa na razvoj ličinke v umetnih pogojih vzreje. Kmetijski inštitut Slovenije: 2 str.

http://arhiv.kis.si/datoteke/file/kis/SLO/ZIV/Cebele/Vplivi_akaricidov_na_zalego-Prakticni_prispevek.pdf (januar 2015)

Richards F.J., Holt H.L., Grozinger C.M. 2012. Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). BMC Genomics, 13: 558
doi:10.1186/1471-2164-13-558 (januar 2015)

Rosenkranz P., Aumeier P., Ziegelmann B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. Journal of Invertebrate Pathology, 103: 96-119

Vinggaard A.M., Hass U., Dalgaard M., Andersen H.R., Bonefeld-Jørgensen E., Christiansen S., Laier P., Poulsen M.E. 2006. Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. International Journal of Andrology, 29, 1: 186-92
doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00604 (januar 2015)

Zhang Y., Liu X., Zhang W., Han R. 2010. Differential gene expression of the honey bee *Apis mellifera* and *A. cerana* induced by *Varroa destructor* infection. Journal of insect physiology, 56: 1207-1218

ZAHVALA

Ob koncu, se zahvaljujem svoji mentorici prof. dr. Mojci Narat, ki me je tekom celotnega dela podpirala z nasveti, predlogi, predvsem pa s pozitivno energijo in razumevanjem v trenutkih, ko mi moje izkušnje in znanje niso več zadostovale. Hvala vam za vso pomoč tako pri magistrskem kot diplomskem delu.

Posebno zahvalo bi rad namenil tudi dr. Ivanki Cizelj. Podpirali in pomagali ste mi v vseh aspektih mojega dela, predvsem pa me vodili skozi celotno delo v laboratoriju. Rad bi poudaril, da sem med praktičnim delom pridobil ogromno izkušenj z delom v laboratoriju, ki jih brez vaše pomoči zagotovo ne bi. Velika zasluga za uresničitev moje magistrske naloge gre tudi vam, zato se vam iz srca zahvaljujem.

Rad bi se zahvalil tudi vsem ostalim zaposlenim v laboratoriju, s katerimi sem se srečeval v obdobju mojega dela in so mi s svojim znanjem in izkušnjami pomagali vedno, kadar je bilo to potrebno.

Zahvalil bi se tudi svoji teti Ani Berglez, ki je s svojim obširnimi znanjem slovenskega pravopisa pripomogla k slovnični pravilnosti magistrske naloge.

Ob tako pomembni prelomnici v življenju, ko se ozrem nazaj na vsa leta mojega izobraževanja, pa se težko z besedami zahvalim svojim staršem in sestrji, ki so mi vedno in brezpogojno stali ob strani, me finančno, moralno in strokovno podpirali. Rad vas imam in se vam najlepše zahvaljujem.

PRILOGE

Priloga A

Preglednica 8. Primer postopka izračuna ΔCq reference pri odrasli čebeli

REFERENČNI GENI			AKTIN Cq			RPS5 Cq			RP49 Cq			Geo sredina 1. paralele	2.	3.	GEOMETRIČN A SREDINA	ARITMETIČN A SREDINA	ΔCq (ref.)
VZOREC		OČ I. 1	19,14	18,89	18,36	22,32	21,40	21,99	23,46	23,81	23,68	21,56	21,27	21,22	21,35	20,84	-1,17
		OČ I. 2	18,43	18,4	18,35	20,91	20,60	20,96	23,47	23,42	23,24	20,83	20,72	20,76	20,77		
		OČ I. 3	18,37	18,62	18,63	20,75	20,51	20,65	23,15	22,96	22,86	20,66	20,62	20,65	20,64		
		OČ I. 4	18,00	18,23	18,22	20,66	20,31	20,33	22,91	22,90	22,80	20,42	20,39	20,37	20,39		
		OČ I. 5	18,27	18,27	18,27	20,126	19,87	29,07	22,60	22,61	22,57	20,26	20,17	22,88	21,07		
KONTROLA		OČ IV. 1	18,32	18,10	18,06	20,68	20,22	20,41	22,35	22,97	22,37	20,38	20,34	20,20	20,31	19,67	
		OČ IV. 2	17,51	17,37	17,53	19,55	19,51	19,81	22,11	22,51	22,03	19,63	19,68	19,70	19,67		
		OČ IV. 3	17,68	17,62	17,63	20,40	19,72	20,07	22,29	22,25	22,19	20,03	19,77	19,87	19,89		
		OČ IV. 4	17,12	16,99	17,02	19,70	19,50	19,55	22,28	22,30	22,14	19,59	19,48	19,46	19,51		
		OČ IV. 5	17,05	16,98	17,14	19,15	19,20	19,38	21,84	21,92		19,25	19,26	18,22	18,99		

Priloga B

Preglednica 9. Primer postopka izračuna za ΔCq za *HEXAM* gen pri odrasli čebeli

Cq				POVPREČJE	Cq				POVPREČJE	Cq			
OČ I. 1	30,431	30,206	30,266	31,313	OČ II. 1	29,191	29,357	29,108	31,606	OČ III. 1	29,329	29,312	29,260
OČ I. 2	32,152	32,482	32,379		OČ II. 2					OČ III. 2	27,789	27,666	27,747
OČ I. 3	30,975	31,138	30,786		OČ II. 3					OČ III. 3	28,379	28,518	28,456
OČ I. 4	31,663	31,860	31,989		OČ II. 4	34,473	34,560	34,181		OČ III. 4	30,951	30,987	31,181
OČ I. 5	30,952	31,163	31,259		OČ II. 5	30,995	30,983			OČ III. 5	28,610	28,534	28,510
OČ IV. 1	30,582	30,643	30,555	29,362	OČ IV. 1	30,582	30,643	30,555	29,362	OČ IV. 1	30,582	30,643	30,555
OČ IV. 2	29,359	29,637	29,429		OČ IV. 2	29,359	29,637	29,429		OČ IV. 2	29,359	29,637	29,429
OČ IV. 3	29,440	29,413	29,416		OČ IV. 3	29,440	29,413	29,416		OČ IV. 3	29,440	29,413	29,416
OČ IV. 4	28,530	28,620	28,310		OČ IV. 4	28,530	28,620	28,310		OČ IV. 4	28,530	28,620	28,310
OČ IV. 5	28,766	29,024	28,708		OČ IV. 5	28,766	29,024	28,708		OČ IV. 5	28,766	29,024	28,708
ΔCq (<i>hexam</i>)				-1,951	ΔCq (<i>hexam</i>)				-2,244	ΔCq (<i>hexam</i>)			

Priloga C

Preglednica 10. Koncentracija RNA, izmerjene z napravo NanoVue (NanoVue)TM Plus spectrofotometers GE Healthcare

IME VZORCA	KONCENTRACIJA RNA (ng/μl)	RAZMERJE A260/A280	RAZMERJE A260/A230
odrasla čebela I. 1	1292	2,127	2,350
odrasla čebela I. 2	622,8	2,190	0,979
odrasla čebela I. 3	830,4	2,167	2,021
odrasla čebela I. 4	616,4	2,155	2,030
odrasla čebela I. 5	534	2,267	3,486
odrasla čebela II. 1	600,8	2,262	3,727
odrasla čebela II. 2	467,2	2,317	3,868
odrasla čebela II. 3	254,4	2,446	23,7
odrasla čebela II. 4	580,4	2,271	4,158
odrasla čebela II. 5	242	2,459	10,6
odrasla čebela III. 1	360	2,344	4,327
odrasla čebela III. 2	262,8	2,415	4,212
odrasla čebela III. 3	275,2	2,397	7,560
odrasla čebela III. 4	503,6	2,289	3,063
odrasla čebela III. 5	301,6	2,379	9,921
odrasla čebela IV. 1	246,4	2,464	9,333
odrasla čebela IV. 2	452	2,325	3,046
odrasla čebela IV. 3	414,4	2,323	5,481
odrasla čebela IV. 4	435,6	2,342	3,203
odrasla čebela IV.5	278,8	2,454	4,709

Se nadaljuje

Nadaljevanje

IME VZORCA	KONCENTRACIJ A RNA (ng/μl)	RAZMERJE A260/A280	RAZMERJE A260/A230
ličinka 2 I. varoja	190,4	2,043	1,368
ličinka 2 I. 1	168,8	2,069	1,655
ličinka 2 I. 2	171,2	2,098	1,233
ličinka 2 I. 3	142,2	2,094	0,578
ličinka 2 I. 4	196,8	2,041	1,285
ličinka 2 I. 5	98,8	2,025	1,314
ličinka 2 II. 1	174	2,052	1,680
ličinka 2 II. 2	492,4	2,101	2,055
ličinka 2 III. 1	120,8	2,054	1,194
ličinka 2 III. 2	164,8	2,050	1,702
ličinka 2 IV. varoja	61,2	2,013	0,520
ličinka 2 IV. 1	216	2,061	1,475
ličinka 2 IV. 2	93,6	2,053	1,225
ličinka 2 IV. 3	100,8	2,066	1,626
ličinka 2 IV. 4	113,2	2,051	1,380
ličinka 2 IV. 5	144,8	2,105	1,128

Se nadaljuje

Nadaljevanje

IME VZORCA	KONCENTRACIJA RNA (ng/ μ l)	RAZMERJE A260/A280	RAZMERJE A260/A230
buba 1 I. 1	117,6	2,070	1,690
buba 1 I. 2	190,8	2,083	1,559
buba 1 I. 3	289,6	2,111	2,034
buba 1 I. 4	221,6	2,075	1,644
buba 1 I. 5	223,6	2,102	2,218
buba matice 1 II. 1	51,2	2,065	1,041
buba matice 1 II. 2	246	2,085	1,627
ličinka matice 2 II. 1	1098	2,095	2,388
ličinka matice 2 II. 2	942	2,112	2,386
ličinka matice 2 II. 3	3408	2,058	2,235
ličinka matice 2 II. 4	2626	2,114	2,302
ličinka matice 2 II. 5	1173	2,097	2,405
buba 1 III. 1	51,2	1,969	1,347
buba 1 III. 2	222	2,048	2,256
buba 1 III. 3	197,6	2,041	2,176
buba 1 III. 4	129,2	n.p	n.p
buba 1 IV. 1	77,6	1,980	1,865
buba 1 IV. 2	110	1,964	2,218
buba 1 IV. 3	166,8	2,044	1,283
buba 1 IV. 4	334	2,087	2,227
buba matice 1 IV. 1	671,2	2,097	2,277
buba matice 1 IV. 2	1191	2,090	2,417
buba matice 1 IV. 3	1154	2,094	2,400
buba matice 1 IV. 4	2346	n.p	n.p

Priloga D

Preglednica 11. Vrednosti E in učinkovitost v %, izračunane iz naklona umeritvenih krivulj

GEN	Naklon premice	VREDNOST E	Učinkovitost %
E referenčna	-3,255	2,029	103
<i>RP49</i>	-3,245	2,033	103
<i>RPS5</i>	-3,402	1,968	97
<i>HEXAM</i>	-3,448	1,950	95
<i>PPO</i>	-3,414	1,963	96
<i>DEFENZIN</i>	-3,374	1,979	98
<i>BASKET</i>	-3,339	1,993	99
<i>ABAECIN</i>	-3,255	2,029	103
<i>PGRP</i>	-3,530	1,920	92
<i>DOMELESS</i>	-3,323	2,000	100

Priloga E

Preglednica 12. Vrednosti ΔC_q vzorcev glede na gen

Vzorec gen	OČ I	OČ II	OČ III	L2 I	L2 II	L2 III	B1 I	B1 III	B2 I	B2 III	B2 III+ V	BM1 II	BM1 III
<i>hexam</i>	-1,951	-2,244	0,347	0,921	0,396	-0,363	-0,718	-0,521	-2,408	-2,927	0,074	1,441	-0,045
<i>defenzin</i>	-0,160	-0,642	1,158	0,816	-0,530	-2,807	0,222	-0,546	0,706	-0,522	1,711	-0,980	1,423
<i>PPO</i>	-0,684	-2,256	0,371	-1,944	-2,120	0,749	-1,331	0,400	-0,380	-1,208	-0,214	-0,082	-0,613
<i>PGRP</i>	0,020	-1,411	1,555	2,050	-0,741	-0,329	-2,249	-0,097	-0,480	-1,573	0,091	-1,788	-0,847
<i>basket</i>	-1,193	-2,092	-0,571	-0,833	-1,814	-0,459	-0,514	0,467	-1,355	-3,776	-0,175	0,252	0,626
<i>abaecin</i>	-0,539	-0,110	0,506	0,731	-0,461	-1,951	-0,377	0,125	-1,225	-0,747	-0,184	-1,712	0,433
<i>domeless</i>	-0,857	0,420	0,229	-0,207	0,991	-0,036	-0,492	-1,416	-1,336	-1,040	-1,602	0,760	1,540

Priloga F

Preglednica 13. ΔC_q referenčne vrednosti vzorcev

Vzorec referenca	OČ I	OČ II	OČ III	L2 I	L2 II	L2 III	B1 I	B1 III	B2 I	B2 III	B2 III+ V	BM1 II	BM1 III
ΔC_q ref.	-1,170	-1,577	-0,425	0,069	-1,298	-0,057	-1,210	0,093	-0,450	-2,336	-0,486	-1,059	-0,350

Priloga G

Preglednica 14. Izražanje gena *PGRP* v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom.

<i>PGRP</i>	ličinka 2	buba 1	buba 2	buba matica 2	odrasla čebela
kontrola	1	1	1	1	1
kumafos+prokloraz	3,627	0,543	1,005		2,319
prokloraz	1,545			0,659	1,215
kumafos	0,841	0,878	1,870	0,738	3,727
kumafos + v			1,497		

Priloga H

Preglednica 15. Vrednosti signifikance za gen *PGRP* (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti)

signifikanca	OČ I.	OČ II.	OČ III.	OČ IV.		signifikanca	L2 I.	L2 II.	L2 III.	L2 IV.
OČ I.		0,024	0,002	0,003		L2 I.		0,199	0,049	0,004
OČ II.			<0,001	0,812		L2 II.			0,001	0,017
OČ III.				0		L2 III.				0,805
signifikanca	B1 I.	B1 III.	B1 IV.			signifikanca	B2 I.	B2 III.	B2 III.+V	B2 IV.
B1 I.		0,176	0,037			B2 I.		<0,001	<0,001	0,906
B1 III.			0,453			B2 III.			<0,001	0,004
B1 IV.						B2 III.+V				0,003
signifikanca	BM1 II.	BM1 III.	BM1 IV.							
BM1 II.		0,803	0,05							
BM1 III.			0,076							

Priloga I

Preglednica 16. Izražanje gena *Abaecin* v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom

<i>abaecin</i>	ličinka 2	buba 1	buba 2	buba matica 2	odrasla čebela
kontrola	1	1	1	1	1
kumafos+prokloraz	1,597	1,803	0,578		1,562
prokloraz	1,808			0,63	2,822
kumafos	0,262	1,022	3,076	1,740	1,932
kumafos + v			1,238		

Priloga J

Preglednica 17. Vrednosti signifikance za gen *Abaecin* (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti)

signifikanca	OČ I.	OČ II.	OČ III.	OČ IV.	signifikanca	L2 I.	L2 II.	L2 III.	L2 IV.
OČ I.		0,277	0,314	0,186	L2 I.		0,867	<0,001	0,398
OČ II.			0,034	<0,001	L2 II.			0,002	0,612
OČ III.				0,820	L2 III.				<0,001
signifikanca	B1 I.	B1 III.	B1 IV.		signifikanca	B2 I.	B2 III.	B2 III.+V	B2 IV.
B1 I.		0,032	0,204		B2 I.		0,011	<0,001	0,117
B1 III.			0,492		B2 III.			0,403	0,481
B1 IV.					B2 III.+V				0,111
signifikanca	BM1 II.	BM1 III.	BM1 IV.						
BM1 II.		0,03	0,084						
BM1 III.			0,436						

Priloga K

Preglednica 18. Izražanje gena *Defenzin* v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom

<i>defenzin</i>	ličinka 2	buba 1	buba 2	buba matica 2	odrasla čebela
kontrola	1	1	1	1	1
kumafos+prokloraz	1,661	2,738	2,225		2,052
prokloraz	1,745			1,083	1,969
kumafos	0,153	0,645	3,655	3,385	2,977
kumafos + v			4,535		

Priloga L

Preglednica 19. Vrednosti signifikance za gen *Defenzin* (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti)

signifikanca	OČ I.	OČ II.	OČ III.	OČ IV.	signifikanca	L2 I.	L2 II.	L2 III.	L2 IV.
OČ I.		0,341	0,598	<0,001	L2 I.		0,709	<0,001	0,306
OČ II.			0,156	0,005	L2 II.			0,002	0,543
OČ III.				<0,001	L2 III.				<0,001
signifikanca	B1 I.	B1 III.	B1 IV.		signifikanca	B2 I.	B2 III.	B2 III.+V	B2 IV.
B1 I.		0	0,051		B2 I.		0,035	0,002	<0,001
B1 III.			<0,001		B2 III.			<0,001	0,213
B1 IV.					B2 III.+V				<0,001
signifikanca	BM1 II.	BM1 III.	BM1 IV.						
BM1 II.		0,117	0,519						
BM1 III.			0,274						
BM1 IV.									

Priloga M

Preglednica 20. Izražanje gena *PPO* v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom

<i>PPO</i>	ličinka 2	buba 1	buba 2	buba matica 2	odrasla čebela
kontrola	1	1	1	1	1
kumafos+prokloraz	0,257	0,959	1,064		1,443
prokloraz	0,500			2,000	0,666
Kumafos	1,726	1,226	2,311	0,847	1,736
kumafos + v			1,221		

Priloga N

Preglednica 21. Vrednosti signifikance za gen *PPO* (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti)

signifikanca	OČ I.	OČ II.	OČ III.	OČ IV.	signifikanca	L2 I.	L2 II.	L2 III.	L2 IV.
OČ I.		<0,001	0,839	0,082	L2 I.		0,0453	<0,001	<0,001
OČ II.			<0,001	0,003	L2 II.			0,017	0,068
OČ III.				0,189	L2 III.				0,510
signifikanca	B1 I.	B1 III.	B1 IV.		signifikanca	B2 I.	B2 III.	B2 III.+V	B2 IV.
B1 I.		0,121	0,131		B2 I.		0,134	0,783	0,328
B1 III.			0,893		B2 III.			0,090	0,699
B1 IV.					B2 III.+V				0,171
signifikanca	BM1 II.	BM1 III.	BM1 IV.						
BM1 II..		0,027	0,269						
BM1 III.			0,186						

Priloga O

Preglednica 22. Izražanje gena *Hexam* v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom

<i>Hexam</i>	ličinka 2	buba 1	buba 2	buba matica 2	odrasla čebela
Kontrola	1	1	1	1	1
kumafos+prokloraz	1,761	1,457	0,725		0,622
Prokloraz	3,263			5,534	0,682
Kumafos	0,818	0,661	0,261	1,243	1,703
kumafos + v			1,482		

Priloga P

Preglednica 23. Vrednosti signifikance za gen *Hexam* (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti)

signifikanca	OČ I.	OČ II.	OČ III.	OČ IV.		signifikanca	L2 I.	L2 II.	L2 III.	L2 IV.
OČ I.		0,167	0,014	0,026		L2 I.		0,214	0,135	0,276
OČ II.			0,006	0,006		L2 II.			0,013	0,001
OČ III.				0,254		L2 III.				0,023
signifikanca	B1 I.	B1 III.	B1 IV.			signifikanca	B2 I.	B2 III.	B2 III.+V	B2 IV.
B1 I.		0,011	0,839			B2 I.		0,800	<0,001	<0,001
B1 III.			0,020			B2 III.			<0,001	<0,001
B1 IV.						B2 III.+V				0,021
signifikanca	BM1 II.	BM1 III.	BM1 IV.							
BM1 II.		<0,001	<0,001							
BM1 III.			0,849							
BM1 IV.										

Priloga R

Preglednica 24. Izražanje gena *Basket* v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom

<i>basket</i>	ličinka 2	buba 1	buba 2	buba matica 2	odrasla čebela
Kontrola	1	1	1	1	1
kumafos+prokloraz	0,536	1,651	0,540		1,005
Prokloraz	0,717			2,516	0,721
Kumafos	0,759	1,292	0,386	1,973	0,911
kumafos + v			1,250		

Priloga S

Preglednica 25. Vrednosti signifikance za gen *Basket* (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti)

signifikanca	OČ I.	OČ II.	OČ III.	OČ IV.		signifikanca	L2 I.	L2 II.	L2 III.	L2 IV.
OČ I.		0,148	0,597	0,996		L2 I.		0,919	0,531	<0,001
OČ II.			0,386	0,015		L2 II.			0,769	0,004
OČ III.				0,404		L2 III.				0,004
signifikanca	B1 I.	B1 III.	B1 IV.			signifikanca	B2 I.	B2 III.	B2 III.+V	B2 IV.
B1 I.		0,586	0,576			B2 I.		0,075	0,001	0,101
B1 III.			0,93			B2 III.			<0,001	0,006
B1 IV.						B2 III.+V				0,141
signifikanca	BM1 II.	BM1 III.	BM1 IV.							
BM1 II.		0,472	0,081							
BM1 III.			0,177							

Priloga T

Preglednica 26. Izražanje gena *domeless* v prisotnosti kumafosa in/ali prokloraza ter varoje s kumafosom

<i>Domeless</i>	ličinka 2	buba 1	buba 2	buba matica 2	odrasla čebela
Kontrola	1	1	1	1	1
kumafos+prokloraz	0,832	1,708	0,575		1,308
Prokloraz	4,784			3,472	1,315
Kumafos	1,017	0,372	2,649	3,500	1,569
kumafos + v			0,496		

Priloga U

Preglednica 27. Vrednosti signifikance za gen *Domeless* (z zeleno so označene statistično značilne vrednosti)

signifikanca	OČ I.	OČ II.	OČ III.	OČ IV.		signifikanca	L2 I.	L2 II.	L2 III.	L2 IV.
OČ I.		0,013	0,764	0,737		L2 I.		<0,001	0,580	0,146
OČ II.			0,004	<0,001		L2 II.			0,021	<0,001
OČ III.				0,271		L2 III.				0,57657
signifikanca	B1 I.	B1 III.	B1 IV.			signifikanca	B2 I.	B2 III.	B2 III.+V	B2 IV.
B1 I.		<0,001	0,536			B2 I.		0,050	0,815	0,204
B1 III.			<0,001			B2 III.			0,064	0,247
B1 IV.						B2 III.+V				0,203
signifikanca	BM1 II.	BM1 III.	BM1 IV.							
BM1 II.		0,895	0,441							
BM1 III.			0,421							