

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Zootehnika, živinoreja, vzreja

2. Šifra projekta:

V4-0484

3. Naslov projekta:

Zmanjševanje vpliva spremenjenih klimatskih pogojev in delovanja patogenih in nepatogenih dejavnikov na družine kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*)

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Zmanjševanje vpliva spremenjenih klimatskih pogojev in delovanja patogenih in nepatogenih dejavnikov na družine kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*)

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Reducing the influences of changed climatic conditions and effect of pathogenic and nonpathogenic factors on carniolan honeybee colonies (*Apis mellifera carnica*)

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

kranjska čebela (*Apis mellifera carnica*), reja, odmiranje, patologija

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

carniolan bee (*Apis mellifera carnica*), breeding, mortality, pathology

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Kmetijski inštitut Slovenije

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

6. Sofinancer/sofinancerji:

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, RS

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

10448

Aleš Gregorc

Datum: 13. 9. 2010

Podpis vodje projekta:

Prof. dr. Aleš Gregorc

Podpis in žig izvajalca:

Doc. dr. Andrej Simončič

II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- ☒ a) v celoti
☐ b) delno
☐ c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- ☐ a) da
☒ b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

Obseg projektnega raziskovanja

V okviru projekta smo imeli zastavljene cilje zagotavljanja boljših pogojev ohranjanja čebeljih družin, ugotavljanja vpliva patogenih in nepatogenih dejavnikov na posamezno čebelo in na čebeljo družino, ter ugotavljati vplive na preživetje družin v vseh letnih obdobjih. Pri tem smo dali poudarek ugotavljanju prisotnosti spor *Nosema ceranae* in čebeljih virusov v čebeljih družinah. Poleg tega je bil cilj projekta pridobiti ustrezne raziskovalne rezultate za pristojno ministrstvo, za čebelarje in Veterinarsko upravo.

V raziskavi smo uporabili laboratorijske raziskovalne metode predvsem v zvezi z ugotavljanjem patogenov v vzorčenem materialu in ugotavljanje razvoja družin v poskusnem čebelnjaku. Nadalje so bile v okviru programa predvidene raziskave v poskusnih družinah, in sicer analiza prehranskega režima in ugotavljanje vpliva na čebeljo družino. Pri tem je bilo predvideno spremljanje vpliva dodajanja hrane in proučevanja vpliva kakovosti hrane na razvoj čebel, kjer se je spremljalo preživetje družin in obseg zalege, izvajalo se je determinacijo spor *Nosema*, dokazovalo čebelje viruse in ugotavljala stopnja napadenosti s pršico *Varroa destructor*. V laboratorijskih poskusih pa je bilo predvideno raziskovanje okužbe delavk s sporami *Nosema* v laboratorijskih pogojih. Pri tem je bil poudarek na spremljanju razvoj okužbe s sporami *Nosema*, življenjska doba čebel. V načrtu raziskav je bila uporaba umetne vzreje čebelje zalege v inkubatorju in izvedba imunohistoloških preiskav.

Program raziskovalnega projekta je predvideval tudi razširjanje rezultatov. V domači in tuji strokovni literaturi in na različnih strokovnih in znanstvenih srečanjih smo poročali o izvedenih posameznih nalogah iz projekta.

Metodološko teoretični opis raziskovanja in pridobljeni rezultati

V letu 2009 in 2010 smo izvedli poskuse v čebeljih družinah, ki smo jih spremljali od poletja 2009 do spomladi 2010. V laboratoriju smo opazovali tretirane delavke v kletkah oziroma v čebelji družini in umetno vzrejali čebeljo zalego v inkubatorju. Raziskave smo razdelili na tri sklope:

- A) Poskusi v čebeljih družinah:
 - Vpliv dodajanja hrane v brezpašnem obdobju
- B) Poskusi v kletkah:
 - Poskus okužbe s sporami *Nosema ceranae*
- C) Umetna vzreja čebelje zalege:
 - Ugotavljanje vpliva pesticidov na razvoj zalege v laboratorijskih pogojih

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

A) POSKUSI V ČEBELJIH DRUŽINAH

Vpliv dodajanja hrane v brezpašnem obdobju

1. Material in metode

V poskusu smo 15 izenačenih čebeljih družin oskrbovali z različnimi dodatki hrane. V vsaki skupini je bilo 5 družin. Družine v prvi skupini so prejele po 1 kilogram pogače Apifonda®, z dodatkom 30 g cvetnega prahu in 1 g vitaminov Muvisel®; družine druge skupine so dobile po kilogram pogače Apifonda® brez dodatkov, družine v tretji skupini pa dodatka hrane niso dobile. Družinam smo hrano prvič dodali 20. 7., nato še 3. 8. in 24. 8. 2009. Vzoredno smo v vsaki skupini družin dvema maticama, per os, dodali spore Nosema ceranae, eni matici pa spore N. apis. Po dve matici v vsaki skupini spor nista dobili in so bile kontrolne. Matice v poskusnih skupinah smo individualno hranili s pomočjo mikropipete. Prejele so po 3 µl suspenzije s 40,000 sporami N. apis oziroma 60,000 sporami N. ceranae. Družine smo v jeseni pripravili na zimsko obdobje tako, da smo jih nakrmili s sladkorno raztopino v razmerju 1:1.

Čebele delavke smo v letu 2009 vzorčili štiri krat zapored vsak mesec, nato pa smo pri vzorčenih delavkah s pomočjo mikroskopa ugotavljali prisotnost spor, z uporabo hemocitometra pa določali njihovo število. Iztrebek matic smo prav tako preiskali na prisotnost spor. Vzorce smo uporabili tudi za determinacijo N. apis in N. ceranae ter ugotavljali prisotnost štirih čebeljih virusov, in sicer ABPV (Virus akutne paralize čebel), BQCV (Virus črnih matičnikov), DWV (Virus deformiranih kril) in SBV (Virus mešičkaste zalege). Pri vseh družinah smo v obdobju izvajanja poskusa spremljali obseg zalege in odpad varoj na podnici panja.

Ugotavljali smo:

- preživetje družin v brezpašnem obdobju
- obseg zalege,
- prisotnost in število spor Nosema sp. pri poskusnih družinah,
- determinacija N. apis/ceranae,
- prisotnost virusov (ABPV, BQCV, DWV, SBV),
- odpad varoj pred in po zatiranju z akaricidi.

2. Rezultati

2.1. Preživetje družin v brezpašnem obdobju in vpliv dodajanja hrane

Čebelje družine, ki so v pričetku brezpašnega obdobja prejele pogače, so v celoti uspešno preživele zimsko obdobje. V skupini, ki je poleg pogače prejela še vitamine in cvetni prah, so od petih preživele tri družine, medtem ko je v skupini, ki ni prejela nadomestkov, zimo preživela le ena od petih družin.

2.2. Obseg zalege

V spomladanskem obdobju 2009 pred dodajanjem hrane so imele največjo površino zalege družine št. 1, 7 in 10. Najslabši razvoj so kazale družine št. 14, 3, 4, 11 in 12. Konec avgusta, po zadnjem, tretjem dodajanju hrane, je imela največji obseg zalege družina št. 9 (dodatek pogače), najslabši razvoj pa družina, ki ni prejela hrane, št. 3.

Spomladi 2010 sta se najbolje razvijali družini št. 9 in 10, ki sta prejemale pogačo, najslabši razvoj pa je bil pri družini brez dodatka hrane (št. 1), vendar tudi pri družini št.

13, ki je prejela hrano s tremi dodatki (cvetni prah, pogačo in vitamine) in pri družini št. 6 (pogača). Mesec dni pozneje je največji obseg zalege imela družina št. 14 (cvetni prah, pogača, vitamini).

2.3. Determinacija spor *N. apis/ceranae*

Determinacijo spor *Nosema* spp. smo opravili z molekularno metodo, PCR. Pri vseh družinah smo ugotovili prisotnost *N. ceranae*. Z enako metodo smo pregledali tudi iztrebke matic, ki pa so bili negativni. Okužba s spori *N. apis* pri maticah ni uspela, saj spor v iztrebku nismo identificirali.

2.4. Prisotnost virusov (ABPV, BQCV, DWV, SBV)

V vzorcih delavk, ki smo jih vzorčili konec avgusta 2009, so bili v skupini, ki je prejela pogačo, v skoraj vseh družinah prisotni vsi štirje virusi (DWV, SBV, ABPV in BQCV), pri maticah sta bila prisotna le dva (DWV in SBV). Viruse smo ugotavljali z molekularno metodo PCR. V skupini, ki je prejela tri dodatke (cvetni prah, pogača in vitamini), je bilo prisotnih manj virusov v posamezni družini, medtem ko so bile vse matice iz teh družin okužene z DWV in SBV. V skupini, ki ni dobila dodatne hrane, so bili v družinah prisotni trije virusi (DWV, SBV in BQCV), pri maticah pa DWV in SBV.

V drugem letu izvajanja projekta letu smo vzorčili spomladi delavke in matice v družinah, ki so preživele zimsko obdobje. Ugotavili smo prisotnost treh virusov (SBV, ABPV in BQCV) pri večini družin, ne glede na dodajanje hrane. Prav tako so trije virusi prisotni pri maticah, kjer pa ni bilo okužbe z virusom črnih matičnikov (BQCV).

2.5 Število spor *Nosema* sp. pri poskusnih družinah

Pri pregledu zadkov delavk smo ugotovili, da je bilo pri okuženih družinah največ spor pri delavkah, ki v brezpašnem obdobju niso prejele dodatne hrane, čeprav je bilo visoko število spor ugotovljenih tudi pri delavkah, ki niso bile okužene in niso prejele hrane. V avgustu se število spor pri okuženih družinah ni povečalo, obratno pa se je povečalo pri neokuženih, predvsem pri družinah, ki niso prejele hrane. V novembru se je število spor povečalo pri vseh družinah. Zimsko obdobje je preživel osem družin, od tega štiri niso bile okužene in so prejele hrano v preteklem letu. Mesec dni kasneje so bile spore v manjšem številu prisotne le še pri dveh družinah, ki smo ju prejšnje leto oskrbovali z nadomestno hrano.

2.6. Odpad varoj pred in po zatiranju z akaricidi

V začetku avgusta 2009 smo v čebelje družine vstavili trakove akaricida Apivar® (amitraz). Oktobra smo pričeli izvajati zimsko zatiranje s pripravkom Antivar (amitraz) in postopek ponovili dvakrat. Po zadnjem zimskem zatiranju je na dan odpadlo od nič do enajst odraslih pršic *Varroa destructor*. Družina, ki je prejela nadomestke hrane (pogača), je imela največje število varoj po zadnjem zatiranju, vendar je uspešno preživela zimsko obdobje.

3. Zaključek

Iz pridobljenih rezultatov ugotavljamo, da dodajanje hrane pozitivno vpliva na razvoj družin v brezpašnem obdobju. V jeseni so družine dovolj živalne, da uspešno preživijo dolgo zimsko obdobje, spomladi pa so v stanju, ki omogoča hiter razvoj.

Okužba s sporami *Nosema* je bila manj pogosta v močnejše razvitih družinah, ki so dobile dodano hrano, bodisi z dodatki ali brez. V zimskem obdobju pa vpliv prehrane na verjetnost okužbe ni bil več izrazit, saj je v tem obdobju prišlo do medsebojnega okuževanja med delavkami. Prehrana čebeljih družin ima posredni vpliv na razvoj nosemaвости, pogojno vpliva tudi na sposobnost in uspešnost preživetja zimskega obdobja. Prehranski dodatki niso pokazali posebnega vpliva na pojavljanje virusov, saj so bili virusi prisotni v vseh poskusnih skupinah, tako pri delavkah kot pri maticah.

B) POSKUSI V KLETKAH

Poskus okužbe s sporami *Nosema ceranae* pri delavkah v kletkah

1. Material in metode

Poskus v kletkah je potekal na osnovi okužbe delavk z znano koncentracijo spor *N. ceranae* v dveh različnih časovnih obdobjih (spomladanskem: maj – junij; jesenskem: september - oktober). V posamezni skupini je bilo vključenih 30 novoizleženih delavk, ki smo jim aplicirali spore *N. ceranae*. Prisotnost spor *N. ceranae* v pripravljene hrani smo preverili z molekularno metodo PCR.

V prvem poskusu v obdobju maj – junij smo en dan starim delavkam p/o inokulirali 3 µl suspenzije spor, vsaka skupina delavk je prejela naslednjo koncentracijo spor:

1. skupina 80,000 spor/čebelo;
2. skupina 53,000 spor/čebelo;
3. skupina 40,000 spor/čebelo;
4. skupina 26,000 spor/čebelo,
5. skupina: kontrolna; sladkorna raztopina.

Drugi del poskusa v obdobju september – oktober je bil zastavljen enako, suspenzija spor v hrani (3 µl/delavko) je bila glede na skupino naslednja:

1. skupina 62,000 spor/čebelo;
2. skupina 41,000 spor/čebelo;
3. skupina 31,000 spor/čebelo;
4. skupina 21,000 spor/čebelo),
5. skupina: kontrolna; sladkorna raztopina.

Vzorčenje

Delavkam v poskusu maj – junij smo 28. maja aplicirali znano koncentracijo spor *Nosema*, nato smo delavke 6-krat vzorčili za histološke preiskave in določali prisotnost spor v srednjem črevesu. Sposobnost preživetja delavk je bila 8 dni po inokulaciji, ko smo tudi zaključili z vzorčenjem.

23. septembra smo delavkam inokulirali spore, nato pa smo delavke 6-krat vzorčili za histološke preiskave in določali število spor. Delavke so živele 15 dni po tem, ko so bile inokulirane s sporami.

Ugotavljali smo:

- število spor pri okuženih delavkah,

- dolgoživost okuženih delavk v laboratorijskih pogojih,
- pojav celične smrti in lokalizacija stresnih proteinov (Hsp) v celicah srednjega črevesa.

2. Rezultati

2.1 Določanje števila spor pri delavkah

Delavke, okužene v maju, so imele nad 1.000.000 spor *Nosema* 5. dan, delavke, okužene konec septembra, pa 12. dan. V vseh okuženih delavkah, ki smo jih vzorčili v začetku junija, so bile 8. dan po okužbi prisotne spore, kar smo preverili s svetlobnim mikroskopom in s pomočjo hemocitometra določili število spor pri posamezni delavki.

Največje število spor je imela delavka iz tretje ($14,15 \times 10^6$) in četrte skupine ($6,9 \times 10^6$). Pri vzorčenih delavkah iz skupine, ki smo jim aplicirali največ spor med poskusnimi skupinami, $0,8 \times 10^5$ spor, smo 8. dan po okužbi ugotovili $3,7 \times 10^6$ in $0,8 \times 10^6$ prisotnih spor. Pri vzorčenih delavkah iz poskusa, ki smo ga opravljali v obdobju september – oktober, pa smo ugotovili bistveno večjo prisotnost spor v skupini, ki so prejele največje število spor. Iz te skupine je bilo pri prvi delavki ugotovljeno $23,65 \times 10^6$ spor, pri drugi pa $14,90 \times 10^6$ spor, iz druge skupine smo pri prvi delavki ugotovili $1,25 \times 10^6$ spor in pri drugi 8×10^6 spor. Pri delavkah iz skupine, ki smo jih inokulirali z najmanjšo količino spor, smo pri zadnjem vzorčenju ugotovili $0,05 \times 10^6$ in $0,10 \times 10^6$ prisotnih spor.

2.2 Dolgoživost okuženih delavk v laboratorijskih pogojih

Delavke so v kletkah v umetnih pogojih živele 8 dni v spomladanskem obdobju okužbe, v jesenskem obdobju so živele dalj časa, do 15 dni.

2.3 Pojav celične smrti in lokalizacija stresnih proteinov (Hsp) v celicah srednjega črevesa.

Pri raziskavah smo uporabljali tehnike ApopTag in "In Situ Cell Death detection Kit" (ISCDDK), s katerimi smo določali nivo celične smrti, ter stresne proteine Hsp 70 in Hsp 90, s katerimi smo lokalizirali aktivnost v celicah srednjega črevesa delavk v spomladanskem obdobju.

3. Zaključek

V poskusih je uspela umetna okužba čebel s sporami *N. ceranae*. Pridobljene izkušnje pri individualni inokulaciji spor nam bodo koristile pri nadaljnjih raziskavah na tem področju. Ugotovili smo tudi razlike v dovzetnosti spomladanskih in jesenskih čebel, saj se je plesen v gostitelju razvijala hitreje spomladi kot jeseni, razvoj pa je po pričakovanju odvisen od količine inokulata. Preživetvena sposobnost delavk v kletkah je bila jeseni daljša kot pri spomladanskih čebelah. Tudi v laboratorijskih pogojih se odraža dolgoživost zimskih čebel, ki so izležene jeseni. Zato bi z ustreznim zmanjševanjem prisotnosti kužnega materiala v panju lahko prispevali k večji dolgoživosti čebel v zimskem obdobju. Na ta način bi lahko vplivali tudi na preživetje čebelje družine v celoti. Področje dolgoživosti čebel in vpliv na preživetje družin bo potrebno še natančneje raziskati. Poznavanje teh lastnosti je izjemnega pomena za našo populacijo kranjske čebele v kontinentalnem klimatskem območju.

Poskus okužbe s sporami *Nosema ceranae* pri delavkah v čebelji družini

1. Material in metode

V posamezni skupini je bilo okoli 100 novoizleženih čebeljih delavk. Glede na stopnjo dodanih spor v suspenzijo hrane smo delavke razvrstili v 3 skupine. Delavke v prvi skupini smo inokulirali s 3 μ l suspenzije, ki je vsebovala 13,800 spor *N. ceranae*, delavkam v drugi skupini pa 3,450 x 10⁴ spor *N. ceranae*. Tretja kontrolna skupina ni bila tretirana, delavke so prejele le sladkorno raztopino.

Delavke smo označili z markerjem in jih dodali v pravilno razvite čebelje družine. Prisotnost spor *N. ceranae* v hrani smo potrdili s pomočjo molekularne metode PCR.

Vzorčenje

Vzorčili smo vsak drugi ali tretji dan do 23. dne. Pri posamezni delavki, iz vsake skupine po tri, smo v srednjem črevesu ugotavljali prisotnost spor s pomočjo svetlobnega mikroskopa pri 400 x povečavi, s hemocitometrom pa določili njihovo število. Za imunohistološke preiskave smo delavki iz vsake skupine preparirali srednje črevo, ga shranili v 10 % formalinu, dehidrirali v seriji alkoholov (70, 90, 100%), v ksilenu in zalili v parafinski vosek. Z mikrotomom smo narezali 5 μ m tanke rezine, jih položili v toplo kopel, pritrdili na objektna stekla in posušili. V nadaljevanju smo izvedli imunohistokemične preiskave, s katerimi smo ugotavljali stopnjo celične smrti v celicah srednjega črevesa in opisali aktivnost in lokalizacijo stresnih proteinov ali "Heat shock proteins" (Hsp 70 in Hsp 90).

Ugotavljali smo:

- število spor pri okuženih delavkah,
- pojav celične smrti in lokalizacija stresnih proteinov (Hsp) v celicah srednjega črevesa.

2. Rezultati

2.1 Število spor pri okuženih delavkah

Pri vseh vzorcih delavk iz prve in druge skupine smo ugotovili prisotnost spor *Nosema*. Ugotovili smo, da so imele delavke v ventrikulu 1.000.000 spor 7. dan po začetni inokulaciji. Kasneje nismo ugotovili opaznih razlik med skupinama delavk, ki so bile inokulirane z različno količino spor. Največji nivo okužbe smo ugotovili 23. dan v prvi skupini, kjer je bilo v ventrikulu delavke ugotovljenih 56,35 x 10⁶ spor.

2.2 Pojav celične smrti in lokalizacija stresnih proteinov (Hsp) v celicah srednjega črevesa

3. Ugotovitve

V raziskavi smo uporabili dva kita za določanje celične smrti. V okuženih ličinkah smo ugotovili povečano celično odmiranje v srednjem črevesu. Posledica okužbe se kaže v povečanem nekrotičnem odmiranju epitelijskega tkiva, ki je ireverzibilen proces in v primeru večjega obsega prizadetosti povzroči tudi odmrtnost čebele. Spremembe so bile v visoko prizmatičnih epitelnih celicah in v sloju regenerativnih celic. Zaradi prizadetosti teh celic

je zmanjšana sposobnost obnavljanja epitelijskega tkiva. Tudi lokalizacija heat shock proteinov (Hsp), ki je bila manj izrazita v okuženem tkivu, je značilna za tkiva, ki so pod vplivom delovanja zunanjih dejavnikov. Aktivnost Hsp je namreč izrazita v celicah zdravega tkiva, in ima funkcijo zmanjševanja delovanja negativnih vplivov iz okolja in lahko prispeva k zmanjševanju odmrtnosti celic. Naši rezultati kažejo na subklinične spremembe v srednjem črevesu, ki se lahko pojavijo v začetni fazi okužbe ali delovanja drugih dejavnikov, ne izključuje pa možnosti razvoja sprememb v smeri degeneracije tkiva in odmrtnosti čebele.

C) UMETNA VZREJA ČEBELJE ZALEGE

Ugotavljanje vpliva pesticidov na razvoj zalege v laboratorijskih pogojih

Odmiranje čebeljih družin, se začne s slabenjem čebelje družine. Odmiranje je povezano z nekaterimi dejavniki (npr. prisotnost varoj, noseme, čebeljih virusov, uporaba akaricidov in drugih učinkovin v panju ali v okolici). Čebelar večjo zastupitev opazi na osnovi povečanega odmrtnosti delavk pred in v panju z značilnimi znaki, kot je sprožen rilček. Kadar pa čebelja družina slabi postopno, kar se kaže v zmanjševanju števila delavk in njihovim hitrejšim odmiranjem, je možno, da se proces začne že v razvojni fazi čebel. Cilj naših poskusov je bil ugotoviti vplive različnih dejavnikov na razvoj čebelje zalege. Za ta namen smo uporabili metodo umetne vzreje zalege v inkubatorju.

1. Material in metode

1.1 Vzrejni material

Za pridobivanje primerne vzrejne materiala, ličink, smo uporabili pravilno razvito čebeljo družino na sedmih AŽ satih. V matični izolator smo vstavili prazen, vendar že uporabljen sat, iz katerega so se že polegile mladice. Sat smo dan pred namestitvijo matice postavili v izolator in ga dodali čebelji družini, da so ga zasedle delavke. Naslednji dan smo matico vstavili v izolator za okoli deset ur, da je zalegala na satu.

1.2 Priprava hrane za ličinke

Ličinke, ki smo jih presadili s sata v vzrejne lončke, smo dnevno hranili s pripravljeno hrano: matični mleček (50 %) in vodna raztopina (50 %) D-fruktoze (12 %), D-glukoze (12 %) ter kvasni ekstrakt (2 %) (Vandenberg in Shimanuki, 1987). Sladkorno raztopino smo filtrirali skozi membranski filter (0,2 µm) in jo nato dodali hrani. Hrano za ličinke smo pripravljali sproti pred vsako vzrejno serijo in jo pred dodajanjem zalegi ogreli na 34 °C.

1.3 Presajanje ličink in vzreja

Četrty dan po prestavitvi matice iz izolatorja, ko so bile ličinke stare do 24 ur, smo sat z vzrejnim materialom prenesli v laboratorij, kjer smo ličinke presajali v matične lončke s pripravljeno hrano (10 µl). Matične lončke smo namestili v 48 kanalne (mikrotiterske) plošče za tkivne kulture. V vsak kanal je bil nameščen zvitek bombaža, navlažen z 15,5 % glicerolom. Matične lončke smo predhodno 20 min dezinficirali, jih po osušitvi individualno stehali (+/- 0,1 mg) ter jih namestili v 48 kanalne mikrotiterske plošče. Matične lončke smo pred presajanjem segreli v inkubatorju (34 °C) in vanje odpipetirali po 10 µl pripravljene segrete hrane. V začetnem obdobju vzreje (hranjenje je trajalo 6 dni) so bile ličinke v desikatorju, kjer je bila stalna temperatura 34 °C in 96 % relativna

vlažnost. Nadalje smo bube vzrejali v drugem desikatorju, kjer je bila vlažnost nižja, 80 %. Vzrejni material je bil ves čas v temnem prostoru.

V poskusu so bile tri skupine ličink: prvi dve skupini sta bili tretirani z akaricidoma kumafos oziroma amitraz, tretjo skupino ličink smo tretirali s sistemskim insekticidom imidakloprid, četrte skupine nismo tretirali in je bila za kontrolo.

1.4 Hranjenje in tretiranje ličink s pesticidi

Hrano smo v termobloku segreli na 34 °C in z njo dnevno hranili ličinke z uporabo mikropipete. Pred hranjenjem smo s stereomikroskopom preverili aktivnost ličink in sproti odstranili odmrle.

Sedmi dan vzreje smo ličinke v matičnih lončkih individualno stehtali (+/- 0,1 mg) in jih položili na dno kanalov mikrotiterskih plošč. V tem obdobju razvoja se ličinke iztrebljajo. Enajsti dan smo zalego v kanalih prekrili s tanko plastjo voska (2,5 g) in jo postavili v pokončni položaj.

2. Ugotovitve

Po dajanju akaricidov v hrano ličinkam smo ugotovili zmanjšano rast ličink. Umetna vzreja čebelje zalege, ki smo jo v laboratoriju razvijali tudi v okviru projekta CRP, omogoča razvoj obsežnega raziskovalnega področja v čebelarstvu. Predvsem raziskave o delovanju spor Nosema, kar smo izvedli v okviru projekta, in številna druga odprta problemska področja, ki imajo domnevno velik vpliv na preživetje posamezne čebele ali celotne družine. V okviru projekta pridobljeni rezultati omogočajo razvoj raziskav za izboljšanje poznavanja različnih vplivov na kranjsko čebelo. Sem lahko vključimo različne patogene in nepatogene dejavnike. Predstavljeni rezultati so pomembni za čebelarsko prakso in poznavanje pomena prehrane čebelje družine za njeno preživetje in tudi vitalnost, kar bo predvidoma predmet prihodnjih raziskav doma in v tujini.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- ☐ a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- ☒ b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- ☒ c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- ☐ d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- ☒ e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- ☒ a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- ☐ b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- ☐ c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- ☐ d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- ☐ e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- ☐ f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- ☐ g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- ☐ h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- ☐ i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Neposredni rezultati raziskovalnega projekta so pomembni na področju čebelarstva, in sicer za poznavanje problematike odmiranja čebeljih družin. Vzroke odmiranja čebeljih družin proučujejo številne raziskovalne skupine v svetu in tudi rezultati našega projekta v raziskovalnih temah razjasnjujejo problemsko področje delovanja nekaterih patogenih in nepatogenih dejavnikov na posamezne osebe in na čebeljo družino. Možni vplivi, ki smo jih raziskovali na nivoju čebelje družine, posamezne čebele ali na celičnem nivoju, imajo velik pomen za naše raziskave v prihodnje in pa tudi za čebelarsko prakso. Kvaliteta prehrane čebel v povezavi s prisotnostjo spor Nosema vplivajo na sposobnost preživetja družin v zimskem obdobju. Poznavanje proučevane problematike lahko ob ustreznih tehnoloških rešitvah v praksi prispeva k uspešnejšemu prezimovanju družin in zmanjšanju odmiranja družin. Pomembne so ugotovitve o pozitivnih vplivih prehranskih dodatkov na razvoj čebel in preživetje družin v zimskem obdobju, ter na drugi strani negativni vpliv na dolgoživost delavk kadar so okužene s sporami Nosema. Rezultati projekta predstavljajo pomembno osnovo in predstavitev problematike tudi za državne inštitucije, ki se ukvarjajo s čebelarstvom. Problemsko področje, ki se navezuje na prehrano čebeljih družin, poznavanje in proučevanje prisotnosti patogenov je zelo pomembna raziskovalna in praktično uporabna tema v čebelarstvu, ki ima potencialno tudi največji vpliv na neposredno, kratkoročno in tudi dolgoročno ohranjanje čebeljega fonda v Sloveniji.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Poznavanje možnih prehranskih in drugih vplivov na čebele ima velik pomen tudi dolgoročno za naše čebelarstvo, katerega pomemben cilj je poleg pridelave čebeljih pridelkov tudi ohranjanje kranjske čebele. Izvedeni projekt tudi odpira nove interdisciplinarne raziskovalne možnosti na področju čebelarstva v okviru temeljnih in aplikativnih raziskav, ki bodo imele lahko vpliv na uspešnejše čebelarjenje. V okviru projekta smo v laboratorijskih raziskavah uporabili sodobne raziskovalne metode na področju celične in molekularne biologije, ter jih povezali z eksperimentalnim delom v poskusnih čebeljih družinah. Uporaba raziskovalne tehnike in opreme v laboratoriju za čebele nam zagotavlja še boljše izkoriščanje znanja in usposobljenosti v prihodnjih raziskavah za potrebe naše znanosti na področju čebelarstva in za čebelarsko stroko in uspešno čebelarsko prakso.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ a) v domačih znanstvenih krogih;
- ☒ b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- ☒ c) pri domačih uporabnikih;
- ☐ d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Interes po spoznanjih in rezultatih pridobljenih v projektu izražajo interesne skupine na področju čebelarstva. V prvi vrsti so to čebelarji - rejci ki lahko na osnovi izsledkov projekta prilagajajo čebelarsko prakso možnostim čebeljih družin, da so boljše preskrbljene

z ustrezno hrano, da se zmanjšuje možnost prenosa patogenov in tako izboljša možnosti preživetja čebeljih družin. S tem so povezane tudi razmere spreminjanja klimatskih okoliščin, saj je podaljševanje sušnih obdobj, obdobj brez hrane za čebele, mogoče nadoknaditi s kakovostno prehransko oskrbo čebel.

Državni organi pristojnega ministrstva, ki delujejo na področju čebelarstva, v okviru rezultatov projekta lahko dobijo potrebne usmeritve pri reševanju problematik na področju čebelarstva, zmanjševanja odmiranja družin in vzdrževanja čebeljega fonda kranjske čebele.

3.7. Število diplomantov, magistrstrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

--

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi institucijami.

Na področju raziskovalnih vsebin, ki smo jih zasledovali v okviru projekta, smo sodelovali s Honey Bee Research and Extension Laboratory Department of Entomology and Nematology University of Florida, Gainesville, USA
Sodelovanje z USDA-ARS Bee Research Lab, Beltsville, MD, USA.

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

V okviru sodelovanja smo razvijali raziskovalne metode na področju umetne vzreje čebelje zalege in uporabe metod ugotavljanja sprememb na celičnem in molekularnem nivoju. Za potrebe projekta smo v okviru znanstveno - raziskovalnega sodelovanja z omenjenima institucijama razvijali in uporabili metode, ki so ustrezale našim projektnim ciljem.

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani: <http://www.izum.si/>

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

GREGORC, Aleš. The study of lethal and sublethal effects on honeybees. V: Proceedings of the COLOSS Work Shop New Molecular Tools : in the Swiss Bee Research Centre Research Station Agroscope Liebefeld-Posieux ALP ... Bern, Switzerland , May 18-21, 2009 : Cost Action FA0803. Zagreb: University of Zagreb, Faculty of Agriculture, 2009, str. 15.

NAKRST, Mitja. Carniolan queens breeding in Slovenia. V: Standardization of methods for vitality test : In the Bee Research Station Unije, Unije Island, Croatia, May 25-27, 2009 : Cost Action FA0803. University of Zagreb, Faculty of Agriculture, 2009, str. 17.

SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, VELIKONJA BOLTA, Špela, BAŠA ČESNIK, Helena, GREGORC, Aleš. Residues of pesticides in honeybee (*Apis mellifera carnica*) bee bread and in pollen loads from treated apple orchards. Bull. environ. contam. toxicol., 2009, vol. 83, no. 3, str. 374-377, doi: 10.1007/s00128-9762-0.

SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, GREGORC, Aleš. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. Apidologie, 2010, letn. 41, št. 1, str. 73-86, graf. prikazi, ilustr., tabele, doi: 10.1051/apido/2009051.

GREGORC, Aleš. Ugotavljanje vzrokov zastrupitev čebel in odmiranja čebeljih družin. Slov. čebel., jan. 2009, letn. 111, št. 1, str. 9-11

GREGORC, Aleš, KRALJ, Jasna. Colony losses in Slovenia. V: Proceedings of the 4th COLOSS Conference Prevention of honeybee Colony LOSSes in the Faculty of Agriculture, University of Zagreb, Zagreb, March 3-4, 2009 : Cost Action FA0803. Zagreb: University of Zagreb, Faculty of Agriculture, 2009, str. 31.

NAKRST, Mitja. Pomen umetne vzreje čebelje zalege za raziskave v čebelarstvu. Slovenski čebelar 112, 2010; 1: 5-6.

GREGORC, Aleš. Odmiranje čebeljih družin. Kmeč. glas, 14. jul. 2010, letn. 67, št. 28, str. 8-9, fotogr. [COBISS.SI-ID 3356264]

SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, GREGORC, Aleš. Letalni in subletalni vplivi FFS na posamezno čebelo in njena tkiva : predavanje na Čebelarskem simpoziju, Brdo pri Lukovici, 28. feb. 2009. 2009.

SMODIŠ ŠKERL, Maja Ivana, VELIKONJA BOLTA, Špela, BAŠA ČESNIK, Helena, GREGORC, Aleš. Ostanke FFS v cvetnem prahu : predavanje na Čebelarskem simpoziju, Brdo pri Lukovici, 28. feb. 2009. 2009.

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.