

EVROPSKA KONFERENCA Z NASLOVOM »MOLEKULARNI MEHANIZMI ODPORNOSTI ČEBEL PRI ČEBELJIH BOLEZNIH«

dr. Janez Poklukar, Kmetijski inštitut Slovenije

(Nadaljevanje)

4. Mehanizmi odpornosti čebel na hudo gnilobo

M. Spivak je predstavila podroben pregled raziskav, povezanih z odpornostjo čebel na boleznih zalege. Najprej so predvidevali, da sta pogoj za odpornost čebel dva recesivna gena, pozneje pa so zaradi prevelike variabilnosti lastnosti predvideli dedovanje s tremi geni. Hkrati imajo na lastnost odkrivanja obolele zalege in na lastnost odstranjevanja le-te zelo velik vpliv okoliški dejavniki. Pozneje, v obdobju množične uporabe antibiotikov, so na te raziskave domala pozabili. V zadnjem času se pojavlja odpornost *P. larvae* na številne antibiotike, poleg tega je tudi dokazano, da ima velik vpliv na uspešen boj čebel proti drugim boleznim, tudi proti varozi čebel, dobro čistilno vedenje čebel. Zelo kmalu bo treba temeljito preučiti številne okoljske vplive, ki vplivajo na čistilno vedenje čebel, in ugotoviti stopnjo dednosti te lastnosti. S selekcijo bomo tako lahko dodatno povečali odpornost čebel na boleznih zalege.

U. Riessberger iz Gradca se je s sodelavci vprašala, kakaj odrasle čebele ne zbolijo zaradi okužb s *P. larvae*. Zanimivo je, da morajo zimske čebele preživeti štiri do pet mesecev s spori v svojem črevesju, pa kljub temu ne zbolijo. Čebele poleg tega v aktivni sezoni prenašajo spore in so v najtesnejšem stiku z okuženimi ličinkami. Za zdaj še ni znana kemična sestava snovi, ki preprečuje povečevanje števila bakterij v telesu odraslih ličink in v telesu starejših ličink. Največ te snovi je v izvlečku srednjega črevesa osem dni starih čebel, manj je v štiri dni starih ličinkah, najmanj pa v mladih ličinkah. Ugotovili so, da okoliški vplivi ne vplivajo veliko na navzočnost snovi pri odraslih čebelah ter da jo je mogoče najti v skladiščnem cvetnem prahu in v matičnem mlečku. Tudi mleček dojilj za prehrano zalegajoče matice vsebuje precej te snovi. Ugotovili so, da snov nastaja tudi v hipofaringealnih žlezah čebel in da je temperaturno zelo obstojna.

M. Wedenig iz Gradca je s sodelavci predstavila analizo navzočnosti snovi, ki preprečuje rast *P. larvae* v tkivu različnih starih ličink in čebel. Tri do štiri dni stare ličinke zelo uspešno preprečujejo rast bakterij, starejše, stare od pet do šest dni, pa so pri tem manj uspešne. Ugotovili so tudi, da so mlajše, eno- do dvodnevne ličinke veliko bolj občutljive na rast *P. larvae* v svojem tkivu.

5. Antibiotični peptidi pri žuželkah

J. Simuth je s sodelavci analiziral proteine, ki v frakciji matičnega mlečka, topnem v vodi, delujejo antibiotično na rast *Bacillus subtilis* in *P. larvae*. Z mikrosekvenčno analizo cDNA so določili genetski zapis za njihovo sintezo in zapis z vektorji prenesli na bakterije

E. coli. Dobljeni protein je preprečeval rast bakterij *B. subtilis* in *Botrytis cinerea*, na bakterije *P. larvae* pa je vplival le v omejenem obsegu.

J. Klaudiny je s sodelavci analiziral snovi, ki preprečujejo rast bakterij *P. larvae*. Snovi je ekstrahirali iz čebeljih glav, oprsil in iz matičnega mlečka. Ugotovili so velike razlike v količinah učinkovitih peptidov v matičnem mlečku, zbranem v posamezni čebelji družini. Nekatere čebelje družine naj bi tudi zato kazale večjo naravno odpornost proti hudi gnilobi zalege. Kot je videti, je peptid, imenovan royalisin, izjemno učinkovit pri preprečevanju rasti *P. larvae*.

6. Odporni povzročitelji boleznih in paraziti

Zaščita čebel s kemičnimi sredstvi je v zadnjih desetletjih nujna, če želimo uspešno čebelariti. N. Milani je v svoji predstavitvi poudaril, da se tako imenovana »rezistenca« pojavlja tako pri varozi kot pri *P. larvae*. Številna zelo obetavna zdravilna sredstva so v nekaj letih postala neučinkovita. Zmanjšana učinkovitost je bila najpogosteje posledica dolgotrajnejše uporabe prejemnih količin. To se je zgodilo npr. z brompropilatom, klordimeformom in amitrazom. Leta 1992 je odpovedal tudi fluvalinat, to pa je v čebelarstvu povzročilo dolgoročne posledice. »Rezistenca« varoe se je navadno hitro širila iz žarišča v vse okoliške čebeljnake. Hitreje se je širila na območjih, na katerih je bilo večje število prevoznih čebeljakov. Fluvalinatu je kmalu sledil fluometrin. Varozi je uspelo učinkovito razgraditi piretroid z encimom monooksigenaze P_{450} sistema. Podoben mehanizem so odkrili tudi pri čebelah *A. mellifera*.

Nekatere linije čebel so že skoraj popolnoma neobčutljive na fluvalinat. Vse bolj se potrjuje hipoteza, da je varoa od čebele »ukradla« gene za razstrupljanje fluvalinata. Gre torej za prenos dedne snovi med gostiteljem in zajedavcem. Dokazano je tudi, da s hkratno uporabo fluvalinata in inhibitorja monooksigenaze piperonil butoksid postane fluvalinat zelo strupen tudi za čebele.

»Rezistentne« varoe imajo manjšo življenjsko moč, zato po prenehanju dodajanja fluvalinata znova prevladajo občutljive varoe – z drugimi besedami – fluvalinat je bil krajše obdobje spet učinkovit. Leta 1996 so v Italiji opazili tudi odpornost varoj na kumafos (perizin). Zdaj že obstajajo vrste varoj, ki prenesejo do stokrat večje doze kumafosa, kot so ga prvotne, na kumafos občutljive varoe. Čebele z odpornimi gosti v zadnjem času že množično propadajo. Varoa očitno zna ustvariti odpornost proti vsakemu akaricidu, tudi proti takšnemu s preprosto kemično sestavo – npr. proti mravljinčni kislini.

Tudi *P. larvae* postaja počasi odporen na zdravila. V Nemčiji so dokumentirali odpornost na sulfatiazol. V

Argentini so dokazali odpornost na oksitetraciklin. Tako postajajo na antibiotike odporne še preostale bakterije v panju, npr. *Bacillus alvei*.

Pri zatiranju varoe s kemičnimi sredstvi je priporočljivo že takoj na začetku uporabiti močnejše doze zdravila in s tem uničiti vse delno odporne varoe. Izogibajmo se »dokončnemu« popolnemu uničenju varoe, ker s tem nehote dajemo prednost odpornejšim osebkom. V posameznih primerih je morda smotno uporabiti dve različni sredstvi hkrati. Pojavljata pa se problema zstrupljanja čebel in ostankov sredstev v čebeljih pridelkih. Zato zatiranje varoe s kemičnimi sredstvi nikakor ni končna rešitev. Pospešeno je treba preučevati večjo odpornost čebel proti varozi, zlasti na podlagi usmerjene selekcije čebel.

M. F. Feldlaufer je s sodelavci analiziral učinkovitost 27 antibiotikov na rast *P. larvae*. Od vseh se je še najbolj izkazal lynkomicin, ki ga sicer uporabljajo v prašičjereji in v perutinarstvu.

J. Wilde je v zadnjih letih veliko raziskoval v Nepal. Osredotočil se je predvsem na zajedavca *Tropilelaps clareae*. Ta ima neko zanimivo lastnost, namreč, da ne more preživeti dalj časa na odraslih čebelah in se temu primerno ne more razširiti na tisto čebeljo populacijo, pri kateri pozimi v panjih ni čebelje zalege. Zajedavec lahko pri 34,5 °C največ tri dni živi na odraslih čebelah tudi če ni zalege, pri sobni temperaturi 20 °C pa ne več kot pet dni. Zajedavec do nadaljnega verjetno ne bo ogrožal čebel v Evropi.

7. Analiza genov v čebeljem genomu

M. Solignac se s sodelavci že nekaj časa ukvarja z analizo genoma domače čebele. Izvedli so številne analize mikrosatelitov med različnimi križanci italijanske in severne temne čebele. Te tehnike so zelo uporabne za analize biološke raznolikosti in določanje posameznih ekotipov tudi v preostali čebelji populaciji, to pa bo v prihodnje še posebej zanimivo za Slovenijo, domovino avtohtone kranjske čebele. V prihodnjih treh letih nameravajo namreč preučiti celotno evropsko populacijo domače čebele; pri projektu smo dobrodošli tudi Slovenci.

Hasselmann in Beye menita, da je domača čebela odličen objekt za mapiranje genov. Velikost vzorcev ni omejena, rekombinacije pa so tudi zelo pogoste. Predstavili so svojo metodo PCR teka na daljših odsekih genskih zapisov, ki so jih dobili ob pomoči restrikcijskih encimov. Zdaj iščejo neko mesto na petem kromosomu, kjer je najverjetneje gen za določanje spola čebel.

Doba trajanja pokrite zalege pri čebelah je v tesni povezavi z njihovo občutljivostjo na varozo. Haertel s sodelavci skuša s tehniko AFLP™ poiskati mesto genskega zapisa za to lastnost čebel.

8. Molekularna izraženost imunskih proteinov pri žuželkah

S. Stoven se je v začetku svojega predavanja vprašala, kaj se zgodi v telesu žuželke ob stiku s patoge-

nimi organizmi in zajedavci. Vemo, da nastane obrambna reakcija s celičnimi in humoralnimi imunskimi sistemi. Veliko bolj kot celični so znani humoralni imunski sistemi. Doslej so raziskovali predvsem obrambni odziv pri vinski mušici. Vemo, da v telesu žuželk obstajajo različni sistemi prenosa signala ob napadu patogenov in da se kot posledica tega začnejo sintetizirati antimikrobni peptidi. V nadaljevanju je zelo podrobno opisala rezultate najnovejših raziskav na tem področju, vendar jih za zdaj še ni mogoče povezati v celoto.

V. T. Kakpakov je opozoril, da je pri žuželkah navadno mogoče opaziti bližnje ali daljne selitve DNA znotraj kromosomov pri približno 20 odstotkih jedrnega DNA. Ta je bolj izpostavljena mutacijam in zelo vpliva na aktivnost sosednjih genov. Možno je, da ima omejeni DNA s svojo rastjo oz. s svojim povečanim obsegom določeno blažilno vlogo ob morebitnem napadu patogena na celico. Opazili so namreč, da se pri vinski mušici v določenih okoliščinah do petkrat poveča skupna količina jedrnega DNA.

J. D. Evans je opozoril na problem različne izraženiosti posameznih genov v procesu razvoja čebel delavk in čebeljih matic. Še posebej ga zanima, kakšne razlike so opazne pri ličinkah, iz katerih se izležejo matice, in pri ličinkah, iz katerih se izležejo čebele delavke. Gre za temeljne raziskave prihodnjih raziskav na področju reakcij čebel ob vdoru patogenov in zajedavcev.

R. E. Ross je s sodelavci raziskoval vpliv količine dodanega oktopamina na vonjalno reakcijo čebel delavk. V poskusu so primerjali možnost zaznavanja vonja pri čebelah, odbranih na dober čistilni nagon, s čebelami s slabšim čistilnim nagonom. Ugotovili so, da dodajanje oktopamina v hrano čebel z dobrim čistilnim vedenjem ni bilo učinkovito, čebele s slabšim čistilnim vedenjem pa so znatno bolje zaznavale nove vonje. Zaznavanje tako »drogiranih« čebel se ni prav nič razlikovalo od zaznavanja čebel z dobrim čistljenjem. Rezultati dokazujejo, da imajo »higienske« čebele v možganih znatno večjo količino optamina, to pa jim omogoča precej učinkovitejše zaznavanje tujih vonjev iz obolele zalege.

SKLEPNA DISKUSIJA

V sklepnih diskusiji smo se vsi udeleženci vprašali, ali je sploh smiselno predlagati izdelavo celotne genske slike pri čebelah. Podoben projekt namreč prav zdaj že poteka pri vinski mušici. Po tehtnejši razpravi smo navzoči ugotovili, da je za tak projekt še prezgodaj. V prihodnjih nekaj letih bo verjetno precej lažje in ceneje priti do podrobnega genskega zapisa domače čebele. Veliko pomembnejše je spoznanje večine navzočih raziskovalcev, da se proti patogenom in zajedavcem bojujejo predvsem čebele. Ljudje čebelam samo pomagamo pri njihovem boju za preživetje. Glede na to, velja torej podpreti raziskovalne projekte v tej smeri.