



Čebelja družina in goltne žleze delavk so lahko tarča posegov v naravo (II. del)

Besedilo in foto: **Maja Smodiš Škerl**, dr. vet. med. – Kmetijski inštitut Slovenije

V prvem delu sem opisala problematiko in namen raziskav goltnih žlez pri čebelah. Goltne ali hipofaringealne žleze so pomembne proizvajalke sestavin matičnega mlečka. Imajo pomembno vlogo v prehrani čebeljega zaroda in matice. Pri starejših delavkah žleze pomagajo pri predelavi nektarja. Če uporaba fitofarmaceutskih sredstev (v nadaljevanju FFS) v naravi in v čebelji družini na videz ne povzroča škode, lahko prikrito vpliva na razvoj osebkov čebelje družine. Ti subklinični vplivi sicer še niso dovolj raziskani. Goltne žleze so pomemben in občutljiv organ, ki ima v življenju čebele različne naloge. Vsebnost škodljivih sestavin (FFS) v hrani ne škoduje samo čebelam, ampak tudi mlademu zarodu. Posledično je lahko razvoj zalege oslavljen, delavkam se slabša imunski obrambni mehanizem v njihovem telesu, čebele pa postajajo bolj dovzetne za različne bolezenske klice.

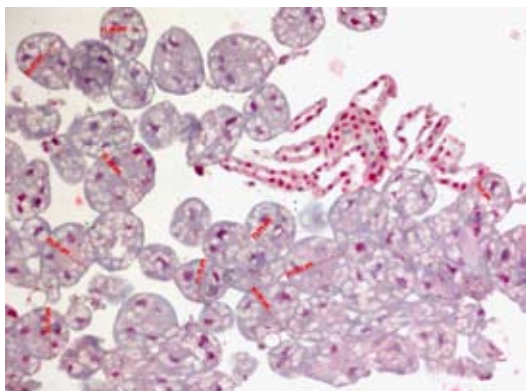
Mešički goltnih žlez se zaradi delovanja FFS niso razvijali primerno

Med poskusi so bile čebele označene, tako da smo lahko natančno spremljali razvoj goltnih žlez. Ko smo izmerili premer mešičkov pri vseh štirih starostnih skupinah delavk (1–6 dni, 7–12 dni, 13–18 dni in 19–32 dni stare čebele), smo ugotovili, da na velikost mešičkov goltnih žlez vplivata čas delovanja FFS in starost delavk. Razvoju goltnih žlez je škodoval tako imidaklopid kot kumafos, to pa lahko opazimo že v spremembi velikosti mešičkov. Čebele, ki so bile v



Meritve velikosti goltnih žlez

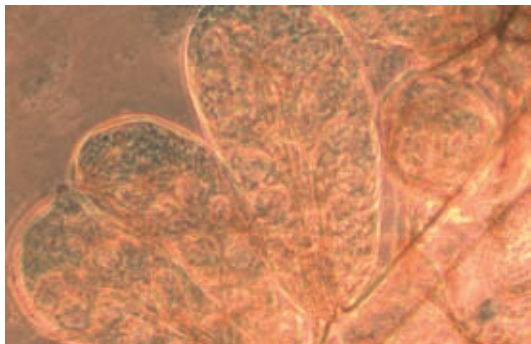
stiku s tema insekticidoma, so imele manjše mešičke v primerjavi s tistimi, ki z njima niso bile v stiku. To pomeni, da se žleze niso pravilno razvijale oziroma da so v začetku napredovale v rasti, pozneje pa je bil razvoj zaradi tujih vplivov oviran, še posebej pri čebelah, ki so bile dalj časa izpostavljene FFS. Kot domnevajo, je bila zaradi tega slabša tudi njihova sposobnost izločanja. Regresijo ali nazadovanje v razvoju žlez so ugotovili že v raziskavah, pri katerih so mladice hranili s cvetnim prahom in tripsinskim inhibitorjem gensko spremenjene soje. V naši raziskavi smo pokazali, da je uživanje imidakloprida in kumafosa zaviralno vplivalo na razvoj mešičkov goltnih žlez. Kadar so bile čebele tema insekticidoma izpostavljene krajši čas, smo lahko opazili regresijo mešičkov, še najbolj prizadeta pa je bila najstarejša starostna skupina delavk. Na sicer normalno razvite žleze je vplivala predvsem dolgotrajna izpostavljenost kumafosu, saj se je že kmalu pojavila regresija. Pomanjkljiv razvoj goltnih žlez ima lahko resne posledice za razvoj celotne družine. Takšne čebele ne morejo proizvesti dovolj kakovostnega matičnega mlečka, prav tako pa se prehitro menja njihova vloga, ki jo opravljajo kot delavke. Zato so morfološke meritve goltnih žlez lahko dodatna in uporabna metoda za določanje subkliničnih (subletalnih) vplivov FFS.



Histološka slika goltnih žlez 6 dni stare čebele. Merili smo premer mešičkov.

Celice branijo svoj obstoj s posebnimi »stresnimi« beljakovinami

Stresne beljakovine ali Hsp (angl. *Heat shock proteins*) so odločilne za delovanje različnih bioloških procesov v celici. Če se pojavijo nezaželene molekule, ki motijo normalno stanje celice, se v celici



Dejavni mešički goltnih žlez proizvajajo izloček, ki po zbirnih kanalih potuje do ustnega aparata.

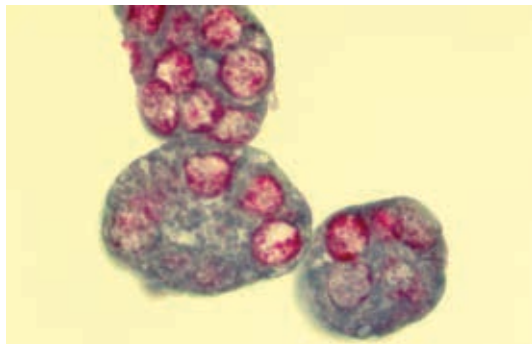
poveča količina stresnih beljakovin, ki naj bi uničile nepridiprave. Imajo torej vlogo nadzornikov, ki varujejo celico pred uničenjem. V raziskavi smo uporabili dve stresni beljakovini: Hsp 70 in Hsp 90 (število je molekularna teža). Zanimala nas je intenzivnost pojavljanja teh beljakovin v celicah, ki so bile zaradi FFS »pod stresom«.

Med dolgotrajnejšim delovanjem obeh substanc (imidaklopid in kumafos) je Hsp 90 dejaven v citoplazmi večine celic in v zbirnih cevčicah pri delavkah vseh starostnih skupin. Njegova dejavnost se s starostjo čebel stopnjuje v jedrih celic. Pri delovanju kumafosa na mlade čebele smo dejavnost Hsp 70 ugotovili v celični citoplazmi in v nekaterih jedrih, Hsp 90 pa je bil zelo dejaven v jedrih in citoplazmi celic pri delavkah, ki niso bile v stiku s tem sredstvom. V skupini delavk, ki so zaužile kumafos, sta bila oba Hsp-ja dejavnejša kot v skupini, ki je zaužila imidaklopid.

Ker stresne beljakovine delujejo v normalnih pogojih celičnih procesov, smo dejavnost obeh Hsp-jev lahko redno spremljali pri delavkah, ki niso zaužile teh sredstev. Obe skupini stresnih beljakovin, Hsp 70 in Hsp 90, sta široko uporabni v biomonitoringu ekosistemov. Celice varujejo tako, da se ob pojavu tujih škodljivih snovi njuna količina v njih poveča in preprečuje njihovo smrt. Dejavnost Hsp-jev je bila izrazitejša v žlezah delavk, ki so bile pod vplivom delovanja kumafosa. Če to ugotovitev združimo še z ugotovitvami morfoloških meritev, lahko sklepamo, da imidaklopid bolj škoduje celicam goltnih žlez kot kumafos.

Obsojene na lastno smrt

Da smo lahko določili, koliko celic je propadalo, smo si pomagali s kitom ISCDDK (angl. *In Situ Cell Death Detection Kit*, kit za odkrivanje celične smrti), ki lahko ugotovi tako smrt celice kot tudi nekrozo ali odmiranje. Ugotovitve smo primerjali še s kitom ApopTag, ki zazna samo tiste celice, ki svoj propad sprožijo same (t.i. programirana celična smrt). Pozitivne celice so imele ob uporabi ISCDDK jedra



Pozitivna jedra celic so obarvana rdeče. Uporabili smo kit ISCDDK (400-kratna povečava).

obarvana rdeče, ob uporabi kita ApopTag pa so bile celice obarvane rjavo.

Celična smrt (programirana smrt in smrt zaradi poškodbe ali nekroze) se je pogosteje pojavljala v žlezah mladih delavk, ki so bile izpostavljene delovanju imidakloprida. Ugotovili smo jo s kitom ISCDDK, ki pa je po večini zaznal celice, ki so začele odmirati zaradi nekroze, torej zaradi poškodbe, stopnja programirane celične smrti pa je ostala nizka. Pri delovanju kumafosa smo ugotovili povečano stopnjo programirane celične smrti pri mladich (starih od 7–12 dni). Imidaklopid je v celicah pospešil nekrozo, kadar so bile čebele insekticidu izpostavljene dalj časa. Pri teh delavkah je pojav programirane celične smrti ostal na ravni normalnega obnavljanja tkiva, ki je v žlezah ocenjen na približno 10 odstotkov. V tretji skupini čebel (starih od 13–18 dni) so celice po daljšem času delovanja imidakloprida odmrle, opazili pa smo tudi njihovo razpadanje. Programirana celična smrt se je torej stopnjevala zaradi delovanja kumafosa, poškodbo celic (nekrozo) pa so delavke utrpeli predvsem zaradi zaužitega imidakloprida.

Sklep

Na podlagi ugotovitev naše raziskave lahko sklepamo, da so stresne beljakovine Hsp 70 in Hsp 90 ter kit za odkrivanje celične smrti ApopTag uporabne imunohistološke metode. Z njimi je mogoče ugotavljati različne škodljive vplive iz okolja, ki poškodujejo organe čebel. Čebelja družina je občutljiv organizem. Ker so naloge članov družine točno določene, se na spremembe v okolju odziva celotna družina. Za nas kot čebelarje so morda nevidna dogajanja poglavitni vzrok vrste sprememb v čebelji družini. Oslabljen imunski sistem, slaba prehrana čebeljega zaroda in slabša vitalnost delavk so slaba popotnica za močne in produktivne čebelje družine. Z imunohistološkimi metodami bomo lahko v prihodnje ugotavljali prikrite vplive akaricidov, insekticidov in drugih FFS na posamezne člane družine ter njihove posledice za celotno čebeljo družino. ■