

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKЕ MEDICINE



Branislav S. Vejnović

Doktor veterinarske medicine

**Molekularno-genetička identifikacija
tripanozome *Lotmaria passim* Schwarz, 2014
i analiza njenih efekata na zdravlje pčelinjih
zajednica i ekonomske efekte u pčelarstvu**

- Doktorska disertacija -

Beograd, 2018.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



Branislav S. Vejnović

Doctor of veterinary medicine

Molecular genetic identification of *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 trypanosome and the analysis of its impact on the health of bee colonies and economic effects in apiculture

- Doctoral Dissertation -

Belgrade, 2018

Mentori:

Dr Jevrosima Stevanović, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine

Univerziteta u Beogradu

Dr Milorad Mirilović, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine

Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Zoran Stanimirović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine

Univerziteta u Beogradu

Dr Nevenka Aleksić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine

Univerziteta u Beogradu

Dr Dragan Ćirković, docent

Departman za hemijsko tehnološke nauke

Državni Univerzitet u Novom Pazaru

Datum odbrane: _____

Beograd

Doktorska disertacija realizovana je zahvaljujući resursima naučnoistraživačkog projekta „Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane” koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (ev. br. 46002) i kojim rukovodi prof. dr Zoran Stanimirović

Ovaj rad posvećujem svojoj porodici

Molekularno-genetička identifikacija tripanozome *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 i analiza njenih efekata na zdravlje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarstvu

REZIME

Zbog nepostojanja molekularne metode za determinaciju vrsta pčelinjih tripanozoma *Crithidia mellificae* i *Lotmaria passim* bez naknadnog sekvencioniranja, definisan je cilj ovog rada, a to je molekularna identifikacija tripanozome *L. passim* i ispitivanje njenog uticaja na zdravlje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarstvu. Razvijeni su specijes-specifični prajmeri za PCR detekciju *C. mellificae* i *L. passim* kao i *real-time* PCR metoda za detekciju i kvantifikaciju *L. passim*. Uzorci pčela koji su sakupljeni u Srbiji u devetogodišnjem periodu (2007-2015) retrospektivno su analizirani kako bi se utvrdila prevalencija ovog eukariotskog parazita molekularnom analizom DNA. Kako bi se utvrdila godišnja dinamika *L. passim*, njen uticaj na oksidativni stres, kao i na ekonomsku dobit formirane su dve grupe košnica. Istraživanje je sprovedeno na ukupno dvadeset Langstroth košnica, 10 košnica koje su bile *L. passim*-pozitivne i 10 košnica koje su bile *L. passim*-negativne, a koje su se nalazile na dva različita pčelinjaka. Tokom trajanja eksperimenta (od marta 2016. do marta 2017. godine) svakog meseca izuzev zimskih meseci (oktobar-februar) iz svake košnice je uzorkovano najmanje 120 živih odraslih pčela sa leta košnice (za detekciju i kvantifikaciju *L. passim* i *Nosema* spp), a u junu i septembru 20 živih odraslih pčela za potrebe analize parametara oksidativnog stresa.

Razvijeni su specijes-specifični prajmeri za PCR detekciju tripanozoma vrste *C. mellificae* i *L. passim*, koji su validirani i u uslovima mešovite infekcije, kao i infekcije tripanozomom bumbara *Crithidia bombi*. Infekcija sa *N. apis* i *N. ceranae* su analizirane korišćenjem PCR. Tehnikom *real-time* PCR je utvrđen nivo infekcije vrstom *L. passim* kod *L. passim*-pozitivnih društva, dok je brojanjem spora određen nivo infekcije sa *N. ceranae* u svim društvima.

Analizirani su uzorci pčela iz 162 društva (18 iz svake godine), koji su prikupljeni sa 57 različitih lokacija. *L. passim* je detektovana u uzorcima koji su poticali iz svake godine i kod prosečno 62,3% (godišnja prevalencija od 38,9% do 83,3%). Ovo

su za sada najstariji potvrđeni podaci o detekciji *L. passim* u svetu i prvu detekciju ove vrste u Srbiji. *N. ceranae* je detektovana u svakoj godini i to u ukupnoj frekvenciji od 95,7%, a koja se godišnje kretala od 83,3% do 100%. Većina kolonija (60,5%) su bili koinficirane sa *L. passim* i *N. ceranae*. U ovom radu nisu otkrivene ni *C. melliferae*, a ni *N. apis*. Ovi rezultati podržavaju hipotezu da je *L. passim* prevladala nad *C. melliferae* kod *A. mellifera* tokom protekle decenije.

Real-time PCR metoda je razvijena kako bi se omogućila specijska detekcija i kvantifikacija *L. passim*. Značajna pozitivna korelacija između nivoa infekcije vrstama *L. passim* i *N. ceranae* upućuje na njihovu sličnu godišnju dinamiku, dok razlike u nivoima infekcije istom vrstom između određenih meseci ukazuju na sezonalnost u učestalosti oba parazita. Analiza koja je razvijena i validirana omogućava detaljno istraživanje dinamike infekcije *L. passim* i razumevanje infekcije ova dva parazita.

Parametri oksidativnog stresa u pčelinjim društvima inficiranim vrstom *L. passim* bili su značajno promenjeni ($p < 0,05$) u odnosu na neinficirana društva. Aktivnost superoksid dismutaze bila je značajno manja dok su aktivnost katalaze i glutation S-transferaze i koncentracija malondialdehida bili značajno ($p < 0,05$) povećani kod *L. passim*-pozitivnih društava.

Izrađen je program za smanjenje broja infektivnih agenasa u pčelinjim društvima na osnovu jasno determinisanih inputa i outputa pomoću analize troškova i dobiti. Utvrđena neto sadašnja vrednost, odnos troškova i dobiti, i veličine interne stope povećanja uloženi sredstava pokazuju pozitivnu društvenu opravdanost za implementaciju programa u toku petogodišnjeg perioda.

Ključne reči: *Apis mellifera*, tripanozome, mikrosporidije, PCR, *real-time* PCR, molekularna detekcija, analiza troškova i dobiti.

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Veterinarska ekonomika, Veterinarska genetika

UDK broj: 619:638.15:338.439

Molecular genetic identification of *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 trypanosome and the analysis of its impact on the health of bee colonies and economic effects in apiculture

SUMMARY

Due to the absence of molecular methods intended for species-specific identification of bee trypanosomes *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* without further sequencing, the goal of this thesis has been defined: molecular identification of *L. passim* trypanosome and the research into its impact on the colony health and economic effects in apiculture. Species-specific primers for PCR detection of *C. mellificae* and *L. passim* as well as a *real-time* PCR method for the detection and quantification of *L. passim* were developed. Archival bee samples collected in Serbia during a nine-year period (2007-2015) were analysed retrospectively to assess the prevalence of this eukaryotic parasite by molecular DNA analysis. To determine the annual dynamic of *L. passim* infection, and its influence on oxidative stress and the economic income two apiaries were chosen. Ten hives from each made up the two experimental groups, the *L. passim*-positive from the one and the *L. passim*-negative from another. During the experimental period (from March 2016 to March 2017) each month with the exception of winter months (October-February) from every hive 120 live adult bees were collected from the hive entrance for the detection and quantification of *L. passim* and *Nosema* spp. In addition, in June and September 20 live adult bees were collected in the same manner for oxidative stress analysis.

Species-specific primers for PCR detection of the two trypanosomatids, *C. mellificae* and *L. passim*, were developed and validated for target specificity under single and mixed-species conditions as well as against the bumblebee trypanosomatid *Crithidia bombi*. Infections with *N. apis* and *N. ceranae* were analysed using the PCR assay. Infection levels with *L. passim* in *L. passim*-positive colonies were detected with the *real-time* PCR, and the *N. ceranae* infection level by spore counting in all of the colonies.

A total of 162 colonies (18 originating from each year), collected from 57 locations were analysed. *L. passim* was detected in samples provided each year in 62.3%

of samples (ranging between 38.9% and 83.3%). This is the earliest confirmed record to date for *L. passim* and the first report of this species in Serbia. *N. ceranae* was detected every year in 95.7% of samples, with the annual prevalence from 83.3% to 100%. The majority of colonies (60.5%) were coinfecting with *L. passim* and *N. ceranae*. Neither *C. mellificae* nor *N. apis* was detected in Serbia. These results go in favour of the hypothesis that *L. passim* prevailed over *C. mellificae* in *A. mellifera* in the last decade.

A *real-time* PCR assay which enables the species detection and quantification of *L. passim* infection was developed. Significant positive correlation between infection levels with *L. passim* and *N. ceranae* indicates their similar annual dynamics, whilst the differences in the levels of infection between particular months point to a seasonal pattern in the incidence of both parasites. The analysis which was developed and validated enables in depth investigation into the dynamic of *L. passim* infection and understanding the infection with these two parasites.

Oxidative stress parameters differed significantly ($p < 0.05$) between *L. passim*-positive and *L. passim*-negative colonies: the activity of superoxide dismutase was significantly lower but the activities of catalase and glutathione S-transferase and the concentration of malondialdehyde were significantly ($p < 0.05$) increased in *L. passim*-positive colonies.

Based on clearly determined inputs and outputs, using the cost-benefit analysis, a program which is to decrease the number of infective agents in bee colonies was developed. The determined net present value, relation between expenditures and income and the height of the internal rate of return suggest the reasonableness of the implementation of the program in a five-year period.

Key words: *Apis mellifera*, trypanosomatidae, microsporidia, PCR, *real-time* PCR, molecular detection, *cost-benefit* analysis.

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Veterinary Economics, Veterinary Genetics

UDK number: 619:638.15:338.439

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Značaj medonosne pčele i pčelarstva.....	3
2.2. Parazitske tripanozome pčela.....	8
2.3. Mikrosporidijalni paraziti pčela.....	13
2.4. Enzimi oksidativnog stresa	18
2.5. Analiza troškova i dobiti.....	21
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	23
4. MATERIJAL I METODE	24
4.1. Materijal.....	24
4.2. Metode.....	25
4.2.1. Konvencionalni PCR testovi za indentifikaciju pčelinjih tripanozoma i mikrosporidija.....	25
4.2.2. <i>Real-time</i> PCR metoda za utvrđivanje stepena infestacije pčela sa <i>L. passim</i>	33
4.2.3. Postavka terenskog eksperimenta	39
4.2.4. Određivanje parametara oksidativnog stresa	42
4.2.5. Evaluacija dobiti i troškova kod pčelinjih društava koje su inficirane tripanozomom <i>L. passim</i>	44
4.2.6. Prikupljanje podataka i izrada kartograma.....	45
4.2.7. Statistička obrada rezultata	46
5. REZULTATI.....	48
5.1. PCR metode za indentifikaciju vrsta pčelinjih tripanozoma <i>Lotmaria passim</i> i <i>Crithidia mellificae</i> korišćenjem novodizajniranih prajmera	48
5.2. <i>Real-time</i> PCR za detekciju i kvantifikaciju <i>L. passim</i>	55
5.3. Uticaj <i>L. passim</i> na jačinu i zdravstveno stanje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarskoj proizvodnji.....	61
5.3.1. Parametri jačine pčelinjih društava	61
5.3.2. Produktivnost pčelinjih društava.....	66
5.3.3. Parametri oksidativnog stresa	67
5.3.4. Determinacija faktora i izrada programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima....	71
5.3.5. Analiza troškova i dobiti.....	74
5.3.6. Zastupljenost košnica u Republici Srbiji.....	76
6. DISKUSIJA	83
7. ZAKLJUČCI.....	97
8. LITERATURA.....	99

1. UVOD

Medonosne pčele (*Apis mellifera*) su značajne sa ekološkog i ekonomskog aspekta. Direktna dobit od meda koje proizvedu gajena pčelinja društva u EU iznosi 140 miliona EUR, ali je ona minorna u odnosu na korist od njihove uloge u oprašivanju gajenih i divljih biljaka. Ekonomska vrednost koju gajene pčele ostvare oprašivanjem u poljoprivredi na teritoriji Evrope iznosi oko 15 milijardi EUR, dok je njihov doprinos očuvanju biodiverziteta neprocenjiv. Poslednjih 10 godina zabeleženi su veliki gubici gajenih društava *Apis mellifera* širom sveta. U Srbiji, ti gubici se kreću u opsegu 15-35%. U osnovi gubitaka gajenih medonosnih pčela leži hronična izloženost multiplim stresorima koji međusobno interaguju ili deluju sinergistički. Zbog toga je neophodno očuvanje zdravih i jakih pčelinjih zajednica, ali i blagovremena i precizna dijagnostika novoopisanog pčelinjeg parazita *Lotmaria passim* Schwarz, 2014, tripanozome za koju postoje indicije da utiče na zdravlje pčela i da doprinosi velikim gubicima gajenih pčela širom sveta.

Tripanozome koje parazitiraju kod socijalnih insekata (bumbara i pčela) su malo ispitivane, ali sa otkrićem njihovog negativnog uticaja na ekonomski značajne polinatore, javio se interes za njihovim proučavanjem. Korelacija između infekcije tripanozomama i uginuća pčelinjih društava zabeležena je u Americi i Belgiji. Značajno je i otkriće da je verovatnoća da pčelinje društvo uginu tokom zime veća ukoliko je istovremeno inficirano tripanozomama i mikrosporidijama *Nosema ceranae* (negativna sinergija). Utvrđen je jedan od mehanizama negativnog dejstva istovremene infekcije ovim endoparazitima, a to je njihovo supresivno delovanje na ćelijski i humoralni imuni odgovor domaćina, s obzirom da u velikoj meri remete transkripciju gena značajnih kako za individualni imunitet medonosne pčele, tako i za socijalni imunitet čitave pčelinje zajednice.

Dve vrste tripanozoma parazitiraju kod evropske medonosne pčele *Apis mellifera*. Prva je opisana pre skoro pet decenija (*Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, 1967) i smatrala se prevalentnom kod *A. mellifera* širom sveta. Druga vrsta je *Lotmaria passim* Schwarz, 2014, koja je nedavno opisana i nakon toga je ubrzo utvrđeno da ona preovlađuje kod *A. mellifera*, a da je većina tripanozoma ranije

nalaženih kod pčela arbitrarno označavana kao *C. mellifica*e (u Americi, Kini, Japanu, Švajcarskoj, Španiji i Turskoj). Razlog tome je što se navedene vrste tripanozoma, *C. mellifica*e i *L. passim*, mogu razlikovati samo primenom opsežnih molekularnih analiza (sekvencioniranjem) i proučavanjem njihove ultrastrukture putem skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i transmisiona elektronske mikroskopije (TEM). Naime, navedene mikroskopske tehnike nisu dovoljne za pouzdano razlikovanje tripanozoma *C. mellifica*e i *L. passim* zbog njihove velike morfološke sličnosti, već je neophodna dodatna analiza njihove DNK sekvencioniranjem. Prethodni pokušaji molekularne identifikacije navedenih vrsta tripanozoma korišćenjem prajmera za region unutar *internal transcribed spacer region-1* (ITS-1) lokusa nisu omogućili jasno razlikovanje vrsta elektroforezom PCR produkata, zbog veoma malih razlika u veličini amplikona, već je bilo neophodno sekvencioniranje PCR produkata. Drugim rečima, ne postoji metoda sa specifičnim prajmerima koja bi omogućila razlikovanje vrsta pčelinjih tripanozoma konvencionalnom PCR metodom bez sekvencioniranja. Nepostojanje molekularne metode za rutinsku identifikaciju *C. mellifica*e i *L. passim* jedan je od glavnih razloga odsustva informacija o distribuciji ovih tripanozoma i njihovog dejstva na pčele.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Značaj medonosne pčele i pčelarstva

Gajenje medonosne pčele, odnosno pčelarstvo predstavlja značajnu granu poljoprivrede. Pčele proizvode med od sakupljenog nektara sa biljaka (**Matheson i Reid, 2011**). Jedno pčelinje društvo, u zavisnosti od uspeha sezone, može proizvesti nekoliko desetina kilograma meda (**Wright i sar., 2017**).

Osim proizvodnje meda, pčele su visoko cenjene i kao oprašivači biljaka, uključujući ekonomski značajne vrste (**Calderone, 2012**). Oprašivanje se obavlja zahvaljujući tome što čitavo telo pčele prekrivaju dlake za koje se, tokom boravka pčele na cvetu, kače ili lepe polenova zrna koje pčele zatim prenose na druge cvetove (**Grissell, 2010**). Oprašivanje je od ključne važnosti za poljoprivrednu proizvodnju, jer od pčela zavisi oprašivanje mnogih biljnih kultura (**Klein i sar., 2007**). Na globalnom nivou, 75% prehrambenih useva zavisi, barem delimično, od oprašivanja insekata, a među njima medonosna pčela je izuzetno značajna (**Potts i sar., 2010; Bommarco i sar., 2013**). Uzrok povećanja proizvodnje prehrambenih useva je rast populacije ljudi (**Bommarco i sar., 2013**), a razvoj poljoprivrede, odnosno povećanje površine pod monokulturama u mnogim slučajevima premašuje kapacitet oprašivanja lokalnih pčelinjih populacija (**Aizen i Harder, 2009; Bommarco i sar., 2013**). Kao odgovor na sve veću potražnju za oprašivačima, širom sveta su veoma tražene usluge oprašivanja od strane gajenih pčela (**Gallai i sar., 2009**) te je u mnogim zemljama pčelarima isplativije ako pčele iznajmljuju za polinaciju nego za proizvodnju meda. Jedan od najboljih primera značaja oprašivanja pčelama nalazi se u Kaliforniji (SAD), odakle potiče 80% svetske proizvodnje badema (**Klein i sar., 2012**). Za oprašivanje milion hektara badema potrebno je 2 miliona košnica (**Traynor, 2017**). Sa 500.000 košnica, koliko se nalazi u Kaliforniji, to nije moguće, te se zato veliki broj košnica u februaru seli u Kaliforniju (**Traynor, 2017**). Proizvodnja badema u 2014. godini je iznosila 7,6 milijardi dolara (**Sumner i sar., 2014**). Ekonomska vrednost oprašivanja pčelama u

2009. godini je iznosila 11 milijardi dolara, a povećala se približno 40% u odnosu na 2001. godinu (**Calderone, 2012**).

Ujedinjene nacije zabeležile su povećanje broja gajenih pčelinjih društava za oko 45% u odnosu na 1961. godinu. Uprkos globalnom porastu gajenih društava, regionalni pad od 59% u SAD i 25% u Evropi zabeležen je 2015. godine (**Aizen i Harder 2009; Potts i sar., 2010**). Kao glavni uzroci ovih gubitaka prvobitno su identifikovani gubitak staništa (usled povećane poljoprivredne proizvodnje i upotrebe agrohemijskih sredstava), patogeni, klimatske promene i introdukovane vrste parazita koji utiču na zdravlje pčelinjih zajednica **Potts i sar. (2010)**.

Evropska medonosna pčela *Apis mellifera* je vrsta koja se gaji širom sveta. Istorijski posmatrano popularnost gajenja pčela proističe iz mogućnosti ubiranja meda. Najstariji arheološki dokazi iz Egipta ukazuju da je pčelarenje u cilju proizvodnje meda počelo oko 2500. godine pre nove ere (**Meixner, 2010**). Stalna potražnja za medom dovela je do razvoja savremenog pčelarenja i distribucije medonosne pčela širom sveta, odnosno na svim kontinentima izuzev Antarktika (**Moritz i sar., 2005**).

Sve pčele u košnici poreklom su od jedne matice, pri čemu se iz oplodjenih jaja razvijaju radilice, a iz neoplodjenih trutovi (**Winston, 1991; Higes i sar., 2008**). Mlade pčele radilice ostaju u košnici i prvi posao koji obavljaju (u uzrastu od tri do pet dana) je čišćenje ćelija saća i delova košnice. Odmah posle toga (od šestog dana starosti), one hrane starije pčelinje larve mešavinom meda, polena i vode, a u to vreme i same jedu puno polena što im omogućava razvoj hipofaringealnih žlezda i lučenje mleča. Sa matičnim mlečom one hrane mlade pčelinje larve i maticu (**Loidl i Crailsheim, 2001**). Kada nema legla (kraj oktobra-novembar) umesto mlečnih žlezda razvija se masno-belančevinasto tkivo koje pčeli omogućava duži život. Kod pčela starosti od 12 dana razvijaju se voskove žlezde, pa one grade saće ako u košnici ima praznog prostora. Uz proizvodnju voska, pčele radilice ove starosti greju leglo, preuzimaju hranu od starijih pčela sakupljačica, te je prerađuju i skladište kao rezervnu hranu u saće, provetravaju košnicu, a rade i druge poslove ukoliko se ukaže potreba. Od 18. do 21. dana starosti pčele radilice sve se više primiču letu i pomalo izleću iz košnice, osmatraju okolinu i obavljaju funkciju stražarica. Nakon toga postaju pčele sakupljačice i iz prirode donose nektar, polen, vodu i po potrebi

propolis (Stanimirović i sar., 2000; Page i sar., 2006). Pčele izletnice, kada se vrate sa paše u košnicu, predaju nektar pčelama koje su zadužene za skladištenje, a one ga odlažu unutar ćelija saća (Wright i sar., 2017). Kroz intenzivnu aktivnost kućnih pčela u toku narednih dana iz nektara će biti oslobođen višak vode, a saharoza će pod uticajem enzima invertaze biti pretvorena u proste šećere glukozu i fruktozu. Tako prerađen nektar konačno postaje med koji pčele pokrivaju finim belim voštanim poklopcima (Matheson i Reid, 2011).

Na teritoriji Srbije postoje dve podvrste medonosne pčele, *Apis mellifera carnica* and *A. m. macedonica* (Stevanovic i sar., 2010). Obe podvrste pripadaju C filogenetskoj liniji na osnovu morfometrijskih i DNK analiza (Stevanovic, 2002; Kozmus i sar., 2007). Istraživanja diverziteta medonosne pčele na teritoriji Srbije obavljena su najpre primenom citogenetičkih, morfometrijskih i bihejvioralnih parametara i ukazala su na genetičku i fenotipsku varijabilnost, odnosno na postojanje lokalno adaptiranih populacija - ekotipova (Stanimirovic i sar., 1999a,b; 2002; 2005a,b; Stevanovic, 2002; 2007). Nakon toga, istraživanja diverziteta pčela *A. mellifera* proširena su na susedne zemlje u okviru Balkanskog poluostrva, ali su analize radene na nivou DNK, odnosno korišćenjem molekularnih markera (Stevanovic i sar., 2010).

Analizom sekvenci tRNA_{Leu-cox2} (COI-COII) intergenskog regiona mitohondrijalne DNK (mtDNK), kao i dodatnog CO-I gena mtDNK otkriveni su polimorfizmi na osnovu kojih je uspostavljena PCR-RFLP metoda za diskriminaciju podvrsta *A. m. carnica* i *A. m. macedonica*. Primenom te metode, dobijeni su rezultati koji su ukazali da je na teritoriji Balkana potpuno drugačije rasprostranjenje navedenih podvrsta u odnosu na ranije važeće stavove, odnosno da je rasprostranjenje *A. m. macedonica* daleko veće nego što se ranije smatralo. Naime, ova biogeografska proučavanja otkrila su da se granica rasprostranjenja *A. m. macedonica* na teritoriji Balkana pruža mnogo severnije od ranije postavljene (Stevanovic i sar., 2010), jer su pčele ove podvrste utvrđene na čitavoj teritoriji Bivše Jugoslovenske Republike Makedonije (BJRM), ali i u velikom delu Srbije (istočnom, južnom i jugozapadnom).

Dalja ispitivanja genetičkog, odnosno molekularnog diverziteta *A. mellifera* u Srbiji analizom mitohondrijalne DNK (mtDNK) obuhvatila su analizu pčela sa 37

lokaliteta u Srbiji. Uzorkovanje je obavljeno u regionima u kojima su ranije opisani ekotipovi: Banatskom, Sjeničko-Peštarskom i Timočkom, ali dodatno i u jugoistočnom regionu. Kao referentni uzorci, analizirane su i pčele iz 24 društava poreklom iz Italije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Makedonije i Albanije. Rezultati su ukazali na postojanje sedam haplotipova *A. mellifera* iz C filogenetske linije. Dva haplotipa su prvi put opisana, C2o (zaveden u Genskoj bazi pod pristupnim brojem JQ977704) i C2p (zaveden u Genskoj bazi pod pristupnim brojem JQ977705.1). Oba novoopisana haplotipa imaju ograničeno rasprostranjenje (C2o u Banatskom regionu, a C2p u Sjeničko-Peštarskom regionu), i prema dosadašnjim saznanjima, oni su autohtona za Banatski, odnosno Sjeničko-Peštarski ekotip (**Muñoz i sar., 2012**). U svim analiziranim regionima Srbije utvrđena je mešavina haplotipova *A. mellifera* u različitim kombinacijama i sa različitom učestalošću: u Banatskom regionu četiri haplotipa, C2d (0,615), C2e (0,231), C2i (0,077) i C2o (0,077); u Timočkom takođe četiri, C1a (0,167), C2c (0,167), C2d (0,500) i C2i (0,167); u Sjeničko-Peštarskom tri, C2d (0,400), C2e (0,400) i C2p (0,200), a u jugoistočnom regionu samo dva haplotipa C2d (0,750), C2e (0,250). Najrasprostranjeniji haplotip u Srbiji je C2d. Visoka učestalost haplotipa C2d u svim analiziranim regionima Srbije, kao i nalaz haplotipa C2i, ukazuju na prirodnu migraciju podvrste *A. m. macedonica* iz južnih zemalja, Grčke, Makedonije i Albanije za koje su ti haplotipovi karakteristični. Drugi po zastupljenosti u Srbiji je haplotip C2e, karakterističan za podvrstu *A. m. carnica* u Hrvatskoj. Nalaz haplotipa C1a u Timockom regionu ukazuje na introgresiju pčela *A. m. ligustica* iz Italije, najverovatnije putem komercijalne trgovine maticama (**Muñoz i sar., 2012**). Dobijeni rezultati ukazuju da je molekularnu diverzitet *A. mellifera* u Srbiji znatno veći u odnosu na susedne zemlje u kojima su obavljane ovakve analize (jedan haplotip u Makedoniji, dva u Albaniji i četiri u Hrvatskoj).

Smanjenje populacije pčela je zabeleženo širom sveta, a kao uzroci ovih gubitaka najčešće su navođeni pčelinji patogeni i paraziti (**Cox-Foster i sar., 2007; Meixner, 2010; Potts i sar., 2010; vanEngelsdorp i sar., 2009b**). U Srbiji, ti gubici se kreću u opsegu 15–35% (**Brodshneider i sar., 2018**). U naučnom svetu se smatra da u osnovi gubitaka pčelinjih društava leži hronična izloženost multiplim stresorima koji međusobno interaguju ili deluju sinergistički. Gubici pčelinjih

zajednica su se dešavali i ranije, **Oldroyd (2007)** je opisao da je na Ostrvu Vajt (Engleska) 1906. godine stradala celokupna populacija pčela. Slično se desilo i u SAD, gde je zbog teške zime 1903. godine u Juti stradalo 2000 društava, a u Pensilvanije je 1995. godine stradalo 50% pčelinjih društava (**Oldroyd, 2007**). Na Floridi u oktobru 2006. godine pčelar je na svom pčelinjaku zatekao 368 od 400 košnica gotovo praznih. U košnici je ostala matica, nekoliko mladih pčela i zatvoreno leglo, prisutne rezerve hrane su bile adekvatne, a u košnici kao ni oko košnice nije bilo uginulih pčela (**Stokstad, 2007**). Ovaj nestanak pčela je bio prvi zabeleženi slučaj fenomena koji danas nazivamo sindrom iznenadnog neobjašnjivog uginjavanja pčelinjih zajednica (engl. *Colony Collapse Disorder* - CCD) (**Stokstad, 2007**). Ovaj prvi zabeležen slučaj CCD sindroma iz 2006. godine opisali su **Cox-Foster i sar. (2007)** kao pojavu kod društava koje brzo gube veliki broj odraslih pčela, dok u košnici ostaje matica sa nekoliko pčela koje opslužuju nju i leglo, rezerve hrane mogu da budu prisutne, a uginulih pčela nema unutar kao ni u okolini košnice (**vanEngelsdorp i sar., 2009b**). Da bi bolje razumeli CCD **vanEngelsdorp i sar. (2009b)** su upoređivali fiziologiju, količinu patogena i pesticida između društava kod kojih je utvrđen CCD sindrom i zdravih društava. Društva sa CCD sindromom imala su veću opterećenost patogenima, pokazuju veću ko-infekciju, kao i manju jačinu od očekivane. Uprkos svim ovim zapažanjima, uzrok CCD-ja nije utvrđen i ne može se pripisati jednom faktoru (**vanEngelsdorp i sar., 2009a**).

Tokom poslednjih 10 godina sprovedena su brojna proučavanja radi otkrivanja uzroka velikih gubitaka pčelinjih društava, ali nijedan faktor nije potvrđen kao jedini ili primarni uzrok ovog fenomena. Zbog toga je u naučnom svetu postignuta saglasnost da se u osnovi gubitaka pčelinjih društava nalazi hronična izloženost multiplim stresorima koji međusobno interaguju ili deluju sinergistički - patogeni mikroorganizmi, paraziti i štetočine pčela, izloženost pesticidima, smanjena pčelinja paša i loša pčelarska praksa (**Neumann i Carreck, 2010; Goulson i sar., 2015**). Kao najčešći uzroci zimskih gubitaka pčelinjih društava u većini evropskih zemalja navode se parazit *Varroa destructor* i virusne infekcije (**Le Conte i sar., 2010; Mutinelli i sar., 2010; Genersch i sar., 2010; Dainat i sar., 2012; Francis i sar., 2013**), dok se mediteranskim zemljama mikrosporidija *Nosema ceranae* smatra ključnim faktorom gubitaka društava

zabeleženih tokom poslednje decenije (**Martín-Hernández i sar., 2007; Higes i sar., 2009, 2010; Cepero i sar., 2015**).

Iznenadno uginuće i smanjenje broja pčela u društvu pripisivani su i koinfekciji virusima i vrstom *N. ceranae* (**Bacandritsos i sar., 2010**), što je veoma rasprostranjeno u zemljama južne Evrope (**Bacandritsos i sar., 2010; Mutinelli i sar., 2010; Tlak-Gajger i sar., 2014; Martín-Hernández i sar., 2012**) uključujući Srbiju (**Stevanovic i sar., 2011, 2013, 2016; Simeunovic i sar., 2014**).

Istraživanje uzroka gubitaka društava u Španiji 2013. godine pokazalo je da su društva sa CCD sindromom imala značajno viši nivo infekcije patogenom *Nosema ceranae* u odnosu na kontrolna. Dokazi upućuju da su visoki nivoi patogena, kao i ko-infekcije, bili mnogo češći u pčelinjacima sa CCD sindromom (**Cepero i sar., 2015**).

2.2. Parazitske tripanozome pčela

Evropska medonosna pčela *Apis mellifera* izložena je brojnim patogenima od kojih preovladavaju crevni paraziti mikrosporidije roda *Nosema* (*N. ceranae*, *N. apis* i *N. neumanni*) i tripanozome (*C. mellifica* i *L. passim*). To su jednoćelijski eukarioti, obligatni intracelularni paraziti veoma česti kod odraslih pčela (**Runckel i sar., 2011; Cornman i sar., 2012, Schwarz i Evans, 2013**). Međutim, za razliku od mikrosporidija, o čijoj se rasprostranjenosti i uticaju na pčele (**Fries, 2010; Higes i sar., 2010, 2013; Stevanovic i sar., 2011, 2013; Botías i sar., 2013**) dosta zna, o značaju tripanozoma za pčele postoji veoma malo informacija (**Cornman i sar., 2012; Schwarz i Evans, 2013; Ravoet i sar., 2013**).

Tripanozome su jednoćelijski bičari i kao obligatni paraziti inficiraju različite domaćine uključujući kičmenjake, biljke i insekte (**Barret i sar., 2003; Maslov i sar., 2013**). Ovi paraziti imaju neobičnu strukturu mitohondrija koja sadrži više kopija primarnog mitohondrijalnog genoma i hiljade kopija pomoćnih gena na kratkim kružnim molekulima (**Lukeš i sar., 2002; Aslett i sar., 2010; Maslov i sar., 2013**). Oblik promastigota može biti od lancetastog do kruškolikog, imaju jedan slobodan bič (lat. flagellum) koji nema membranu, a koja se ubacuje u flagelarni

džepni otvor na širem, zaobljenom prednjem delu ćelije. Njihova dužina se kreće oko 7.44 μm (4.66 - 11.40 μm), a širina oko 3.15 μm (1,50-4,65 μm). Promastigoti su dorzo-ventralno spljošteni i imaju dubok žleb. Kinetoplast se nalazi ispred jedra. Kratak spikulum često se javlja na otvoru džepa koji se nalazi pored flagele, a koji je vidljiv samo pomoću elektronske mikroskopije. Sferoidne forme (veliĉine = 3-4 μm) oblažu zid crva u jednom sloju i često se mogu videti u gustim agregatima, naroĉito meĉu rektalnim papilama (prednji deo rektuma) kao i u kaudalnom delu ileuma. Takoĉe se mogu videti polimorfne ćelije, od forme promastigota do sferoidnog oblika (**Schwarz i sar., 2015a**). Tripanozome postoje u razliĉitim taksonima insekata, kod kojih najĉešće parazitiraju u srednjem i zadnjem crevu (**Maslov i sar., 2013**). Posebnu paŹnju privlaĉe tripanozome pronaĉene kod razliĉitih vrsta Hymenoptera, naroĉito kod pĉela i bumbara, jer je poslednjih godina otkriven negativni uticaj tripanozoma na ponašanje, fiziologiju, izdrŹljivost i imuni sistem ovih znaĉajnih polinatora (**Brown i sar., 2003; Gegear i sar., 2005; Runckel i sar., 2011; Ravoet i sar., 2013; Schwarz i Evans, 2013**). Infekcija pĉela i bumbara tripanozomama nastaje fekalno-oralnim putem (**Ruiz-González i Brown, 2006; Runckel i sar., 2014**).

Tripanozome su intenzivno prouĉavane kod bumbara. *Crithidia bombi* je njihov parazit kojije ĉesto je model za prouĉavanje interakcije domaćin-parazit (**Koch i Schmid-Hempel, 2011**). Prvo se smatralo da je uticaj *C. bombi* na bumbare u Švajcarskoj zanemarljiv, meĉutim, kada su bumbari pod stresom, dolazi do ispoljavanja štetnih efekta parazitizma (**Brown i sar., 2003; Yourth i sar., 2008**). Štetan efekat *C. bombi* se ogleda u vidu smanjene sposobnosti bumbara za sakupljanje polena, smanjenog rasta i većeg mortaliteta (**Koch i Schmid-Hempel, 2011**). Dalja istraŹivanja su otkrila da inficiranim bumbarima treba više vremena da pristupe nektaru, kao i da infekcija moŹe uticati na njihovu sposobnost da u proleće osnuju novu koloniju (**Brown i sar., 2003; Gomez-Moracho i sar., 2017; Yourth i Schmid Hempel, 2006**).

Za razliku od bumbara, u društvima medonosne pĉele, koja ne uginu tokom zimskih meseci, moŹe se povećati koliĉina infekta u košnici tokom zime i proleća. Generalno posmatrano najveći broj gubitaka pĉelinjih društava se dešava zimi (**Yourth i Schmid-Hempel, 2006**). Kod evropske medonosne pĉele opisane su dve

vrste parazitskih tripanozoma: *Crithidia mellifica* Langridge and McGhee, opisana pre skoro pet decenija u Australiji (**Langridge i McGhee, 1967**) i druga, nedavno opisana *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 (**Schwarz i sar., 2015a**).

Poznato je da tripanozome imaju negativan efekat na bumbare, pa su poslednjih godina postale čest predmet interesovanja sa ciljem da se utvrdi njihov uticaj na gubitke pčelinjih društava širom sveta. Istraživanje **Cox-Foster i sar. (2007)** u SAD na društvima u kojima je utvrđen CCD otkrilo je prisustvo nekoliko patogena među kojima su bile i tripanozome. Vrsta u tom trenutku nije mogla da se odredi pa su označene kao *Leptomonas-Crithidia* (**Cox-Foster i sar., 2007**). Naknadna studija **Evans i sar. (2009)** u kojoj su analizirani uzorci iz košnica pogođenih CCD sindromom tokom zime 2007-2008. u SAD otkrila je da su tripanozome bile prisutne u svim uzorcima, kako u kontrolnim, tako i društvima pogođenim CCD-jem.

Istraživanje **Runckel i sar. (2011)** imalo je za cilj identifikaciju patogena kojim su pčelinja društva uobičajeno opterećena. Za tu svrhu prikupljeni su uzorci pčela od 20 košnica u periodu od aprila 2009. do januara 2010. godine. Identifikovana *C. mellifica* u svim uzorcima, a najveći intenzitet infekcije utvrđen u januaru 2010. godine. Nije ustanovljena korelacija između prisustva *C. mellifica* i gubitka društava, dok je infekcija vrstama *N. ceranae* i *C. mellifica* bila u pozitivnoj korelaciji. Ova korelacija, kao i poznati štetni efekti *C. bombi* na društva bumbara, ukazala su na važnost daljih istraživanja efekata tripanozoma na zdravlje pčelinjih zajednica (**Runckel i sar., 2011**). U revijalnom radu **Evans i Schwarz (2011)** obrazložili su potrebu da se ispita dinamika populacije, prevalencija i efekat tripanozoma, odnosno *C. mellifica* na pčele.

Ubrzo nakon identifikacije *C. mellifica* kao potencijalnog faktora koji remeti zdravlje i kondiciju pčelinjih društava, istraživanje **Cornman i sar. (2012)** imalo je za cilj da utvrdi prisustvo patogena u pčelinjim društvima. U njihovom istraživanju pronašli su tripanozome i u društvima koja su bila pogođena CCD sindromom i u nepromenjenim društvima. Tada su tripanozome pogrešno identifikovane i prikazane kao *C. mellifica*. Navedeno je da su one najverovatnije blisko srodne sa vrstana tripanozoma rodova *Leishmania* i *Leptomonas*, što je

ukazalo da su potrebni mnogo precizniji testovi za determinaciju rodova i vrsta tripanozoma (**Cornman i sar., 2012**).

U Belgiji su se tokom 2011-2012. desili veliki gubici pčelinjih društava sa skoro 50% izgubljenih zajednica. Istraživanje **Ravoet i sar. (2013)** je bilo prvo koje je preispitalo arhivske uzroke pčela kako bi se detektovali mogući uzroci CCD-ja. Utvrđeno je prisustvo *Varroa destructor* kao jednog od faktora koji najviše dobrinosi pojavi ovog sindroma, a daljom analizom je otkriven negativni sinergizam između *Varroa destructor*, *N. ceranae* i *C. melliferae*. U ovoj studiji je zaključeno da je prisustvo *C. melliferae* jedan od faktora koji je u Belgiji doveo do zimskog uginuća pčela (**Ravoet i sar., 2013**).

Ponovnim ispitivanjem arhivskih uzoraka pčela iz Japana od aprila 2007. do februara 2012. godine otkrivena je *C. melliferae* u evropskoj medonosnoj pčeli, dok kod azijske pčele *Apis ceranae* to nije bio slučaj (**Morimoto i sar., 2012**). Istraživanje urađeno u Kini od novembra 2011. do septembra 2012. godine, u kojem je prvi put detektovana *C. melliferae* kod *A. ceranae*, pokazalo je da ova kritidija može da inficira više od jedne vrste pčela (**Yang i sar., 2013**). Analizom uzoraka pčela iz Italije i Španije takođe je identifikovana *C. melliferae* (**Cepero i sar., 2014**, **Cersini i sar., 2015**). Dalja analiza GAPDH gena pčela iz Španije ukazala je na veliku genetičku distancu između njih i izvornog soja ATCC30254 iz Australije (**Langridge i McGhee, 1967**). Ovo je ukazalo na to da analizirani uzorci mogu pripadati potpuno drugom taksonu, te zahtevaju reklasifikaciju (**Cepero i sar., 2014**). Indicija o potrebnoj reklasifikaciji tripanozoma iz španskih uzoraka pčela navela je istraživače laboratorije za pčele u Merilendu na klasifikaciju u dve vrste **Schwarz i sar. (2015a)**. U ovom istraživanju je upoređena izvorna kultura TCC30254 iz 1967. godine sa BRL i San Francisco (SF) sojevima. Time je otkrivena nova vrsta *L. passim*. Novoidentifikovana *L. passim* imenovana je u čast entomologa dr Ruth Lotmar (**Schwarz i sar., 2015a**).

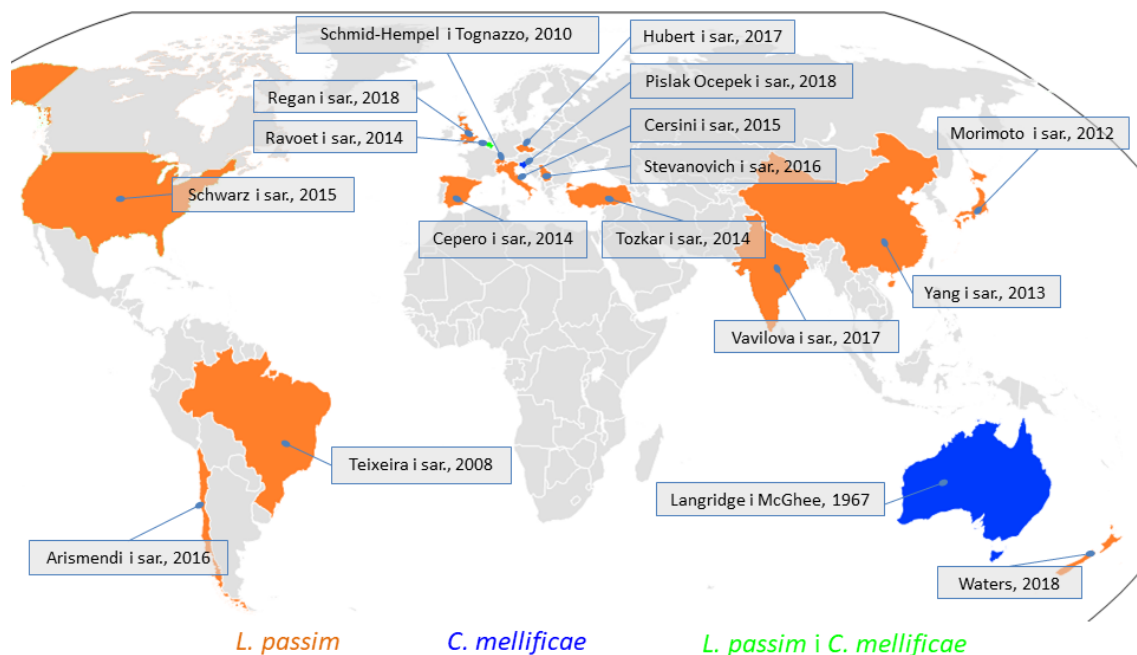
Od karakterizacije *L. passim* kao nove vrste, uzorci iz Amerike (**Cox-Foster i sar., 2007**; **vanEngelsdorp i sar., 2009a**; **Runckel i sar., 2011**; **Cornman i sar., 2012**), Švajcarske (**Schmid-Hempel i Tognazzo., 2010**), Kine (**Yang i sar., 2013**), Japana (**Morimoto i sar., 2013**), Španije i Turske (**Cepero i sar., 2014**; **Ravoet i sar., 2015**) koji su primarno bili identifikovani kao *C. melliferae*, reklasifikovani su

jer su analize sekvenci (deponovane u Genskoj bazi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) pokazale da se u svim slučajevima radilo o vrsti *L. passim*. Ovi rezultati ukazuju da je zapravo *L. passim* dominantna vrsta tripanozoma u pčelinjim zajednicama širom sveta, a ne *C. mellifcae*, kako se ranije smatralo (Schwarz i sar., 2015b). U skladu sa tim otkrićem, proizilazi da su gubici pčela u Americi (Cornman i sar., 2012) i Belgiji (Ravoet i sar., 2013), inicijalno protumačeni kao posledica parazitizma vrstom *C. mellifcae*, zapravo bili izazvani vrstom *L. passim*.

Zbog toga je značajno razlikovanje ove dve vrste tripanozoma. Prvobitno, njihova identifikacija je bila moguća samo opsežnim molekularnim analizama (sekvencioniranjem) i proučavanjem njihove ultrastrukture putem skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM) i transmisiona elektronske mikroskopije (TEM), odnosno kombinovanjem tih metoda koje su komplikovane, vremenski zahtevne i skupe (Schwarz i sar., 2015a). Nisu postojali vrsno specifični prajmeri koji bi omogućili razlikovanje *C. mellifcae* i *L. passim* elektroforezom PCR produkata bez sekvencioniranja. Prvi prajmeri su omogućavali dobijanje amplikona koji su se između vrsta tripanozoma vrlo malo razlikovali u veličini, odnosno broju baznih parova (*fragment length polymorphism*). Ti prajmeri su bili komplementarni regionima unutar *internal transcribed spacer region-1* (ITS-1) lokusa (Ravoet i sar., 2015) te su doveli do umnožavanja DNK svih prisutnih vrsta tripanozoma koje se mogu naći u pčelama (*L. passim*, *C. mellifcae*, *C. bombi* i *C. expoeki*). ITS region *L. passim* i *C. mellifcae* je jako varijabilan, sa 33,5% do 35,3% interspecijskom varijabilnošću i do 2% intraspecijskom varijabilnošću (Schwarz i sar., 2015a). Primenom tih prajmera nakon amplifikacije nije moguće gel elektroforezom jasno razlikovati vrste *C. mellifcae* i *L. passim*, jer su njihovi amplikoni približno iste veličine (~140 bp). Osim toga, u uslovima mešovite infekcije navedeni prajmeri nisu obezbeđivali jasan rezultat zbog velike mogućnosti preklapanja amplikona ove dve vrste, kao i zbog preferencijalne amplifikacije one vrste koja je više zastupljena u uzorku ili vrste koja ima manje polimorfizama zbog čega se prajmeri bolje podudaraju. Zbog svega navedenog, rezultati dobijeni primenom navedenih prajmera su bili nepouzdati i za dobijanje rezultata bila je neophodna potvrda sekvencioniranjem amplikona (Schwarz i sar., 2015a).

Rezultati istraživanja iz Čilea i Srbije ukazuju da *L. passim* predstavlja dominantni tripanozomu kod *A. mellifera* u ovim regionima (Arismendi i sar., 2016, Stevanovic i sar., 2016). Podaci iz Švajcarske o interakciji patogena, nisu pokazali korelaciju između *L. passim* i *Nosema* spp. Tritschler i sar. (2017) koja je ranije opisana u istraživanjima o *C. mellifica* u SAD (Evans i Schwarz, 2011; Tritschler i sar., 2017).

Zbog indikacija da tripanozome mogu uticati na zdravlje pčela (Cornman i sar., 2012, Ravoet i sar., 2013) i problema velikih gubitaka gajenih pčela *A. mellifera* širom sveta (Goulson i sar., 2015, Lee i sar., 2015), kao i činjenice da u većini evropskih zemalja nije nikada ispitano prisustvo tripanozoma kod pčela (Slika 1), potrebna su dodatna istraživanja.



Slika 1. Prisustvo *Lotmaria passim* i *Crithidia mellifica* u svetu

2.3. Mikrosporidijalni paraziti pčela

Nosema spp. su mikrosporidije koje parazitiraju kod insekata i drugih beskičmenjaka (Agnew i sar., 2003; Li i sar., 2016). Kako bi sebi obezbedili energiju i hranljive materije mikrosporidijama su potrebne ćelije domaćina. Zbog

toga su one intracelularni paraziti koji koriste energiju poreklom od mitrohondrija domaćina (**Li i sar., 2016**). Životni ciklus mikrosporidija počinje u vidu spore od koje počinje ciklus reprodukcije. Ovi jednoćelijski obligatni, intracelularni paraziti se van ćelije domaćina nalaze isključivo u vidu metaboličkih neaktivnih spora (**Mehlhorn, 2008**). Ove spore predstavljaju infektivni oblik svih mikrosporidija, a njihovom ingestijom dolazi do infekcije domaćina. Kada se ispune određeni uslovi, kroz akvaporine spora uzima vodu, a to za posledicu ima uvećanje posteriornih vakuola i povećanje intracelularnog pritiska. Usled toga dolazi do pucanja zida vakuole i proturzije membranozne organele označene kao polarni filament. On probija ćelijsku opnu domaćina, a zatim se kroz njega prenosi sporoplazma u citoplazmu ćelije domaćina. Time započinje bespolno razmnožavanje (**Franzen 2005**). Mikrosporidije u unutrašnjosti ćelije domaćina prolaze kroz proces šizogonije, merogonije i sporogonije. Sam razvoj ovog parazita se može odvijati u citoplazmi ćelije domaćina, kao i u parazitofornim vakuolama, za koje se još uvek pouzdano ne zna da li se stvaraju u toku ili nakon invazije parazita. Invazija mikrosporidijama rezultira destrukcijom ćelije domaćina, oslobađanjem spora u vanćelijski prostor i početkom novog ciklusa razmnožavanja. U nekim slučajevima spore mogu migrirati i u druge delove tkiva domaćina, međutim, nije jasno da li se spore na ovim mestima mogu razmnožavati (**Copley i Jabaji, 2012**). Opšte je poznato da se mikrosporidije prilagođavaju domaćinu, te da je tokom evolucije formiran odnos parazit-domaćin koji obezbeđuje preživljavanje oba organizma (**Agnew i sar., 2003**). Kada parazit inficira novu vrstu domaćina, ne postoji koevolutioni odnos i parazit može ubiti domaćina, sa kojim ranije nije imao kontakta (**Le Conte i sar., 2010**).

Pčele izleznice svojim hitinskih dlačicama mogu pokupiti spore *Nosema* spp. koje na taj način dospevaju u košnicu (**Paxton i sar., 2007**). Tokom čišćenja tela, spore dospevaju u digestivni trakt pčele, a zatim u srednjem crevu ključaju i nastaju pokretne forme parazita sa bičem. Osim što bič obezbeđuje pokretljivost, on služi i za inficiranje epitelnih ćelija domaćina (**Higes i sar., 2007; Holt i Grozinger, 2016**). Spore parazita *Nosema* spp. mogu ostati u srednjem crevu pčele kako bi uzele hranljive materije za reprodukciju, a zatim preko fecesa napuštaju domaćina (**Chen i sar., 2009**). Negativni efekti nastaju kako paraziti nastavljaju sa razmnožavanjem,

što se ogleda kroz skraćen životni vek pčela usled energetskog iscrpljivanja, smanu sposobnost letenja, a sve to za posledicu ima nemogućnost vraćanja pčela u košnicu (**Holt i Grozinger, 2016**).

Još 1909. godine u Evropi je kod *A. mellifera* primećena *Nosema apis*, koja je danas raširena širom sveta (**Fries i sar., 2006**). Iako se ne smatra visokovirulentnom može skratiti životni vek pčele, slabeći tako visokoinficirana društva (**Klee i sar., 2007**). *N. ceranae* je prvi put opisana kod azijske medonosne pčele *A. ceranae* 1994. godine (**Chen i sar., 2009; Fries i sar., 1996**). Istraživanje koje je urađeno u Evropi ukazuje da je još od 1998. godine *N. ceranae* inficirala *A. mellifera* (**Paxton i sar., 2007**). Identifikacija *N. ceranae* kod evropske medonosne pčele ukazuje da je moguća ko-infekcija obema vrstama *Nosema* (**Klee i sar., 2007**).

Kako je objašnjeno u jednoj studiji (**Martín-Hernández i sar., 2011**), *N. ceranae* nije ko-evoluirala sa *A. mellifera*, a metaboličke potrebe *N. apis* koja inficira pčele još od početka 20. veka nisu iste. Povećana potreba za hranom kod pčela koje su inficirane vrstom *N. ceranae* ukazuje da je ovom parazitu potrebno više energije za razmnožavanje. Energetski stres može smanjiti životni vek pčela i degradirati epitel zida creva domaćina (**Martín-Hernández i sar., 2011**).

Pošto *Nosema* spp. inficiraju srednje crevo pčela, pretpostavljeno je da u slučaju mešovite infekcije obema vrstama dolazi do kompeticije za resurse domaćina (**Cornman i sar., 2012**). Klinička studija (**Forsgren i Fries, 2010**) u kojoj su pčele bile ko-inficirane vrstama *N. apis* i *N. ceranae* ne pokazuje jasnu prednost ni jedne od njih. Istraživanje **Natsopoulou i sar. (2015)** u kome su novoizležene pčele inficirane obema vrstama roda *Nosema* pokazalo je da između njih dolazi do kompeticije kada infekcija nastaje u različito vreme. Prva vrsta koja je inficirala domaćina inhibirala je rast druge, kojom je naknadno obavljeno inficiranje. Takođe je otkriveno da *N. ceranae* jače inhibirala rast *N. apis* nego obrnuto.

Kako *N. ceranae* inficira tkiva izvan creva, kao što su mozak i hipofaringealne žlezde, ovo može dovesti do višeg ukupnog nivoa infekcije, jer postoji veći broj tkiva koja ova vrsta inficira u odnosu na *N. apis* (**Gisder i sar., 2010**). Infekcija sa ove dve mikrosporidije je pokazala dominaciju *N. ceranae* ili sumnju na zamenu *N. apis* sa *N. ceranae* u istraživanjima (**Gisder i sar., 2010**). Međutim, rezultati **Stevanovic i sar. (2011)** i **Martín-Hernández i sar. (2012)** nisu

podržali ovu teoriju, tako da su potrebna dodatna istraživanja epizootiologije *Nosema* spp. kao i drugih patogena pčela (**Dainat i sar., 2012; Gisder i sar., 2017**).

Ispitivanje odnosa domaćin-parazit između pčela *Apis mellifera* i mikrosporidija roda *Nosema* podrazumevalo je najpre određivanje podvrste i ekotipa domaćina, odnosno vrste mikrosporidijalnih *Nosema* parazita. Na teritoriji balkanskih zemalja DNK analize pokazale su da ravnopravno egzistiraju dve podvrste medonosne pčele *A. mellifera* (*A. m. carnica* i *A. m. macedonica*) i jedna vrsta mikrosporidijalnog parazita, *Nosema ceranae* (primenom „PCR-RFLP“ i „duplex PCR“ metoda) jer je u periodu 2006-2012 na teritoriji Crne Gore, Bosne i Hercegovine i Bivše Jugoslovenske Republike Makedonije (BJRM), u 100% zaraženih uzoraka utvrđena isključivo vrsta *N. ceranae*. Kod pčela iz Srbije (1028 uzorka) samo je u jednom uzorku (iz 2008. godine iz opštine Sombor) utvrđena vrsta *N. apis*, a u svim ostalim detektovana je isključivo vrsta *N. ceranae*. U svim dodatno analiziranim arhivskim uzorcima iz perioda 2000-2005 (iz veterinarskih instituta u Srbiji) utvrđena je samo *N. ceranae*. U celokupnom periodu (2000-2013) nije zabeležen ni jedan slučaj mešovite infekcije *N. ceranae* / *N. apis*. Ovim nalazima potvrđeno je da vrsta *N. ceranae* kao endoparazit medonosne pčela dominira u Srbiji najmanje 13 godina i te se ne može smatrati novopojavnim parazitom na ovim prostorima. Istovremeno, rezultati pobijaju dugogodišnje pretpostavke da u Srbiji dominira podvrsta pčela *A. m. carnica* i da je *N. apis* ranije bila prevalentna vrsta mikrosporidijalnih patogena pčela (**Stevanovic i sar., 2011**).

U sledećem radu, ispitivane su karakteristike infekcije parazitom *N. ceranae* na ukupno 200 društava sa 20 pčelinjaka raspoređenih širom Srbije (**Stevanovic i sar., 2013**). U tim društvima nije bilo drugih pčelinjih patogena, dok je *Varroa* držana pod kontrolom regularnom primenom registrovanih akaricida. Praćena je učestalost infekcije parazitom *N. ceranae*, kao i simptomi i posledice te infekcije tokom 5 godina, odnosno u periodu 2008-2012 (**Stevanovic i sar., 2013**). Učestalost *N. ceranae*-pozitivnih društava bila je kontinuirano visoka tokom svih pet godina (u godišnjem opsegu od 73% do 98%). Najveća učestalost je uvek bila u martu i kretala se od 94% (2008) do 98% (2010). Niže, ali ipak veoma visoke vrednosti *N. ceranae*-inficiranih društava utvrđene su u oktobru (76–87%) i junu (73–91%). Pri tome, statističkom analizom (χ^2 -kvadrat testom) utvrđeno je da se učestalost pojave *N.*

ceranae između marta, juna i oktobra značajno razlikuje ($p < 0,01$), što je ukazalo na sezonalnost nozemoze kod pčela u Srbiji. U istom petogodišnjem periodu nije utvrđena kauzalnu vezu *N. ceranae* infekcije sa uginućima (kolapsom) pčelinjih zajednica, obzirom da između preživelih i uginulih društva nije bilo značajne razlike u zastupljenosti *N. ceranae*-inficiranih društava, kako tokom zime (kada je 24-50% društava uginulo), tako i tokom leta (kada je zabeležen daleko manji mortalitet, 1.5-4%). U većini društava inficiranih parazitom *N. ceranae* u Srbiji, uočeni su simptomi koji se tradicionalno pripisuju vrsti *N. apis* (fekalne mrlje, uginule i puzeće pčele oko košnice). Navedeni simptomi nozemoze uočavani su i kod društva koja su preživljavala (91,6-100,0%) i kod onih koja su uginula (77,6-100,0%), čak statistički značajno češće kod preživelih u periodu 2010-2012. Isto važi i za dodatne simptome koji su uočeni tokom zime kod *N. ceranae*-inficiranih društava: rastresito klube tokom hladnih zimskih dana (do -5°C), nasuprot kompaktnom klubetu kod društava koja nisu inficirana; veća uznemirenost pčela pri umerenim zimskim temperaturama (0°C ili malo iznad 0°C), što je zapaženo na osnovu neobično većeg broja pčela na letu košnice nakon zvučnog uznemiravanja (kuckanja). Na osnovu svih navedenih rezultata zaključeno je da nozemoza u Srbiji nije „tip C“, koji su Španski istraživači prethodno opisali kao karakterističan za *N. ceranae*, kao i da ne postoje simptomi koji mogu služiti kao markeri za predviđanje kolapsa pčelinjih društava (Stevanovic i sar., 2013).

U praćenju odnosa domaćin-parazit između pčela *Apis mellifera* i mikrosporidija roda *Nosema* od velikog značaja je odabir uzorka i metode za detekciju parazita i utvrđivanje stepena infekcije. Poređenjem uzoraka fecesa, mrtvih pčela i živih pčela u dijagnostici nozeme, utvrđeno je da je feces najadekvatniji uzorak ukoliko je dostupan. Uzorci fecesa su pokazali apsolutnu pouzdanost, obzirom da je u svim uzorcima (100%) utvrđena nozema i mikroskopskim pregledom i PCR metodom. Mrtve pčele nisu bile adekvatne za dijagnostiku jer su dale lažno-negativni rezultat i pod mikroskopom i pri PCR analizi, obzirom da su u 12% žive pčele i feces iz istih društava bili pozitivni na nozemu. Žive pčele su pouzdane 100% ako se analiziraju PCR metodom, a 95% pri mikroskopskom pregledu (Stevanovic i sar., 2013). Obavljena su i poređenja pouzdanosti tradicionalne mikroskopske metode i dve PCR metode: simpleks- i dupleks-PCR.

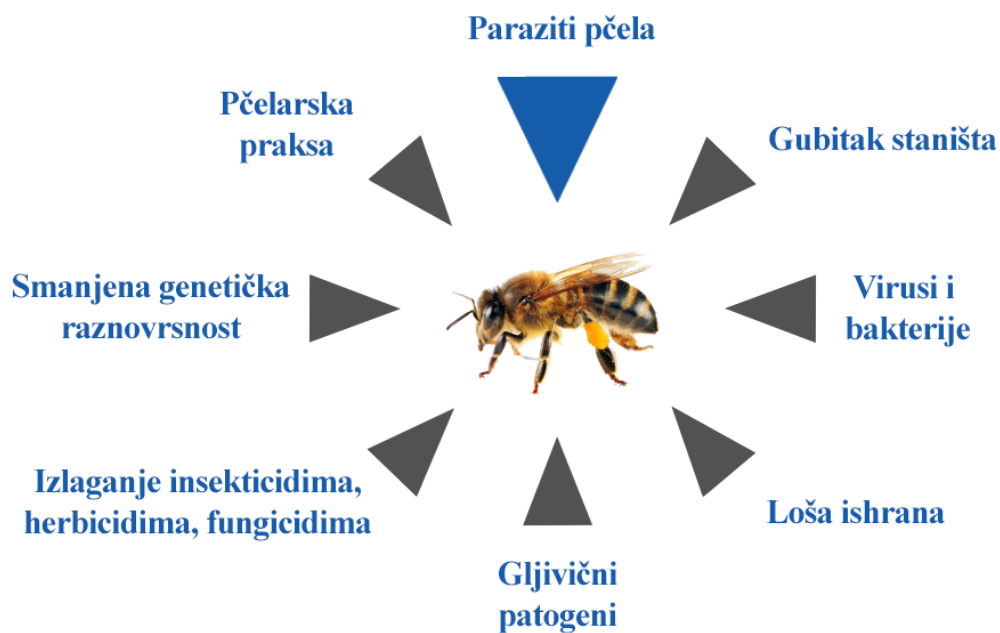
Mikroskopskim pregledom *Nosema* spore detektovane su u 68,7% uzoraka, simpleks-PCR metodom infekcija nozemom je utvrđena u 100,0%, a primenom dupleks-PCR metode u 84,0% uzoraka (**Glavinić i sar, 2013**). Za potrebe specijske identifikacije *Nosema* parazita kod pčela, najjednostavnija je i najisplativija metoda dupleks-PCR. Od analiziranih PCR metoda, za detekciju *Nosema* parazita kod pčela najpouzdanija je simpleks-PCR metoda (tačnost 100%), čime je omogućeno davanje preporuke da se ova metoda uvede kao obavezna za praćenje stanja pčelinjih društava na terenu da bi se postiglo rano utvrđivanje prisustva infekcije i blagovremena prevencija njenog širenja (**Glavinić i sar, 2013**).

Praćenje odnosa domaćin-parazit između *A. m. macedonica* i *N. ceranae* obuhvatilo je i ispitivanje uticaja *N. ceranae* infekcije na reproduktivne i produktivne karakteristike pčelinjih društava sa maticama različite starosti. Eksperiment je obavljen na 27 društava jednake jačine *A. m. macedonica* (**Stevanovic i sar., 2010**), formiranih 2009. godine, a ispitivanje je trajalo tri godine (2010-2012), tako da su sva društva 2010 godine imala jednogodišnju maticu, 2011 – dvogodišnju, a 2012 – trogodišnju. Kod društava sa jednogodišnjim maticama zabeležene su značajno veće vrednosti svih parametara, kako reproduktivnih (polaganje jaja, prolećni razvoj društva, površina legla) tako i produktivnih (količine zimskih rezervi meda, količine izvrcanog meda), što se tumači najvećim kapacitetom mladih matica da kompenzuju negativni uticaj infekcije vrstom *N. ceranae* (**Simeunovic i sar., 2014**).

2.4. Enzimi oksidativnog stresa

Zbog svog načina života, kao i mnogobrojnih stresora (Slika 2) pčele su podložne oksidativnom stresu (**Korayem i sar., 2012**). Tokom leta potrebe pčela za kiseonikom su izuzetno visoke, a zbog njihovog trahealnog respiratornog sistema, kiseonik dolazi u direktan kontakt sa ćelijama tkiva (**Krogh i Weis-Fogh, 1951**). Pčelinja hrana (nektar i perga) sadrže alelohemikalije i fenole čija metabolička oksidacija proizvodi reaktivni oblici kiseonika (*reactive oxygen species* - ROS) (**Mittapalli i sar., 2007; Pecci, 2011**). Neravnoteža između formiranja ROS-a i

antioksidativnih mehanizama odbrane dovodi do oksidativnog stresa (**Sharma i sar., 2012**). Prekomerna proizvodnja ROS ima potencijal da izazove poremećaj ćelijskih lipida, proteina i nukleinskih kiselina, što dovodi do oksidativnog stresa (**Birben i sar., 2012**). Polinezasićene masne kiseline u fosfolipidima ćelijske membrane su glavne mete lipidne peroksidacije, a koje utiču na fiziološku funkciju ćelijskih membrana. Krajnji proizvod ovih reakcija je malondialdehid (MDA), marker lipidne peroksidacije, odnosno oksidativnog stresa (**Gawel i sar., 2003**). Sa izuzetkom respiratornog lanca u mitohondrijama, ROS se formiraju kao nusprodukti različitih metaboličkih puteva (**Sharma i sar., 2012**) i imaju brojne pozitivne uloge u ćeliji, kao što je odbrana od infektivnih agenasa i regulatorna uloga u signalizaciji. Nekoliko studija je dokazalo da kod sisara (**Kinnula i sar., 1992; Geiszt i sar., 2003**) i insekata (**Ha i sar., 2005a; Ha i sar., 2005b; Ryu i sar., 2010**) jedan od najbržih imunih reakcija creva na prisustvo bakterijske infekcije uključuje proizvodnju ROS.



Slika 2. Stresori koji deluju na pčele

Ćelijsku koncentraciju ROS održava antioksidativni sistem (AOS), koji uključuje i enzimske i ne-enzimske mehanizme. Iako su glavne komponente AOS očuvale tokom evolucije, postoje jedinstvene adaptacije među različitim životinjskim grupama (**Felton i Summers, 1995; Corona i Robinson, 2006**). AOS

pčele je sposoban da se izbori sa visokim nivoima oksidativnog stresa (**Nikolenko i sar., 2012**). Njegove glavne enzimske komponente, 38 antioksidativnih gena, su uporedno analizirane sa drugim vrstama diptera, a ukazuju na razlike u načinu života pčele i količine prooksidativnih molekula unetih hranom (**Corona i Robinson, 2006**). Antioksidativni sistem pčela je još uključen u neutralizaciju ksenobiotika, uključujući insekticide i teške metale (**Chakrabarti i sar., 2015; Nikolic i sar., 2015**). Pored toga, antioksidativni enzimi pčela su važni za aktivnost i dugovečnost matice (**Corona i sar., 2005**), održavanje ćelijskog zida (**Weirich i sar., 2002; Collins i sar., 2004**) i dužine životnog veka (**Münch i sar., 2008**). Najvažniji antioksidativni enzimi su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation-S-transferaza (GST) (**Birben i sar., 2012**).

Korayem i sar. (2012) su analizirali antioksidativne enzime (SOD, CAT i askorbat peroksidazu) i ukupne koncentracije peroksida tokom aktivne (letnje) i umereno aktivne (jesenje) sezone kod pčela. Njihovi rezultati su ukazali da povećani nivoi antioksidativnih enzima pčela i ukupnih koncentracija peroksida su u pozitivnoj korelaciji sa intenzivnim aktivnostima pčela u toku letnje sezone. Istraživanje **Dussaubat i sar. (2012)** se odnosilo na merenje aktivnosti enzima oksidativnog stresa (SOD, glutation-peroksidaze (GP), glutation-reduktaze (GR) i GST) između kontrolne grupe i grupe koja je bila inficirana sa *N. ceranae*. U njihovom istraživanju nije postojala statistički značajna razlika kod SOD i GR između dve grupe, dok je ukupna aktivnost GP-a smanjena usled infekcije sa *N. ceranae*, dok je aktivnost GST-a bila statistički značajno veća u grupi gde je prisutna infekcija sa *N. ceranae*. Utvrđeno je da su različiti GST geni značajno indukovani u crevnom tkivu posle oralne bakterijske infekcije, što ukazuje na to da GST može biti uključena u zaštiti crevnog epitela od patogena (**Buchon i sar., 2009**).

Insekti koriste ROS kao odbranbeni mehanizam za borbu protiv patogena (**Nikolenko i sar., 2012**), oni međutim ujedno predstavljaju i glavnu pokretačku snagu u starenju, izazivajući štetna makromolekularna oštećenja (**Harman, 1956, 1981**). Stoga se može pretpostaviti da veća proizvodnja ROS tokom perioda povećane aktivnosti (u leto), smanjuje životni vek pčela (**Münch i sar., 2008**), ali smanjuje i njihovu podložnost na patogene.

2.5. Analiza troškova i dobiti

Analiza troškova i dobiti (*cost-benefit*) jedna je od tehnika koja se koristi za ocenjivanje socio-ekonomskog učinka nekog projekta. Sastoji se od identifikacije, kvantifikacije i evaluacije troškova i koristi vezanih za projekat. Evaluacija pojedinih projekata uz pomoć analize troškova i dobiti primenjive su na državnom, regionalnom i nacionalnom nivou. Uspeh analize troškova i dobiti za pojedine projekte zdravlja životinja zavisi o udruženim naporima većeg broja faktora (**Carpenter, 1993**).

Istorijski posmatrano, kao najraniji primer analize troškova i dobiti navodi se izveštaj o evaluaciji povraćaja novca jednog investicionog projekta navodnjavanja. Početkom 19. veka, Englezi su uložili velike napore kako bi kvantifikovali učinke predloženih investicionih projekata u Indiji. Do sredine 19. veka tehnike analize investicija i proračuna ušle su u opštu upotrebu, jer je država započela sa sprovođenjem opsežnih programa „javnih radova“, koji su uključivali izgradnju puteva, sistema za navodnjavanje kao i pruga. Prva sveobuhvatna analiza dobiti i troškova za jedan projekat navodnjavanja vezana je za izgradnju kanala West Juma 1852. godine. Ova analiza uključila je proračune za troškove kapitala, troškove popravke i izgradnje, kao i dobit koja je ostvarena kroz upotrebu vodenica i mlinova, prihoda od prodaje, naknade za napajanje stoke kao i naknade prolaska kroz kanal. Prva primena diskonrovanja zabeležena je 1856. godine (**Carpenter, 1993**).

Primena analize troškova i dobiti, prema **Carpenter (1993)** predstavlja model koji na osnovu svojih ekonomskih rezultata može da donese presudnu ulogu pri odluci o prihvatanju nekog programa. Analiza troškova i dobiti, kao i druge forme ekonomskih analiza korišćene su za mnoge probleme kao što su: bolesti/štetočine u poljoprivrednoj proizvodnji, kao i za prevenciju/eradikaciju i kontrolu drugih bolesti. Jedan od primera izrade analize troškova i dobiti koja se odnosi na problem u pčelarstvu je američka trulež pčelinjeg legla (**Jarratt i Franco-Dixon, 1999**), kao i drugi primeri koji se ne odnose na probleme u pčelarstvu: atipična kuga živine (**Hafi i sar., 1994**), paratuberkuloza ovaca (Johnova bolest) (**Short i sar.,1997**). Prema istraživanjima ovih autora ekonomski kriterijumi koji se uzimaju u obzir pri evaluaciji programa su: neto sadašnja vrednost, odnos dobiti i

troškova i interna stopa povećanja sredstava. Praktičnu primenu analize troškova i dobiti u izradi programa koji nisu vezani za probleme u pčelarstvu u našoj zemlji dali su svojim istraživanjima **Tešić i sar. (2004)**, **Stojiljković (2005)** i **Mirilović (2006)**.

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je molekularna identifikacija tripanozome *Lotmaria passim* i ispitivanje njenog uticaja na zdravlje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelastvu.

Za ostvarivanje ovog cilja bili su postavljeni sledeći zadaci:

1. Uspostavljanje konvencionalne PCR metode za indentifikaciju vrsta pčelinjih tripanozoma *Lotmaria passim* i *Crithidia mellificae* korišćenjem novodizajniranih prajmera (bez potrebe za sekvencioniranjem amplikona).
2. Retrospektivna analiza uzoraka pčela iz devetogodišnjeg perioda (2007-2015) na prisustvo tripanozoma.
3. Uspostavljanje *real-time* PCR metode za utvrđivanje stepena infestacije pčela tripanozomama.
4. Dobijanje prvih informacija o uticaju prisutnih tripanozoma na jačinu i zdravstveno stanje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarskoj proizvodnji.
5. Ekonomska evaluacija izrađenih modela za smanjivanje broja infekata u pčelinjim društvima.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

- Uzorci DNK pčela za ispitivanje prisustva tripanozoma *C. mellificae* i *L. passim*
- Rekombinantni plazmidi „pGEM®-T Easy“ sa insertovanim specifičnim genima pčelinjih tripanozoma (*C. mellificae* i *L. passim*) za dobijanje pozitivnih kontrola poznatih koncentracija
- 162 arhivska uzorka DNK pčela (sakupljenih sa 57 lokaliteta na teritoriji Srbije u periodu 2007-2015)
- Uzorci pčela izletnica za ispitivanje prisustva pčelinjih tripanozoma
- Košnice sa pčelinjaka u Višnjićevu (opština Šid)

4.2. Metode

4.2.1. Konvencionalni PCR testovi za indentifikaciju pčelinjih tripanozoma i mikrosporidija

4.2.1.1. *In vivo* kloniranje rekombinantnih plazmida „pGEM®-T Easy“

Kako bi se obezbedila kontrola kvaliteta PCR testova i formirale standardne krive poznate koncentracije kod *real-time* PCR razvijene su pozitivne kontrole. Od čistih referentnih ćelijskih kultura *L. passim* (soj BRL) i *C. mellificae* (soj 30862) napravljeni su prečišćeni rekombinantni plazmidi (pGEM-T Easy; Promega) korišćenjem seta QIAprep (Qiagen) koji sadrže amplikone navedenih tripanozoma. Plazmidna DNK svake tripanozome je pojedinačno umnožena *in vivo* kloniranjem.

Medijum za rast i selekciju transformanata

Za rast sojeva *E. coli* DH5 α korišćen je Luria-Bertani (LB) medijum koji sadrži tripton (10 g/l), ekstrakt kvasca (5 g/l) i NaCl (5 g/l), a inkubiracija je obavljena na temperaturi od 37°C uz obaveznu aeraciju korišćenjem šejkera. Transformisane ćelije *E. coli* selektovane su i gajene u LB medijumu uz dodatak antibiotika (ampicilin 100 μ g/ml). Čvrste podloge su dobijene dodavanjem 1,5% agara u tečne medijume. Sojevi *E. coli* su čuvani u LB medijumu sa 15% glicerola na -80°C.

Priprema kompetentnih ćelija *E. coli*

Kompetentne (*E. coli* DH5 α) ćelije za transformisanje plazmidima pripremljene su po modifikovanoj proceduri sa rubidijum hloridom (**Hanahan, 1985**). Nekoliko kolonija sveže izrasle kulture *E. coli* DH5 α inokulisano je u LB medijumu (100 ml), koji je inkubiran na 37°C uz intenzivnu areaciju na 180 rpm, do optičke gustine kulture od 600 = 0,4. Rast bakterijske kulture je zaustavljen inkubiranjem kulture 15 min. na ledu. Nakon hlađenja bakterije su sedimentirane centrifugiranjem tokom 10 min. na 3000 rpm na 4°C. Supernatant je uklonjen, a ćelije resuspendovane laganim mešanjem u istom volumenu prethodno ohlađenog 0,1 M CaCl₂ i inkubirane na ledu 15 min. Ćelije su zatim ponovo sedimentirane centrifugiranjem na 3000 rpm tokom 10 min, a potom

resuspendovane u 4 ml RF2 pufera (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 15% glicerol, finalno pH 6,8). Suspenzija ćelija je podeljena u alikvotne od po 200 µl, koji su naglo zamrzavani u tečnom azotu, a zatim čuvani na -80°C.

Transformacija kompetentnih ćelija *E. coli*

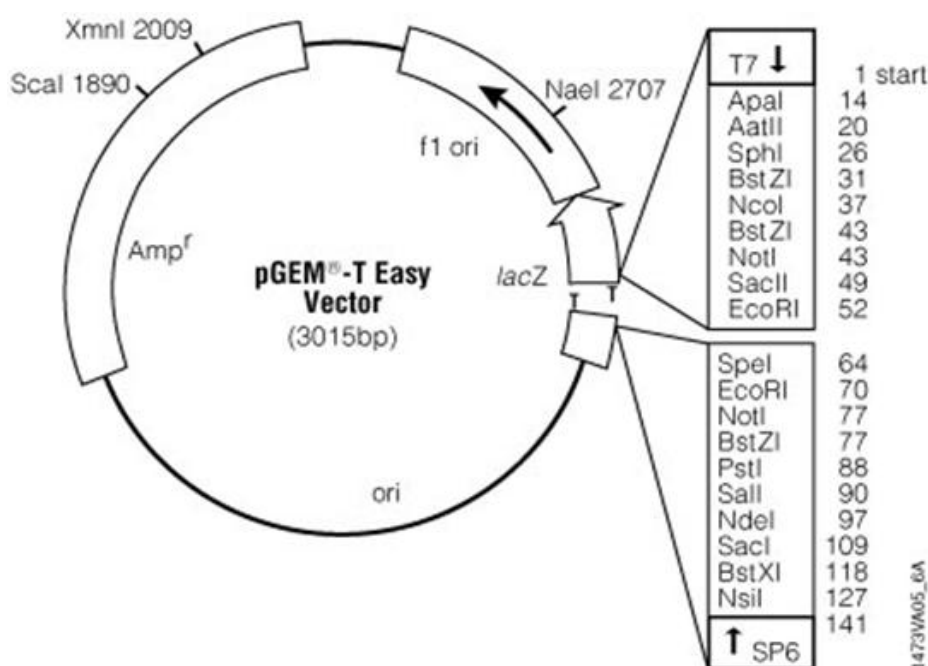
Kompetentne ćelije *E. coli* DH5α su transformisane *heat shock* metodom. U alikvot od 200 µl kompetentnih ćelija koje su iznešene iz zamrzivača sa -80°C i otopljen u ruci, dodata je plazmidna DNK (5µl). Smeša je inkubirana 40-60 minuta na ledu uz povremeno mešanje na svakih 15 minuta. Zatim je smeša bakterija i plazmida bila izložena 90 sekundi toplotnom šoku na 42°C. Nakon šoka, bakterije su ohlađene 5 minuta na ledu. U smešu bakterija je dodat medijum za rast (LB) 200 µl i inkubirane su 30 minuta na 37°C uz aeraciju. Transformanti su slektovani razmazivanjem transformacione smeše na podloge za rast koje sadrže antibiotik i inkubirane preko noći na 37°C.

Metoda izolacije plazmidne DNK iz *E. coli* DH5α

Za izolaciju plazmidne DNK iz transformisanih ćelija *E. coli* korišćena je modifikovana metoda "JET star" protokola (*JET star*, GENOMED GmbH, Lohne, Germany). Kulture *E. coli* (3 ml (2 x 1,5 ml)) koja je prenoćila je sedimentirana centrifugiranjem (1 min 13000 rpm), a zatim su ćelije resuspendovane u 200 µl E1 rastvora (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) sa ribonukleazom (finalne koncentracije 100 µg/ml). Potom je rađeno liziranje ćelija dodavanjem 200 µl rastvora E2 (200 mM NaOH, 1% SDS), uz lagano mešanje do homogenizacije lizata. Nakon homogenizacije urađena je neutralizacija dodavanjem 200 µl rastvora E3 (3,1 M K-acetat pH 5,5) uz intenzivno mešanje. Smeša je zatim centrifugirana 10 minuta na maksimalnoj brzini, a dobijeni supernatant je prebačen u nove mikroeprevete i precipitiran dodavanjem 0,7 volumena izopropanola, a potom opet centrifugirana (10 min 13000 rpm). DNK je zatim isprana hladnim etanolom (75%, -20°C) i centrifugirana (3 min 13000 rpm), supernatant odliven, a talog nakon toga sušen na 37°C do gubitka mirisa etanola. Finalno resuspendovanje uzoraka izvršeno je u rastvoru (1 µl ribonukleazeu 50 µl vode ili pufera), a smeša je zatim inkubirana na 37°C u trajanju od 30 min.

Digestija restrikcionim enzimima

Kako bi se proverilo da li transformanti u sebi sadrže odgovarajući klon (plazmid sa odgovarajućim fragmentom) izvršena je njihova digestija restrikcionim enzimima. Najpodesniji restrikcioni enzim za analizu klonova u pGEMT-Easy vektoru je *EcoRI* koji izdvaja klonirane fragmente (Slika 3). Digestija 5 μ l plazmidne DNK je obavljena u finalnom volumenu od 20 μ l u 1 x puferu za restrikcioni enzim tokom 3 časa na 37°C sa 5 jedinica *EcoRI*. Uspešnost digestije je analizirana elektroforezom na agaroznom gelu.



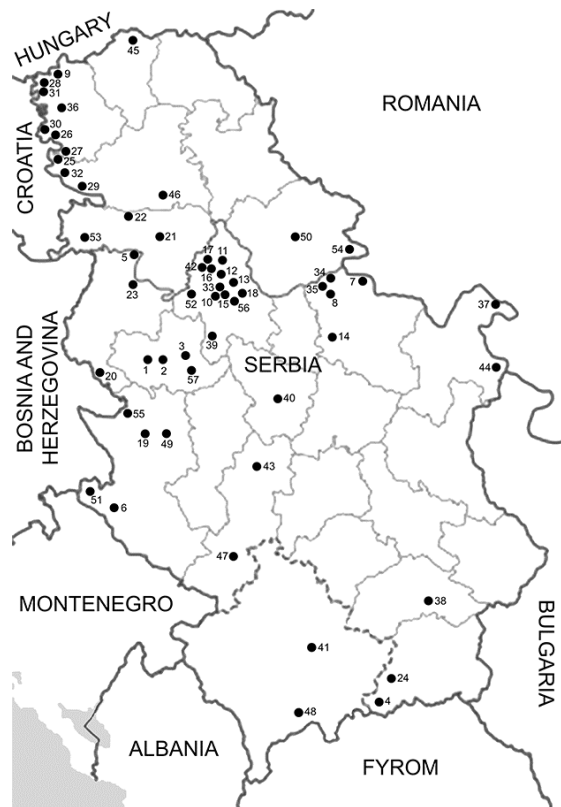
Slika 3. Shematski prikaz strukture pGEMT-Easy vektora i mesta šćenja sa *EcoRI* restrikcionim enzimom

Vizuelizacija dobijenih DNK regiona putem elektroforeze na agaroznom gelu

Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u 1 x TAE puferu (40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA) uz dodavanje etidijum bromida (0,5 μ g/ml). Kao pufer za elektroforezu korišćen je 1 x TAE pufer. Korišćeni su 1% agarozni gelovi, a elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. Za očitavanje rezultata korišćeni su standardi poznate veličine fragmenata na istom agaroznom gelu.

4.2.1.2. Izolacija DNK iz uzoraka

Arhivski uzorci DNK medonosne pčele čuvani su na -20°C na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, koji su poticali od pčela sa 57 lokacija u Srbiji (Slika 4) koje su sakupljeni tokom devetogodišnjeg perioda (2007-2015). Pčele su primarno bile namenjene za ispitivanje infekcije sa *Nosema spp.* i identifikaciju vrste. Šezdeset odraslih pčela po društvu je korišćeno za ekstrakciju DNK pomoću DNeasy Plant Mini Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kao što je opisano u radu **Stevanovic i sar. (2013)**. Svi DNK uzorci su analizirani na *N. apis* i *N. ceranae*. Za molekularni skrining na tripanozome, iz arhive u kojoj se nalazilo uskladišteno 1192 uzoraka DNK, nasumice je izabrano 18 uzoraka po godini (ukupno 162 uzorka DNK). DNK iz laboratorijski gajenih *Bombus impatiens* bumbara inficiranih sa *C. bombi* korišćena je za validaciju specifičnosti tripanozomnih prajmera. Mikroskopskim pregledom svežih fekalnih kapi je potvrđeno prisustvo *C. bombi* u gore navedenim bumbarima. Abdomeni su pojedinačno homogenizovani pomoću FastPrep FP120 ćelijskog disruptera (Qbiogene, Carlsbad, CA) u 2% (w/v) heksadeciltrimetilamonijum bromidu (CTAB) puferisanim sa 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0,2% (v/v) 2-merkaptetanolom, 50 μg proteinaze K (Promega, Madison, VI) i 5% (v/v) ribonukleaznim koktelom (Life Technologies, Carlsbad, CA). DNK je izolovana standardnim fenol:hloroformom:izoamil alkoholom (25:24:1) faznim odvajanjem nakon čega je usledila precipitacija alkoholom.



Slika 4. Mapa lokacija uzorkovanja (lokacija oznake odgovaraju onima u tabeli 8).

4.2.1.3. Dizajniranje prajmera i identifikacija tripanozomnih vrsta

Za dizajn prajmera korišćen je polimorfni region cytochrome b gena (Cytb) prethodno validiranih tripanozoma *L. passim* (GenBank KJ684960) i *C. mellificae* (GenBank KJ684951). Mala slova u sekvenci prajmera označavaju razlike u polimorfnim pozicijama između *L. passim* i *C. mellificae* (Tabela 1). Tokom verifikacije prajmera provera tripanozomne DNK u ispitivanim uzorcima je rađena sa prethodno objavljenim univerzalnim tripanozomnim prajmerima (**vanEngelsdorp i sar., 2009**).

Lančana reakcija polimeraze je izvedena u mikrotubama zapremine 0,2 ml, a amplifikacija u PCR aparatu „Mastercycler Personal“ (Eppendorf, Germany). Kao negativna kontrola korišćena je „nuclease-free“ voda, a kao pozitivna kontrola plazmidi sa insertovanom sekvencom DNK *L. passim*, odnosno plazmidi sa insertovanom sekvencom DNK *C. mellificae*.

Za amplifikacije DNK korišćen je komercijalni kit „KAPA Taq PCR Kit“ (KAPA Biosystems, MA, USA), kod tripanozome *L. passim* korišćeno je 14,9 µl

„nuclease-free“ vode, 2 µl 10x KAPA *Taq* pufera iz kita, 0,4 µl dNTP miksa koncentracije 10 mM, 0,4 µl MgCl₂ koncentracije 25 mM, po 0,6 µl prajmera LpCytb_F1 i LpCytb_R (Tabela 1) koncentracije 10 µM, 0,1 µl KAPA *Taq* DNA Polymerase koncentracije 5 U/µl i 1 µl DNK izolata. Zapremina PCR reakcije iznosila je 20 µl. PCR reakcija je izvedena prema sledećem temperaturnom protokolu: inicijalna denaturacija u trajanju od 2 minuta na 95°C praćena sa 40 ciklusa denaturacije od 30 sekundi na 95°C, 30 sekundi hibridizacija na 55°C i 20 sekundi ekstenzije na 72°C. Finalna ekstenzija trajala je 2 minuta na 72°C.

Za amplifikacije DNK tripanozome *C. mellificae* korišćeno je 14,9 µl „nuclease-free“ vode, 2 µl 10x KAPA *Taq* pufera iz kita, 0,4 µl dNTP miksa koncentracije 10 mM, 0,4 µl MgCl₂ koncentracije 25 mM, po 0,6 µl prajmera CmCytb_F i CmCytb_R (Tabela 1) koncentracije 10 µM, 0,1 µl KAPA *Taq* DNA Polymerase koncentracije 5 U/µl i 1 µl DNK izolata. Zapremina PCR reakcije iznosila je 20 µl. PCR reakcija je izvedena prema sledećem temperaturnom protokolu: inicijalna denaturacija u trajanju od 2 minuta na 95 °C praćena sa 40 ciklusa denaturacije od 30 sekundi na 95 °C, 30 sekundi hibridizacije na 59 °C i 20 sekundi ekstenzije na 72 °C. Finalna ekstenzija trajala je 2 minuta na 72 °C (Stevanovic i sar. 2016).

Tabela 1. Korišćeni prajmeri za amplifikaciju DNK *L. passim* i *C. mellificae*

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')	Tripanozoma	Ciljani gen	Veličina PCR produkta (bp)
LpCytb_F1 LpCytb_R	cGAAGTgCaCATATATGCTTtAC gcCAaAcACCaATaACTGGtACT	<i>L. passim</i>	citohrom b (Cytb)	247
CmCytb_F CmCytb_R	AGTtTGAgCtGTtGGaTTTgTt AACcTAtTACaGGcACaGTTGC	<i>C. mellificae</i>	citohrom b (Cytb)	140

4.2.1.4. Elektrofereza dobijenih PCR produkata i vizuelizacija pod UV svetlosti

Razdvajanje amplifikovanih DNK sekvenci izvršeno je pomoću horizontalne elektroforeze na 1,5% agaroznom gelu za *L. passim*, odnosno 1,8% agaroznom gelu

za *C. mellificae*. PCR produkti koji su prethodno na parafilmu pomešani sa bojom (6x Orange DNA Loading Dye, Thermo Scientific, Lithuania) u odnosu 5:1 sipani su u količini od 3 μ l (2,5 μ l PCR produkta i 0,5 boje) u formirane bazenčiče u gelu koji su nastali uklanjanjem češlja. Pri svakoj elektroforezi, u granični bazenčić sa jedne strane naneto je 2,5 μ l markera (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, Lithuania) koji je služio za procenu dužine dobijenih traka. U sledeći bazenčić sipano je 3 μ l PCR produkta pozitivne kontrole (pomešane sa bojom u odnosu 5:1), dok je u granični bazenčić sa druge strane uzoraka sipano 3 μ l PCR negativne kontrole (pomešane sa bojom u odnosu 5:1).

Elektroforeza je izvedena korišćenjem aparata za elektroforezu „MUPID ONE electrophoresis unit MU2“ (Nippon Genetics, Japan), u trajanju od 30 minuta pri konstantnom naponu od 100 V. Nakon završene elektroforeze, pristupljeno je bojenju PCR produkata potapanjem agaroznog gela u rastvor etidijum bromida (20 μ l etidijum bromida u 200 ml destilovane vode) u trajanju od 15 minuta, a zatim petnaestominutnom obezbojavanju gela u 200 ml destilovane vode. Vizuelizacija traka izvršena je pri UV svetlu talasne dužine 254 nm korišćenjem transluminatora „UV Table manual ETX-20.C“ (Vilber Lourmat, Germany), pri čemu je gel fotografisan za arhivu.

4.2.1.5. Amplifikacija mikrosporidijalne DNK koristeći duplex-PCR metodu

U svrhu utvrđivanja prisustva i determinacije mikrosporidijalne DNK korišćena je duplex-PCR metoda koju su uspostavili **Martín-Hernández i sar., (2007)**, a koja omogućava istovremeno umnožavanje specifičnih delova genoma (16S rRNA gena) vrsta *N. apis* i *N. ceranae*, odnosno njihovu diferencijaciju zahvaljujući primeni prajmera specifičnih za vrstu. Za potrebe umnožavanja delova genoma i determinacije vrste *Nosema* uzročnika, korišćeni su species-specifični prajmeri 321APIS-FOR/REV i 218MITOC- FOR/ REV, opisani u **Martín-Hernández i sar. (2007)** (Tabela 2).

Tabela 2. Prajmeri korišćeni u svrhu molekularne identifikacije *N. apis* i *N. ceranae* tokom duplex-PCR

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')	<i>Nosema</i> vrsta	Ciljani gen	Veličina PCR produkta (bp)
321APIS-FOR 312APIS-REV	GGGGGCATGTCCTTTGACGTA GGGGGGCGTTTAAAATGTGAAACAACTATG	<i>N. apis</i>	16S rRNK	321
218MITOC-FOR 218MITOC-REV	CGGCGACGATGTGATATGAAAATATTAA CCCGGTCATTCTCAAACAAAAACCG	<i>N. ceranae</i>	16S rRNK	218-219

Temperaturni režim i PCR protokol za duplex PCR preuzet je iz radova **Martín-Hernández i sar. (2007)** i **Stevanovic i sar. (2011)**. PCR amplifikacija obavljena je u aparatima „Mastercycler Personal“ (Eppendorf, Germany) i „MultiGene Gradient“ (Labnet International Inc.) u zapremini od 25 µl koja je sadržala 1× PCR-bufer A (Kapa Biosystems), 2,5 mM MgCl₂ (Kapa Biosystems), 0,2 mM od svakog deoksinukleozid trifosfata (Qiagen), 0,5 µM od svakog prajmera (nos- 165-fw, nos-165-rv, Operon Biotechnologies, Inc., Huntsville, Al), 0.5 U Taq polimeraze (Kapa Biosystems) i 5 µl DNK uzorka. PCR parametri bili su sledeći: inicijalna DNK denaturacija od 4 min na 95°C, 45 ciklusa od 1 min na 95°C, 1 min na 53°C i 1 min na 72°C, kao i završni korak ekstenzije od 4 min na 72°C. Za svaki PCR, korišćena je pozitivna kontrola, DNK *Nosema* pozitivnog uzorka (izolovana iz macerata abdomena pčela u kojima su i mikroskopski detektovane spore) i negativna kontrola (ddH₂O) paralelno sa uzorcima koji su ispitivani.

4.2.1.6. Elektroforeza dobijenih produkata i vizuelizacija pod UV svetlosti

Zapremina od 4 µl svakog PCR produkta je pomešana sa 1.5 µl 6X DNA Loading Dye (Thermoscientific, SAD) i podvrgnuta procesu horizontalne elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Horizontalna gel elektroforeza izvođena je tokom vremenskog perioda od 40 minuta pri jačini struje od 50 V. Nakon završenog procesa elektroforeze,

agarozni gel je obojen etidijum-bromidom. Za određivanje veličine amplifikata korišćen je komercijalni marker O'RangeRuler™ 50bp DNA (Thermo Scientific, SAD). Vizuelizacija traka izvršena je pri UV svetlu talasne dužine 254 nm korišćenjem transluminatora ETX-20.C (Vilber Lourmat, Germany), pri čemu je gel fotografisan za arhivu.

4.2.2. *Real-time* PCR metoda za utvrđivanje stepena infestacije pčela sa *L. passim*

4.2.2.1. Pravljenje standardnih kriva

Za potrebe kvantifikacije *L. passim* putem *real-time* PCR metode bilo je neophodno pravljenje standardnih kriva korišćenjem plazmida koji sadrži kopiju interesne sekvence *L. passim*. Sekvenca DNK *L. passim* su bile prisutne u opsegu od 10^8 do 10^1 kopija. Ukupna veličina plazmida sa ubačenom sekvencom ciljanog DNK *L. passim* je iznosila 3161 bp, sama veličina plazmida je bila 3015 bp, a veličina ubačene ciljane sekvence DNK *L. passim* u plazmid je bila 146 bp. Spektorfotometrijskim merenjem štok plazmidne DNK utvrđena je koncentracija od 63,21 ng/μl (0,00000006321 g/μl). U *real-time* PCR reakciju je dodavano 1 μl plazmidne DNK. Postupak za izračunavanje potrebne koncentracije je prizakan u četiri koraka:

Prvi korak - izračunavanje mase jednog plazmida

Za izračunavanje mase jednog plazmida korišćena je sledeća formula:

$$m = (n) * \left(\frac{1 \text{ mol}}{6,023 * 10^{23} \text{ molekula (bp)}} \right) * \left(660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)$$

Avogadrov broj = $6,023 * 10^{23}$ molekula / 1 mol

Prosečna masena težina dvolančanog molekula DNK = 660 g/mol

$$m = (n) * \left(1,096 * 10^{-21} \frac{\text{g}}{\text{bp}} \right)$$

n = veličina plazmida u bp (veličina plazmida + ubačena ciljane sekvence DNK)

m = masa

e-21 = $\times 10^{-21}$

$$m = (3161 \text{ bp}) * \left(1,096 * 10^{-21} \frac{\text{g}}{\text{bp}}\right) = 3,46446 * 10^{-18} \text{g}$$

Drugi korak - izračunavanje mase plazmida koji sadrže kopiju interesne sekvence (u količini od 10^1 do 10^8 kopija DNK *L. passim*)

Kako bi se pristupilo izračunavanju korišćena je sledeća formula:

Masa jednog plazmida * željeni broj kopija = masa potrebne DNK plazmida

$$\left(3,46446 * 10^{-18} \frac{\text{g}}{\text{kopija}}\right) * (10 \text{ kopija}) = 3,46446 * 10^{-17} \text{g}$$

Kako bi se izračunale mase plazmida koji sadrže kopije interesne sekvence, upotrebljena je ista formula, ali sa menjanjem broja željenih kopija, a dobijeni podaci su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Izračunate mase plazmida potrebne za postizanje željenog broja kopija interesne sekvence

Broj kopija	Masa jednog plazmida (g)	Ukupna masa potrebne DNK plazmida (g/ μ l)
10^1	$3,46446 * 10^{-18}$	$3,46446 * 10^{-17}$
10^2	$3,46446 * 10^{-18}$	$3,46446 * 10^{-16}$
10^3	$3,46446 * 10^{-18}$	$3,46446 * 10^{-15}$
10^4	$3,46446 * 10^{-18}$	$3,46446 * 10^{-14}$
10^5	$3,46446 * 10^{-18}$	$3,46446 * 10^{-13}$
10^6	$3,46446 * 10^{-18}$	$3,46446 * 10^{-12}$
10^7	$3,46446 * 10^{-18}$	$3,46446 * 10^{-11}$
10^8	$3,46446 * 10^{-18}$	$3,46446 * 10^{-10}$

Treći korak – izračunavanje koncentracije plazmidne DNK koja je potrebna da bi se postigao željeni broj kopija

U svakoj *real-time* PCR reakciji je korišćen 1 μ l rastvora plazmida, a željena finalna koncentracija plazmidne DNK je prikazana u tabeli 4.

Tabela 4. Izračunate koncentracije plazmidne DNK koja je potrebna da bi se postigao željeni broj kopija

Broj kopija	Masa jednog plazmida (g)	Ukupna masa potrebne DNK plazmida (g)	Podeljeno sa 1 μ l rastvora plazmida u svakoj reakciji	Finalna koncentracija plazmidne DNK (g/ μ l)
10^1	$3,46446 \cdot 10^{-18}$	$3,46446 \cdot 10^{-17}$	1	$3,46446 \cdot 10^{-17}$
10^2	$3,46446 \cdot 10^{-18}$	$3,46446 \cdot 10^{-16}$	1	$3,46446 \cdot 10^{-16}$
10^3	$3,46446 \cdot 10^{-18}$	$3,46446 \cdot 10^{-15}$	1	$3,46446 \cdot 10^{-15}$
10^4	$3,46446 \cdot 10^{-18}$	$3,46446 \cdot 10^{-14}$	1	$3,46446 \cdot 10^{-14}$
10^5	$3,46446 \cdot 10^{-18}$	$3,46446 \cdot 10^{-13}$	1	$3,46446 \cdot 10^{-13}$
10^6	$3,46446 \cdot 10^{-18}$	$3,46446 \cdot 10^{-12}$	1	$3,46446 \cdot 10^{-12}$
10^7	$3,46446 \cdot 10^{-18}$	$3,46446 \cdot 10^{-11}$	1	$3,46446 \cdot 10^{-11}$
10^8	$3,46446 \cdot 10^{-18}$	$3,46446 \cdot 10^{-10}$	1	$3,46446 \cdot 10^{-10}$

Četvrti korak – postupak pripreme serijskih razblaženja plazmidne DNK

Pošto je umnožena sekvenca jako koncentrovana u prečišćenom štoku DNK plazmida, da bi se postigla radna koncentracija plazmidne DNK za *real-time* PCR potrebno je napraviti niz serijskih razblaženja. U tabeli 5 prikazan je postupak izračunavanja razblaživanja plazmidne DNK do potrebnog broja razređivanjem štoka tako da se dobiju plazmidi radne koncentracije $6,321 \cdot 10^{-10}$ g/ μ l.

Kako bi se napravio štok radne koncentracije plazmida korišćena je sledeća formula:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Za izračunavanje štok koncentracije plazmida korišćena je formula:

$$\left(6,321 * 10^{-8} \frac{\text{g}}{\mu\text{l}}\right) * (V_1) = \left(6,321 * 10^{-10} \frac{\text{g}}{\mu\text{l}}\right) * (1000 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 10 \mu\text{l}$$

$$\text{Zapremina rastvarača} = 1000 \mu\text{l} - 10 \mu\text{l} = 990 \mu\text{l}$$

Da bi se postigla potrebna zapremina od 1000 μl u 990 μl razređivača dodato je 10 μl štok plazmida. Za rastvarač je korišćena sterilna „nuclease-free“ voda. Kada je postignuta radna koncentracija štok plazmida urađen je proračun za izračunavanje zapremine koja je potrebna za pripremu razblaženja od 10^8 do 10^1 kopija.

$$\left(6,321 * 10^{-10} \frac{\text{g}}{\mu\text{l}}\right) * (V_1) = \left(3,46446 * 10^{-10} \frac{\text{g}}{\mu\text{l}}\right) * (100 \mu\text{l})$$

$$V_1 = 54,81 \mu\text{l}$$

$$\text{Zapremina rastvarača} = 100 \mu\text{l} - 54,81 \mu\text{l} = 45,19 \mu\text{l}$$

Da bi se postigla potrebna zapremina od 100 μl potrebno je iz štok plazmida zapremine 1000 μl ispipetirati 54,81 μl i dodati u 45,19 μl razređivača (Tabela 5).

Tabela 5. Postupak izračunavanja razblaživanja plazmidne DNK do potrebnog broja kopija

		ng/ μl =	g/ μl =				
		63,21	0,0000006321				
Razblaženje	Izvor plazmidne DNK	Početna koncentracija (g/ μl)	Zapremina plazmidne DNK (μl)	Zapremina razređivača (μl)	Finalna zapremina (μl)	Konačna koncentracija (g/ μl)	Broj kopija/ μl
		C_1	V_1	V_2	C_2		
1	STOK	0,0000006321	10	990	1000	$6,231 * 10^{-10}$	-
2	Razblaženje 1	$6,321 * 10^{-10}$	54,81	45,19	100	$3,46446 * 10^{-10}$	100.000.000 (10^8)
3	Razblaženje 2	C_2 od Razblaženja 1	10	90	100	$3,46446 * 10^{-11}$	10.000.000 (10^7)
4	Razblaženje 3	C_2 od Razblaženja 2	10	90	100	$3,46446 * 10^{-12}$	1.000.000 (10^6)
5	Razblaženje 4	C_2 od Razblaženja 3	10	90	100	$3,46446 * 10^{-13}$	100.000 (10^5)
6	Razblaženje 5	C_2 od Razblaženja 4	10	90	100	$3,46446 * 10^{-14}$	10.000 (10^4)
7	Razblaženje 6	C_2 od Razblaženja 5	10	90	100	$3,46446 * 10^{-15}$	1.000 (10^3)
8	Razblaženje 7	C_2 od Razblaženja 6	10	90	100	$3,46446 * 10^{-16}$	100 (10^2)
9	Razblaženje 8	C_2 od Razblaženja 7	10	90	100	$3,46446 * 10^{-17}$	10 (10^1)

4.2.2.2. Izolacija mikrosporidijalne i tripanozomne DNK

Abdomeni 60 pčela po uzorku su homogenizovani u sterilnom tarioniku uz dodatak 60 ml redestilizovane vode (ddH₂O). Deset mikrolitara dobijenog homogenata preneto je na hemocitometar kako bi se utvrdio nivo infekcije *Nosema* izračunavanjem prosečnog broja spora po pčeli kao što je opisano u Priručniku za dijagnostičke testove i vakcine koje je objavila Svetska organizacija za zdravlje životinja (*Office International Des Epizooties - OIE, 2013*). Preostali homogenat je centrifugiran 6 minuta na 3000 rpm. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo uklonjen, a dobijeni talog je resuspendovan u 20 ml ddH₂O. Iz suspenzije, 1000 µl je preneto u epruvetu od 1,5 ml, a zatim je podvrgnuta centrifugiranju na 13000 rpm tokom 4 minuta. Nakon odbacivanja supernatanta, dobijeni talog je preliven tečnim azotom i maceriran sterilnim štapićima radi razaranja zida eventualno prisutnih *Nosema* vrsta i oslobađanja njihove DNK. Izolacija DNK je vršena pomoću komercijalnog seta „Quick-gDNA™ MiniPrep” (Zymo Research, Orange, CA) u skladu sa uputstvom proizvođača. Nakon DNK ekstrakcije, na spektrofotometru „UV-Vis Biospec Nano Micro-volume“ (Shimadzu, Kyoto, Japan) je izvršena kvantifikacija DNK u svakom uzorku. U cilju kontrole efikasnosti procesa izolacije, uporedo sa izolacijom ispitivanog materijala, obavljena je izolacija sigurno pozitivnog materijala i redestilovane vode (ddH₂O). Izolovana DNK je smeštena u zamrzivač na -20°C do postupka amplifikacije primenom PCR ili *real-time* PCR.

4.2.2.3. Amplifikacija i kvantifikacija tripanozomne DNK *L. passim* primenom *real-time* PCR metode

Specifičan *forward* prajmer je optimizovan za *real-time* PCR i dizajniran da umnoži 146 bp iz regiona citohrom b gena (*Cytb*, GenBank KJ684960). Mala slova u sekvenci prajmera označavaju razlike u polimorfnim pozicijama između *L. passim* i *C. melliferae* (Tabela 6). Za amplifikaciju i kvantifikaciju DNK *L. passim* korišćen je komercijalni set „KAPA SYBR® FAST Universal qPCR Kit“ (Kapa Biosystems). Zapremina *real-time* qPCR reakcije iznosila je 20 µl i sastojala se od 8 µl „nuclease-free“ vode, 10 µl 2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix, po 0,5 µl *CytfSF_F2* i

CytbSF_R1 koncentracije 10 μ M i 300 ng izolovane DNK-a. Reakcije su izvedene na real-time PCR aparatu „Rotor-Gene Q 5plex“ (Qiagen, Valencija, CA). Reakcije su izvedena prema sledećem temperaturnom protokolu: inicijalna denaturacija u trajanju od 10 minuta na 95 °C praćene sa 40 ciklusa denaturacije od 10 sekundi na 95 °C i 60 sekundi hibridizacije i ekstenzije na 54 °C (**Vejnovic i sar., 2018**).

Vizuelizacija amplifikovanih produkata je omogućena beleženjem nivoa fluorescencije u vidu specifičnih dijagrama uz pomoć softvera koji je obezbeđen od strane proizvođača aparata.

Tabela 6. Korišćeni prajmeri za amplifikaciju DNK *L. passim* u real-time PCR

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'-3')	Tripanozoma	Ciljani gen	Veličina PCR produkta (bp)
LpCytb_F2	AGTaTGAGCaGTaGGtTTTaTTATa	<i>L. passim</i>	citohrom b (Cytb)	146
LpCytb_R	gcCAaAcACCaATaAcTGGtAcT			

Prilikom puštanja svakog *real-time* PCR pored ispitujućih uzoraka, korišćena je plazmidna DNK poznate koncentracije za formiranje standardnih kriva, zajedno sa negativnom kontrolom i β -aktinom kao referentnim genom (**Scharlaken i sar., 2008**). Svi *real-time* PCR uzorci su rađeni u triplikatu. Efikasnost amplifikacije *real-time* PCR (E) je izračunata iz nagiba standardnih kriva pomoću jednačine: $E = 10^{-1/\text{slope} - 1}$ (**Rasmussen, 2001**). Broj *L. passim* po pčeli je dobijen pomoću modifikovane jednačine **Bourgeois i sar. (2010)** upoređivanjem eksperimentalne Cq-vrednosti sa vrednostima standardnih kriva. Za konverziju kopija/ μ l u ćelija/pčeli korišćena je sledeća formula:

$$\frac{\text{Broj individualnih } L. \textit{passim} \text{ pčeli}}{\text{pčeli}} = \frac{\left(\frac{\alpha L. \textit{passim} \text{ kopija}}{\mu\text{l PCR}} \right) \left(\frac{20\mu\text{l}}{(0,05)(n)} \right)}{\text{broj } \beta \text{ kopija po genomu}}$$

gde je α = broj kopija iz *real-time* PCR, β = 6 kopija *Cytb* po genomu za *L. passim*, 0,05 predstavlja količnik volumena homogenata (1000 μ l) i volumena resuspendovanog taloga 20 ml iz koga je homogenat uzet, a n = broj pčela korišćen u DNK ekstrakciji.

4.2.3. Postavka terenskog eksperimenta

4.2.3.1. Odabir pčelinjaka i pčelinjih društava

U cilju ispitivanja efekta *L. passim* na pčelinja društva, odabrana su dva pčelinjaka sa evropskom medonosnom pčelom (*Apis mellifera*) na dva različita lokaliteta u mestu Višnjićevu (44°59'15.1"N 19°16'41.0"E; 44°57'26.8"N 19°17'25.0"E). Kriterijum pri odabiru pčelinjaka bio je odsustvo, odnosno prisustvo *L. passim*. Navedeni pčelinjaci su pri inicijalnoj proveru (primenom konvencionalne PCR metode) bili *L. passim* negativni (*L. passim* – društva), odnosno *L. passim* pozitivni (*L. passim* + društva). Istraživanje je sprovedeno na ukupno dvadeset Langstroth (LR) košnica, 10 košnica koje su bile *L. passim*-pozitivne i 10 košnica koje su bile *L. passim*-negativne, a koje su se nalazile na dva različita pčelinjaka. Istraživanje je trajalo od marta 2016. do marta 2017. godine. Odabrana društva su dobijena od inicijalnih 30 košnica sa svakog od pčelinjaka.

4.2.3.2. Ujednačavanje pčelinjih društava

Eksperimentalna društva su formirana u julu 2015. godine, nakon završetka glavne paše. Da bi se dobila ujednačena društva, primenjen je objektivn način procene jačine društva zasnovan na broju odraslih pčela, količini legla (otvorenog i zatvorenog legla) i količini uskaldištene hrane (meda i perge) po proceduri koju su opisali **Delaplane i Harbo (1987)** odnosno **Berry i Delaplane (2001)**, a koja je inovirana i detaljno opisana od strane **Delaplane i sar. (2013)**. Svaka od 20 košnica (10 na jednom i 10 na drugom pčelinjaku) je bila formirana na osnovu preporuke **Eckert i sar. (1994)** i **Imdorf i Gerig (2001)**, koji pružaju približno istu količini legla (po dva rama otvorenog i zatvorenog legla), praznih izvučenih ramova (dva rama), ramove sa hranom (četiri rama), maticu u kavezu i pčele radilice (oko 2 kg po košnici). Sve eksperimentalne kolonije primile su markirane oplodene sestre matice koje su odgajane u tekućoj godini. Tokom celog eksperimentalnog perioda, koristeći uputstava Svetske organizacije za zdravlje životinja (**OIE 2013**) redovno su proveravana sva eksperimentalna društva na

prisustvo bolesti pčela i legla. Infestacija sa *Varroa destructor* je kontrolisana sa CheckMite+® (kumafos) u skladu sa preporukama proizvođača.

4.2.3.3. Uzorkovanje pčela

4.2.3.3.1. Uzorkovanje pčela za potrebe analize na mikrosporidije i tripanozome

Za potrebe detekcije, odnosno kvantifikacije *L. passim* i *Nosema* spp. tokom trajanja eksperimenta (od marta 2016. do marta 2017. godine) svakog meseca izuzev zimskih meseci (oktobar-februar) od svake košnice je uzorkovano najmanje 120 živih odraslih pčela sa leta košnice. Uzorkovane pčele su smeštene u sterilne plastične posude i na ledu transportovane do laboratorije. Uzorkovanje je rađeno nakon zatvaranja leta košnice u trajanju od 20-30 minuta (Meana i sar., 2010). Na ovaj način je sa dva različita lokaliteta ukupno sakupljeno 160 uzoraka (sa svakog lokaliteta po 80 uzoraka). Svi sakupljeni uzorci su čuvani na -20°C do trenutka analiziranja. Takođe, tokom istraživačkog perioda u Višnjićevu, beležena je i prosečna mesečna temperatura (<https://www.accuweather.com>).

4.2.3.3.2. Uzorkovanje pčela za potrebe analize na parametre oksidativnog stresa

Za potrebe analize na parametare oksidativnog stresa iz svih 20 pčelinjih društava, dva puta u toku trajanja eksperimenta (u junu i u septembru 2016. godine) rađeno je uzorkovanje po najmanje 20 živih odraslih pčela sa leta košnice. Uzorkovanje je rađeno nakon zatvaranja leta košnice u trajanju od 20-30 minuta (Meana i sar., 2010). Uzorkovane pčele su smeštene u sterilne plastične posude i na suvom ledu (-80°C) transportovane do laboratorije. Nakon dopremanja uzoraka u laboratoriju, isti su odmah procesuirani, i čuvani na -20°C do određivanja enzimske aktivnosti.

4.2.3.4. Procena efekta *L. passim* na pčelinja društva

Efekat *L. passim* na pčelinja društva procenjen je na osnovu merenja jačine i proizvodnje pčelinjih društava. Jačina pčelinjeg društva je procenjena merenjem pet parametara: površina otvorenog legla (OL), površina zatvorenog legla (ZL), broj odraslih pčela (BP), rezerve meda (RM) i rezerve perge (RP). Dok je procena proizvodnje pčelinjih društava urađena na osnovu količine izvrcanog meda.

4.2.3.4.1. Procena jačine pčelinjih društava

Procena jačine pčelinjih društava je rađena tri puta u toku 2016. godine, u martu, junu i u septembru merenjem pet parametara jačine pčelinjeg društva: OL, ZL, BP, RM i RP. Merenja su izvedena korišćenjem metodologije opisane u **DeGrandi-Hoffman i sar. (2008)**, koja je uključena u standardne metode za procenu parametara jačine kolonija *A. mellifera* (**Delaplane i sar., 2013**). Ukratko, merenja su izvedena korišćenjem rama na kome se nalazila žičana mreže sa kvadratima 5 x 5 cm. Ram sa žičanom mrežom je položen sa svake strane svakog rama i broj kvadrata sa leglom (posebno otvorenim i zatvorenim), uskladištenom hranom (posebno med i perga) i odraslim pčelama je izbrojan i zapisan. Za svaki parametar koji se pratio, merenja svih ramova su sabrana za celu košnicu. Procenjene vrednosti za OL, ZL, RM i RP su izražene u cm², dok je BP izražen u broju pčela. Preračun iz cm² u broj pčela je izvršen tako što se vrednost zabeležene površine sa brojem pčela pomnoži sa 1,25 kod LR rama (**Delaplane i sar., 2013**).

4.2.3.4.2. Procena produktivnosti pčelinjih društava

Procena produktivnosti pčelinjih društava je izvršena na osnovu ukupnog izvrcanog meda. Ukupni izvrcani med je ukupna količina izvrcanog meda iz jedne košnice izraženog u kg u toku jednogodišnjeg perioda.

4.2.4. Određivanje parametara oksidativnog stresa

Za potrebe merenje aktivnosti enzima (superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), glutation S-transferaze (GST)) i koncentracije malondialdehida (MDA), pravljani su 10% (w/v) homogenati celih pčela. Cele pčele su homogenizovane sa avanom i tučkom u Tris-HCl puferu pH 7,4 sa tečnim azotom. Macerat je centrifugiran 10 minuta na 10.000 g (4°C), supernatant je izdvojen i zamrznut na -20°C do određivanja enzimske aktivnosti. Za svaku od eksperimentalnih grupa bilo je formirano po 3 biološka ponavljanja od 8 pčela radilica, a analize su rađene u tehničkim triplikatima. Specifična aktivnost enzima izražena je u jedinicama aktivnosti po miligramu proteina (U/mg proteina), a koncentracija MDA u nmol/mg proteina. Sve analize su urađene na aparatu UV/VIS Spectrophotometer BK-36 S390 (BIOBASE).

4.2.4.1. Merenje aktivnosti superoksid dismutaze

Za određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u ispitivanim uzorcima korišćena je metoda koju su opisali **Misra i Fridovich (1972)**. Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina u adrenohromu u alkalnoj sredini (pH = 10,2). Enzim SOD katalizuje reakciju neutralisanja $O_2^{\bullet -}$:



i na taj način uklanja $O_2^{\bullet -}$ čime inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina.

Aktivnost ukupne SOD određivana je kinetički, kao promena apsorbancije u vremenu na talasnoj dužini od 480 nm. Reakcija je praćena kinetički i otpočinjala je dodavanjem adrenalina, kada je reakciona smeša inkubirana 3 minuta na 30 °C, a promena apsorbancije čitana je na 480 nm u vremenskom rasponu od 3 minuta. Jedinica aktivnosti enzima definisana je kao količina enzima neophodna da smanji stopu autooksidacije adrenalina za 50% u alkalnoj sredini. Aktivnost ukupne SOD izražena je u jedinicama po miligramu proteina (U/mg proteina) (**Buha, 2015**).

4.2.4.2. Merenje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) određena je metodom po **Aebi (1984)**. Metoda se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju razgradnje H_2O_2 na 240 nm. Aktivnost CAT se prati kao pad apsorbance na datoj talasnoj dužini (**Nikolić, 2017**).

4.2.4.3. Merenje aktivnosti glutathion S-transferaze

Aktivnost glutathion S-transferaze (GST) je određena sa 1-hloro-2,4-dinitrobenzenom (CDNB) kao supstratom (**Hagib i sar., 1974**). Metoda se zasniva na formiranju kompleksa CDNB sa glutathionom, a reakciju katališe glutathion S-transferaza. Brzina formiranja kompleksa se prati spektrofotometrijski na 340 nm. Aktivnost GST se izračunava pomoću molarnog ekstinkcionog koeficijenta za CDNB i izražava se po mg proteina. Specifična jedinica aktivnosti je definisana kao broj nM glutathiona oksidovanih u minuti (**Nikolić, 2017**).

4.2.4.4. Merenje koncentracije malondialdehida

Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatu (10% w/v) je izmerena metodom po **Slater (1984)** koja je zasnovana na principu da malondialdehid, specifičan proizvod lipidne peroksidacije reaguje sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i obrazuje obojen kompleks sa maksimumom apsorpcije na 532 nm. Koncentracija je izračunata pomoću molarnog ekstinkcionog koeficijenta (**Nikolić, 2017**).

4.2.4.5. Merenje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina je određena metodom po **Bradford (1976)**. Metoda za određivanje ukupnih proteina po Bradford se zasniva na formiranju kompleksa između boje Coomassie Brilliant Blue G-250 i proteina. Kada se veže za protein, boja prelazi u stabilnu neprotonovanu formu, sa maksimumom apsorpcije na 595 nm, zbog čega rastvor dobija plavu boju. Intenzitet boje se meri i na osnovu standardne krive se određuje koncentracija proteina u uzorku (**Nikolić, 2017**).

4.2.5. Evaluacija dobiti i troškova kod pčelinjih društava koje su inficirane tripanozomom *L. passim*

Evaluacija dobiti i troškova kod pčelinjih društava koje su inficirane tripanozomom *L. passim* izvršena je pomoću *cost-benefit* analize na osnovu prethodno determinisanih parametara koji se odnose na troškove i dobit. Za pokazatelje troškova uzeti su izdaci nastali pri nabavci materijala i održavanju košnica, kupovini rojeva i matica, prihranjivanju društava, veterinarske usluge, dezinfekcija košnica i prostora i troškove rada. Od pokazatelja koji doprinose ostvarivanju dobiti uzeta je proizvodnja rojeva i matica, meda, voska, polena i propolisa. Na osnovu prethodnih istraživanja i dugogodišnjih iskustava, može se očekivati da će se elementi dobiti u petogodišnjem periodu povećavati od 5 do 15%.

Cost-benefit analiza je dinamički metod i zato se pri izradi programa mora uzeti u obzir vreme kao jedan od relativnih faktora za izradu i procenu programa. Ppostavljena su dva modela: **model A** pri čijem izračunavanju nisu uzeti u obzir troškovi registracije domaćinstva i košnica i **model B** koji obuhvata sve troškove predviđene programom za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima. Prilikom određivanja trajanja vremenskog intervala koji je optimalan za izradu programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima korišćeni su rezultati sopstvenih istraživanja. Na osnovu svih tih faktora, a imajući u vidu organizaciono-ekonomske karakteristike privrednog miljea Republike Srbije, određena je dužina trajanja koja iznosi pet godina. Na osnovu naših saznanja, ovo je optimalan rok da jedan ovako kompleksan i sveobuhvatan program da relevantne rezultate. Pošto se radi o dinamičkom metodu potrebno je sve nominalne vrednosti dobiti i troškova svesti na sadašnju vrednost putem diskontovanja. Za primenu ovog postupka koristi se diskontni faktor koji se izračunava na osnovu odgovarajućih tabela. Nakon izvršene analize i određivanja sadašnje vrednosti budućih troškova i dobiti, ekonomska evaluacija programa izvršena je na osnovu sledećih kriterijuma:

- Neto sadašnje vrednosti (NSV) koja predstavlja razliku sume diskontovanih dobiti i sume diskontovanih troškova, pokazuje vrednost programa pri trenutnim cenama.

- Odnos dobiti i troškova (CBR) koji predstavlja količnik sume diskontovanih dobiti i sume diskontovanih troškova i označava relativnu veličinu troškova i dobiti.
- Interna stopa povraćaja (ISP) predstavlja diskontnu stopu koja zbir diskontovanih troškova izjednačava sa zbirom diskontovanih dobiti u zadatom vremenskom intervalu.

Kao kriterijum prihvatljivosti, odnosno ekonomske opravdanosti izrade programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima pozitivna ocena programa će biti ako je $NSV > 0$ i $CBR \geq 1$. Ekonomska evaluacija dobijenog modela programa izvedena je pomoću softvera *Cost-benefit analysis tool*.

4.2.6. Prikupljanje podataka i izrada kartograma

Kako bi se grafički prikazao broj košnica po opštinama, broj košnica po km^2 opštine i broj košnica po stanovniku opštine u Republici Srbiji preuzeta su odgovarajuća dokumenta sa internet stranice Republičkog zavoda za statistiku (<http://www.stat.gov.rs/>)

Podaci o broju košnica po opštinama u Republici Srbiji su preuzeti iz popisa poljoprivrede 2012. godine, dok su podaci o površini opština u km^2 kao i o broju stanovnika opština preuzeti iz dokumenta „Opštine i regioni u Republici Srbiji 2014.“ Sva navedena dokumenta su javno dostupna na internet stranici Republičkog zavoda za statistiku.

Podaci za broj košnica po km^2 opštine su dobijeni deljenjem broja košnica opštine sa brojem km^2 opštine, dok su podaci za broj košnica po stanovniku opštine dobijeni deljenjem broja košnica opštine sa brojem stanovnika opštine.

Kako bi se pristupilo obradi prikupljenih podataka, za svaki od tri navedena kartograma urađeno je sledeće:

1. Određivanje broja klasnog intervala (K). Za svaku distribuciju frekvencije određen je tačan broj klasnih intervala kako bi se na najbolji način prikazala tendencija pojave koja se posmatra. Za određivanje broja klasnih intervala korišćena je formula:

$$K = 1 + 3,3 * \log N$$

N je broj članova serije

2. Izbor veličine klasnog intervala (i). Za svaku grupu podataka određena je optimalna veličina klasnih intervala. Za određivanje veličine klasnog intervala korišćena je formula:

$$i = \frac{X_{max} - X_{min}}{K}$$

X_{max} - najveća vrednost u seriji, odnosno najveći broj.

X_{min} - najmanja vrednost u seriji, odnosno najmanji broj.

3. Određivanje granice intervala. Kako ne bi došlo do preklapanja klasnih intervala, odnosno da se ne bi poklopile gornja granica jednog sa donjom granicom sledećeg intervala, izvršeno je korigovanje donje granice. Svaka vrednost donje granice intervala je povećana u zavisnosti od podataka ili za 1 ili za 0,001.
4. Grupisanje jedinica posmatranja u odgovarajuće klasne intervale i izrda kartograma.

4.2.7. Statistička obrada rezultata

Eksperimentalni podaci su prikazani tabelarno i grafički preko kartograma, histograma i box plotova. Učestalosti su prikazane kao apsolutne i relativne frekvencije izražene u procentima.

Normalna raspodela podataka je testirana koristeći Shapiro - Wilk test normalnosti, kao i vrednosti koeficijenta varijacije (cv), u zavisnosti od dobijenih vrednosti, odabrana je odgovarajuća metoda za testiranje razlike između grupa.

Za poređenje dve grupe homogenih podataka (Shapiro - Wilk test, p>0,05; cv<30%) korišćen je t test za nezavisne uzorke, u suprotnom je korišćen Mann-Whitney U-test. Heterogeni podaci (Shapiro - Wilk test, p<0,05; cv>30%) u grupi koja je imala

ponovljeno merenje su poređeni koristeći t test za zavisne uzorke, u suprotnom je korišćen Wilcoxon matched pairs test.

Za poređenje više od dve grupe homogenih podataka (Shapiro - Wilk test, $p > 0,05$; $cv < 30\%$) korišćena je dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjem u jednom faktoru, ili jednofaktorska ANOVA za ponovljeno merenje, i u jednom i u drugom slučaju naknadna poređenja su urađena sa Tuckey testom.

Za izračunavanje povezanosti dve promenljive korišćen je Spearman koeficijent korelacije

Za poređene učestalosti korišćen je Fisher exact test.

Numerički podaci za homogene skupove podataka prikazani su kao srednja vrednost \pm standardna devijacija, a za heterogene skupove podataka kao medijana sa odgovarajućim interkartilnim opsegom (IQR: 25-75 percentila).

Ekonomska evaluacija urađenih modela za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima izvedena je analizom toškova i dobiti pomoću softvera *Cost-benefit analysis tool*.

Statistička obrada eksperimentalnih podataka je izvršena pomoću softvera GraphPad Prism verzija 6 (GraphPad, San Diego, CA, USA) i Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

5. REZULTATI

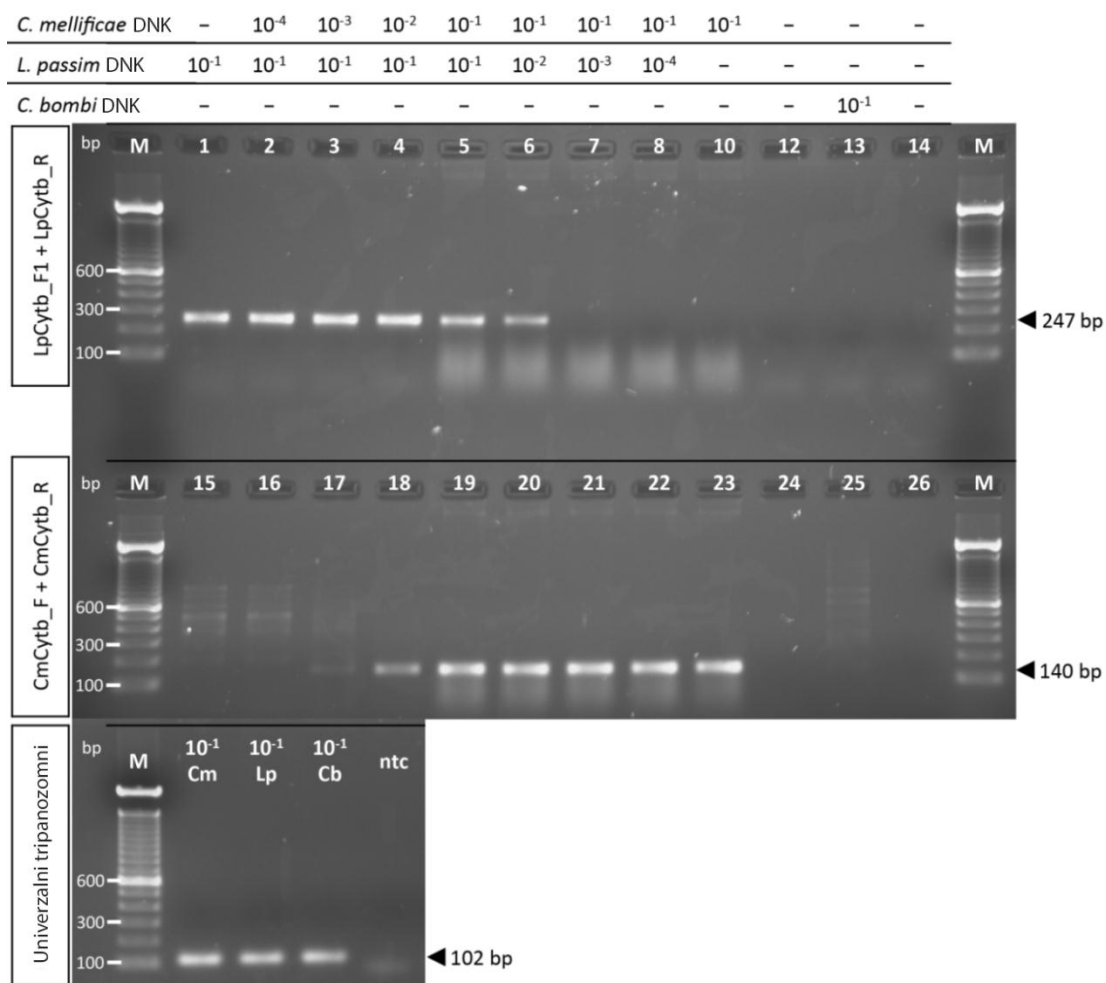
5.1. PCR metode za indentifikaciju vrsta pčelinjih tripanozoma *Lotmaria passim* i *Crithidia mellificae* korišćenjem novodizajniranih prajmera

Species-specifični prajmeri ciljaju polimorfna mesta u mitohondrijalnoj DNK lokusa citohrom b gena (*Citb*), ranije je dokazano da se na ovaj način mogu filogenenetski razlikovati vrste i sojevi pčelinjih tripanozoma (Schwarz i sar., 2015). Par prajmera za *L. passim* (LpCitb_F1 + LpCitb_R) obuhvata 13 polimorfnih mesta koja su jedinstvena za *L. passim* u poređenju sa *C. mellificae* i ovaj par prajmera proizvodi PCR produkt od 247 bp (Slika 5). Prajmeri za *C. mellificae* (CmCitb_F + CmCitb_R) obuhvataju 12 polimorfnih mesta koja su jedinstvena za *C. mellificae* u poređenju sa *L. passim* i ovaj par prajmera proizvodi PCR produkt od 140 bp (Slika 5). Nijedan od ovih parova prajmera nije unakrsno reagovao sa DNK pčelinjih tripanozoma dobijenih iz čistih ćelijskih linijskih kultura, niti su unakrsno reagovali sa srodnom vrstom koja inficira bumbare, *C. bombi* (Slika 5). Serijska razblaženja pomešanih DNK vrsta *L. passim* i *C. mellificae* potvrđuju da je svaki prajmer bio species-specifičan, kao i kod različitih odnosa razblaženja, odnosno gde je DNK iz jedne ili druge vrste preovladava. Sa različitim nivoima razblaženja pomešanih DNK vrsta *L. passim* i *C. mellificae* (10^1 naspram 10^{-4}) nije došlo do nespecifične PCR amplifikacije (Slika 5). Univerzalni tripanozomni prajmeri su korišćeni da potvrde prisustvo DNK tripanozoma u svim uzorcima koji su analizirani u validaciji prajmera.

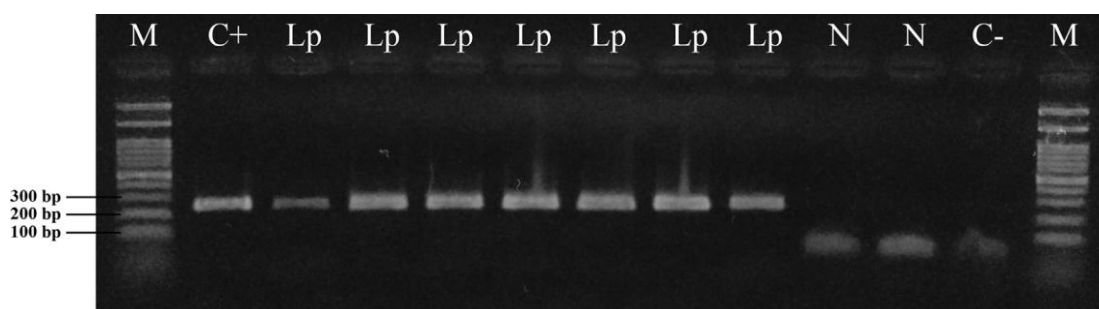
Svi DNK izolati medenosne pčele (*A. mellifera*) testirani sa LpCitb_F1 i LpCitb_R parom prajmera koji su dali PCR produkt koji odgovara veličini od 247 bp na agaroznom gelu su proglašeni pozitivnim na *L. passim*. (Slika 6). Analizom DNK uzoraka pčela sa CmCitb_F i CmCitb_R parom prajmera nije dobijen PCR produkt, a ovakvi uzorci su proglašeni negativni na *C. mellificae*. Zbirni podaci molekularnog skrininga arhivskih uzoraka DNK pčela na prisustvo tripanozoma i mikrosporidija prikazani su u tabeli 7, dok su detaljni podaci sa lokacijama i brojem uzoraka prikazani u tabeli 8. Analizom svih uzoraka (n = 162) u periodu od

9 godina (2007-2015) sa 57 lokaliteta u Srbiji detektovana je samo jedna vrsta tripanozoma *L. passim* i to u 101 (62,3%) uzorku sa 44 lokaliteta. Analizom 18 uzoraka po godini dobijena je sledeća godišnja frekvencija *L. passim*: 13 uzoraka (72,2%) u 2007. godini, 7 (38,9%) u 2008. godini, 13 (72,2%) u 2009. godini, 11 (61,1%) u 2010. godini, 15 (83,3%) u 2011. godini, 15 (83,3%) u 2012., 7 (38,9%) u 2013. godini, 12 (66,7%) u 2014. godini i 8 (44,4%) u 2015. godini. *C. mellificae* nije detektovana u arhivskim DNK uzorcima. Od microsporidija bila je prisutna samo *N. ceranae*, dok *N. apis* ili mešane infekcije sa *N. apis* / *N. ceranae* nije bilo. Prevalencija *N. ceranae* je bila jako visoka, jer je pronađena u 155 uzoraka (95,7%) , a ne postoji ni jedna lokacija u Srbiji da bar jedna košnica nije inficirana sa *N. ceranae* (Tabela 8).

Većina društava (60,5%, n = 98) bila je ko-inficirana vrstama *L. passim* i *N. ceranae* poreklom sa 43 lokacije širom Srbije, uključujući i Beograd (Tabela 8). U 35,2% društava (n = 57) sa 32 lokacije detektovana je samo *N. ceranae*, dok je *L. passim* bila odsutna (Tabela 7). Samo 1,9% (n=3) društava je bilo inficirano samo sa *L. passim* i to jedno iz 2010. godine (Ripanj) i dva iz 2012. godine (Ugljare i Beograd). Tokom devetogodišnjeg ispitivanja, odnos infekcije vrstama *L. passim* i *N. ceranae* nije bio statistički značajan (Fisher exact test, p=0,427).



Slika 5. Tripanozomni prajmeri testirani sa jednom i mešovitom DNK vrsta *Crithidia mellificae* (Cm), *Lotmaria passim* (Lp) i *Crithidia Bombi* (Cb) na klasičnom PCR. DNK razblaženja (10⁻¹-10⁻⁴) od *L. passim* (soj BRL) i/ili *C. mellificae* (soj 30862). PCR produkti citohroma b DNK *L. passim* (LpCytb_F1 + LpCytb_R) i *C. mellificae* (CmCytb_F + CmCytb_R) su na slikama označeni. Univerzalni tripanozomni prajmeri umnožavaju fragment od 28s rRNA od svih vrsta tripanozoma. Temperaturni protokol koji je korišćen se sastojao od 55 °C hibridizacije i 30 ciklusa PCR amplifikacije. 1,8% agarozni gel obojen etidijum bromidom. M = 100 bp marker.



Slika 6. Detekcija *Lotmaria passim* (Lp) u uzorcima DNK *Apis mellifera* iz Srbije. PCR produkti dobijeni su pomoću para prajmera LpCitb_F1 i LpCitb_R. Marker: M od 100 bp; C +, pozitivna kontrola *L. passim* 10^{-5} ; C -, negativna kontrola; Lp, PCR produkt uzorka koji odgovara *L. passim*; N, PCR produkt *L. passim* bez uzorka. 1,5% agarozni gel obojen sa etidijum bromidom.

Tabela 7. Sažeto godišnje uzorkovanje pčelinjih društava u Srbiji i status infekcije sa *Lotmaria passim* i/ili *Nosema ceranae* od 2007 do 2015.^a

Godina ^b	Infekcija samo sa <i>L. passim</i>	Infekcija samo sa <i>N. ceranae</i>	Ko-infekcija	Neinficirani
2007	0	5	13	0
2008	0	11	7	0
2009	0	5	13	0
2010	1	4	10	3
2011	0	3	15	0
2012	2	2	13	1
2013	0	11	7	0
2014	0	6	12	0
2015	0	10	8	0
Ukupno	3 (1.9%)	57 (35.2%)	98 (60.5%)	4 (2.5%)

^a Svi uzorci su bili negativni na *N. apis* i *C. melliferae*.

^b 18 društava je uzorkovano po godini, iz svakog društva je uzeto 60 pčela izletnica

Tabela 8. Broj uzoraka pčelinjih društava sakupljen na godišnjem nivou u Srbiji i stanje infekcije sa *Lotmaria passim* i / ili *Nosema ceranae* od 2007. do 2015¹.

Naziv mesta uzorkovanja	Oznaka lokacije	Broj uzorkovanih društava ²	Broj inficiranih sa <i>L. passim</i>	Broj inficiranih sa <i>N. ceranae</i>	Broj ko-inficiranih (odnos)	Godina
Sedlari	1	2	2	2	2 (1.00)	2007
Valjevo	2*	1	0	1	0	
Radobić	3	1	0	1	0	
Preševo	4	3	2	3	2 (0.67)	
Drenovac	5	2	1	2	1 (0.05)	
Vrbovo	6	3	3	3	3 (1.00)	
Veliko Gradište	7*	2	2	2	2 (1.00)	
Požarevac	8*	2	2	2	2 (1.00)	
Rastina	9	2	1	2	1 (0.50)	
Barajevo	10	7	0	7	0	2008
Krnjača	11*	4	4	4	4 (1.00)	
Beograd	12*	1	1	1	1 (1.00)	
Veliko Gradište	7**	2	0	2	0	
Zuce	13	3	2	3	2 (0.67)	
Žabari	14	1	0	1	0	
Ripanj	15*	3	1	3	1 (0.33)	2009
Novi Beograd	16	1	1	1	1 (1.00)	
Zemun	17	1	1	1	1 (1.00)	
Grocka	18	1	0	1	0	
Sevojno	19	1	0	1	0	
Beograd	12**	2	2	2	2 (1.00)	
Ljubovija	20	1	0	1	0	

REZULTATI

Ruma	21*	3	3	3	3 (1.00)	
Ležimir	22	1	1	1	1 (1.00)	
Šabac	23	3	3	3	3 (1.00)	
Bujanovac	24	1	1	1	1 (1.00)	
Ripanj	15**	3	1	3	1 (0.33)	2010
Vajska	25	1	1	1	1 (1.00)	
Sonta	26	1	1	1	1 (1.00)	
Karavukovo	27	2	1	2	1 (0.50)	
Kolut	28	1	1	1	1 (1.00)	
Mladenovo	29	1	1	1	1 (1.00)	
Apatin	30	2	1	2	1 (0.50)	
Bezdan	31	3	1	3	1 (0.33)	
Plavna	32	2	1	1	1 (1.00)	
Rušanj	33	2	2	2	2 (1.00)	
Beograd	12****	7	5	7	5 (0.71)	
Požarevac	8**	2	2	2	2 (1.00)	
Kostolac	34	1	1	1	1 (1.00)	
Petka	35	1	1	1	1 (1.00)	
Sombor	36**	5	4	5	4 (0.80)	
Kladovo	37	1	1	1	1 (1.00)	
Bočevica	38	1	1	1	1 (1.00)	
Krnjača	11**	1	1	1	1 (1.00)	2012
Strmovo	39	1	1	1	1 (1.00)	
Vinogradi	40	3	1	2	1 (0.33)	
Ruma	21**	4	3	4	3 (0.75)	
Ugljare	41	2	2	1	1 (0.50)	
Surčin	42*	2	2	2	2 (1.00)	
Beograd	12*****	5	5	4	4 (0.80)	

Valjevo	2**	2	0	2	0	2013
Kraljevo	43	5	0	5	0	
Negotin	44	2	1	2	1 (0.50)	
Subotica	45	1	1	1	1 (1.00)	
Novi Sad	46	1	0	1	0	
Sombor	36**	3	2	3	2 (0.67)	
Novi Pazar	47	4	3	4	3 (0.75)	
Štrpce	48	9	6	9	6 (0.67)	2014
Požega	49	1	1	1	1 (1.00)	
Devojački Bunar	50	4	3	4	3 (0.75)	
Zabrnjica	51	2	0	2	0	
Beograd	12*****	2	2	2	2 (1.00)	
Obrenovac	52	10	6	10	6 (0.60)	2015
Višnjićevo	53	1	1	1	1 (1.00)	
Bela Crkva	54	2	0	2	0	
Bajina Bašta	55	1	0	1	0	
Ralja	56	1	0	1	0	
Surčin	42**	1	1	1	1 (1.00)	
Ljig	57	2	0	2	0	
Total	57	162	101	158	99 (0.61)	

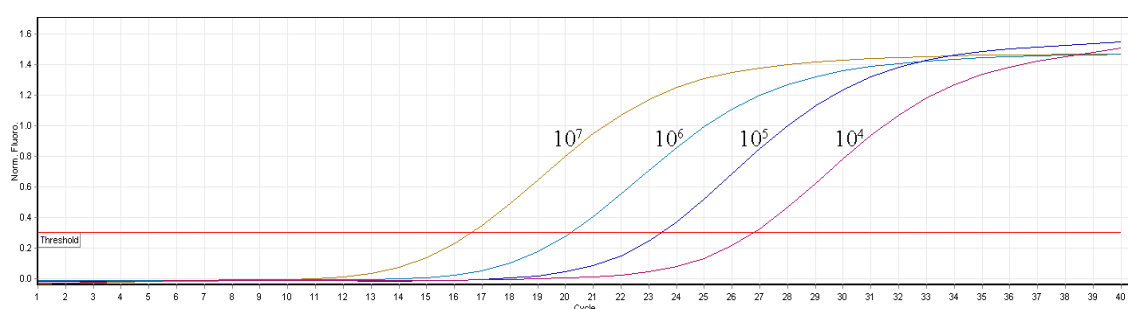
*, **, ***, ****, *****, prvo, drugo, treće, četvrto i peto uzorkovanje, gde se izvodi uzorkovanje ≥ 2 puta.

¹Svi uzorci testirani negativno na *N. apis* i *C. melliferae*.

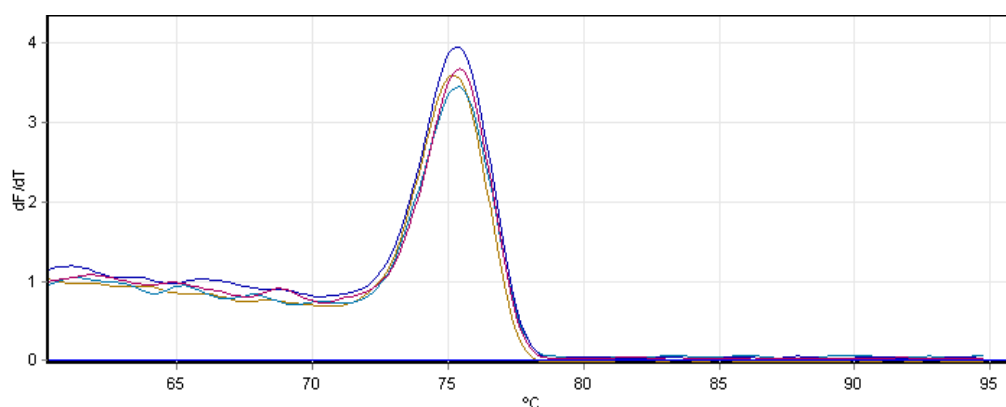
²Na osnovu 60 odraslih pčela iz društva.

5.2. Real-time PCR za detekciju i kvantifikaciju *L. passim*

Efikasnost amplifikacije se kretala od 95% do 100%. Za generisanje standardnih kriva korišćena su serijska razblaženja rekombinantne plazmidne DNK poznate koncentracije (Slika 7). Broj kopija po genomu je određen na osnovu veličine amplikona i preliminarnih rezultata da se 6 kopija po genu nalazi kod *L. passim*. Ovaj ili drugi set standarda je korišćen u svakoj *real-time* PCR reakciji (Slika 7). Nakon svakog završenog *real-time* PCR rađeno je topljenje (melting) umnoženim produkata (Slika 8).



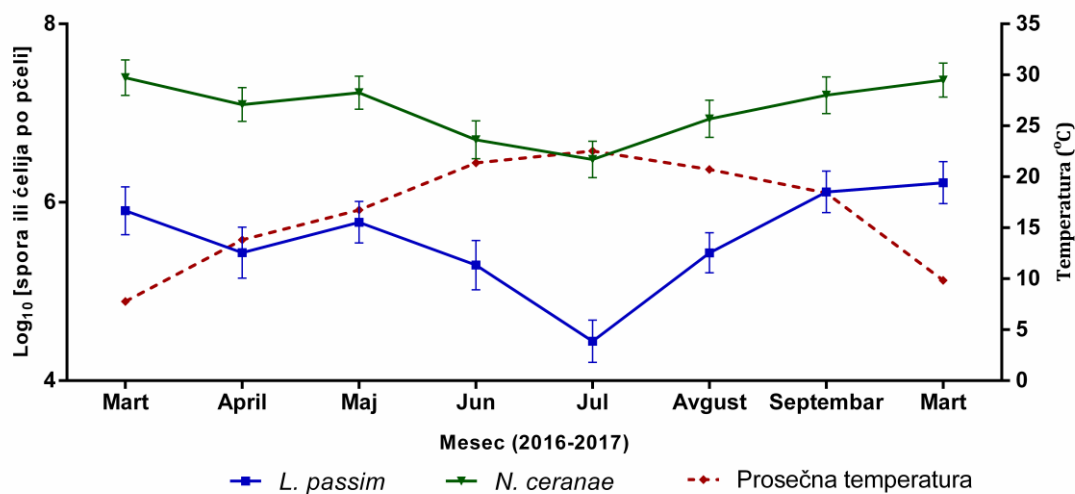
Slika 7. *Real-time* PCR fluorescentnih kriva standarda za *L. passim*. Standardi su dodati u serijskim razblaženjima od 1×10^7 do 1×10^4 plazmidne DNK, što rezultuje u 1×10^7 do 1×10^4 kopija po μl .



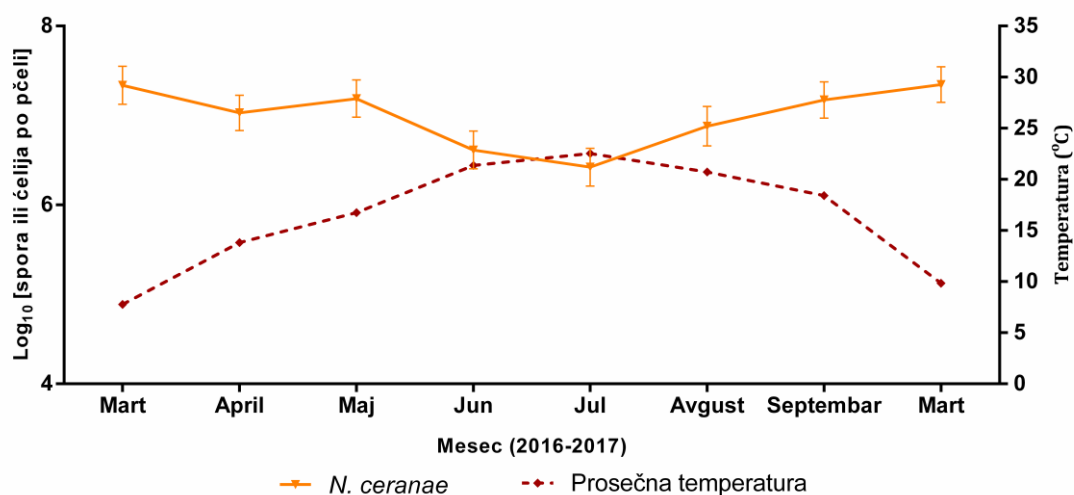
Slika 8. Topljenje (melting) produkata sa temperaturom u rasponu od 60 do 95°C, sa brzinom grejanja od 0,5°C po sekundi i konstantnim beleženjem nivoa fluorescencije

U analiziranim uzorcima iz *L. passim* + društava kao i iz *L. passim* – društava nije detektovana ni *C. mellifica* ni *N. apis*. Prosečne mesečne temperature od marta 2016. do marta 2017. godine izuzev zimskih meseci (oktobar-februar) za oba pčelinjaka su slične, za pčelinjak gde su se nalazila *L. passim* + društva prosečne mesečne temperature su prikazane na grafikonu 1, dok su za pčelinjak gde su se nalazila *L. passim* – društva prosečne mesečne temperature prikazane na grafikonu 2.

Posmatrajući nivo infekcije odraslih pčela kod *L. passim* + društava, može se videti da su *N. ceranae* i *L. passim* dostigle najveći nivo tokom zimskih meseci, dok je najniži nivo ova dva patogena zabeležen u julu, koji je ujedno i mesec sa najvećom prosečnom mesečnom temperaturom (Grafikon 1). Nivo infekcije sa *N. ceranae* kod *L. passim* – društava je sličan kao i kod *L. passim* + društava, najveći nivo infekcije sa *N. ceranae* je zabeležen u zimskim mesecima, a najniži u julu (Grafikon 2).

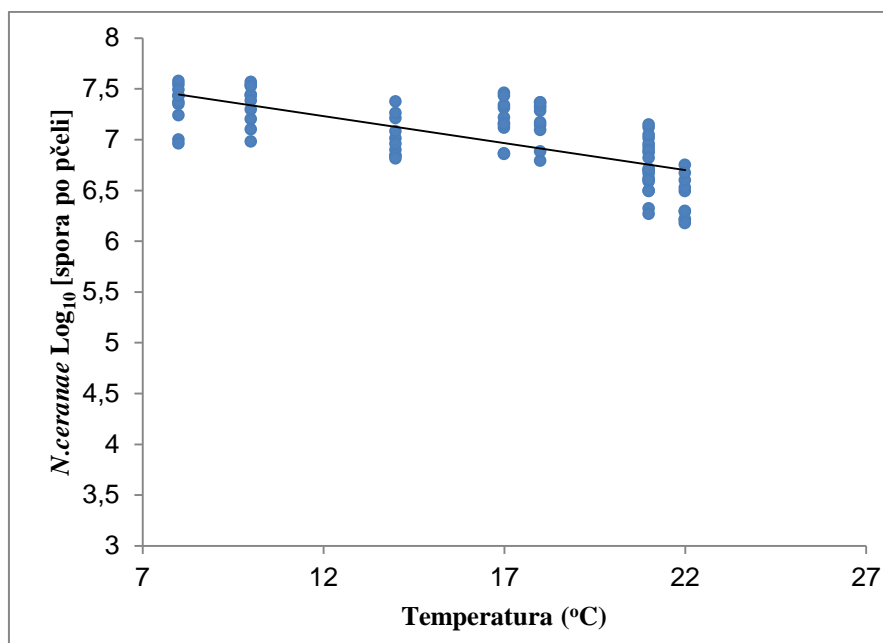


Grafikon 1. Prosečna mesečna temperatura i nivoi infekcije sa *N. ceranae* i *L. passim* (srednja vrednost ± standardna devijacija) kod *L. passim* + društava

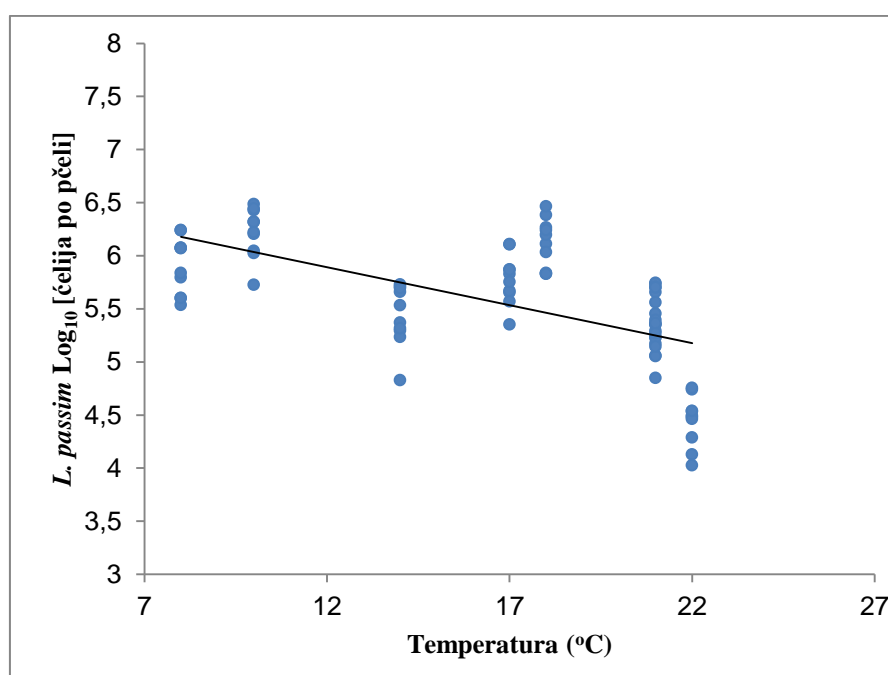


Grafikon 2. Prosečna mesečna temperatura i nivoi infekcije sa *N. ceranae* (srednja vrednost ± standardna devijacija) kod *L. passim* – društava

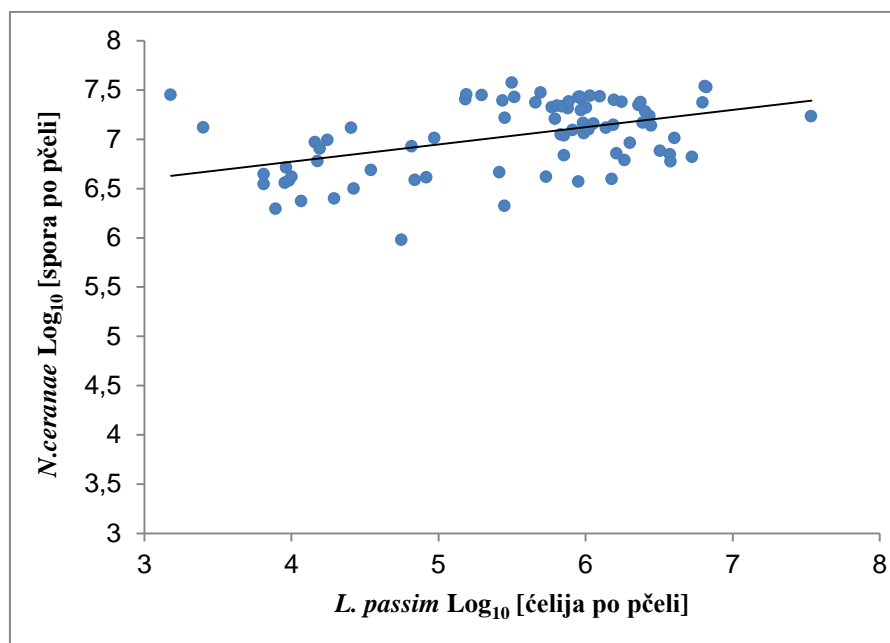
Posmatrajući korelacioni odnos između temperature i ova dva patogena kod *L. passim* + društava, ustanovljena je negativna korelaciona zavisnost za *N. ceranae* (Spearman | r | = -0,76, $p < 0,0001$) i *L. passim* (Spearman | r | = -0,64, $p < 0,0001$) (Grafikoni 3 i 4). Pozitivna korelacija (Spearman | r | = 0,66, $p < 0,0001$) je ustanovljena između *N. ceranae* i *L. passim* (Grafikon 5). Kod *L. passim* – društava ustanovljena je negativna korelacija između temperature i *N. ceranae* (Spearman | r | = -0,75, $p < 0,0001$) (Grafikon 6).



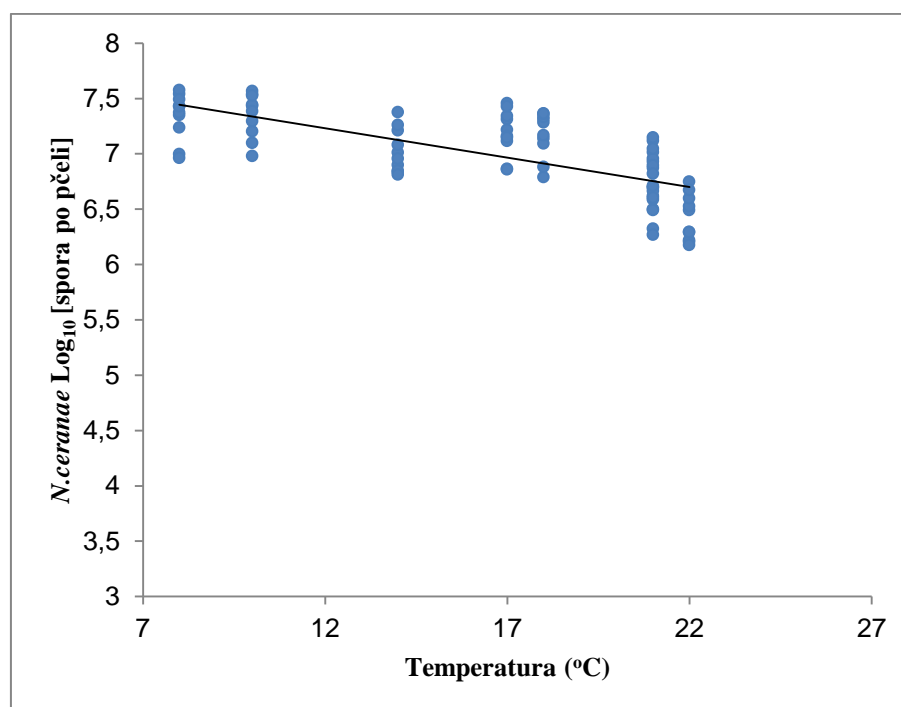
Grafikon 3. Dijagram raspršenosti (Scatter diagram) nivoa infekcije *N. ceranae* (\log_{10} spora po pčeli) u odnosu na temperaturu ($^{\circ}\text{C}$) kod *L. passim* + društava. Negativna korelacija \log_{10} spora po pčeli i temperature je statistički značajna ($n = 80$, Spearman $|r| = -0,76$, $p < 0,0001$).



Grafikon 4. Dijagram raspršenosti (Scatter diagram) nivoa infekcije *L. passim* (\log_{10} ćelija po pčeli) u odnosu na temperaturu ($^{\circ}\text{C}$) kod *L. passim* + društava. Negativna korelacija \log_{10} ćelija po pčeli i temperature je statistički značajna ($n = 80$, Spearman $|r| = -0,64$, $p < 0,0001$).



Grafikon 5. Dijagram raspršenosti (Scatter diagram) nivoa infekcije *N. ceranae* (\log_{10} spora po pčeli) u odnosu na *L. passim* (\log_{10} ćelija po pčeli) kod *L. passim* + društava. Negativna korelacija \log_{10} spora po pčeli i \log_{10} ćelija po pčeli je statistički značajna ($n = 80$, Spearman $|r| = 0,66$, $p < 0,0001$).



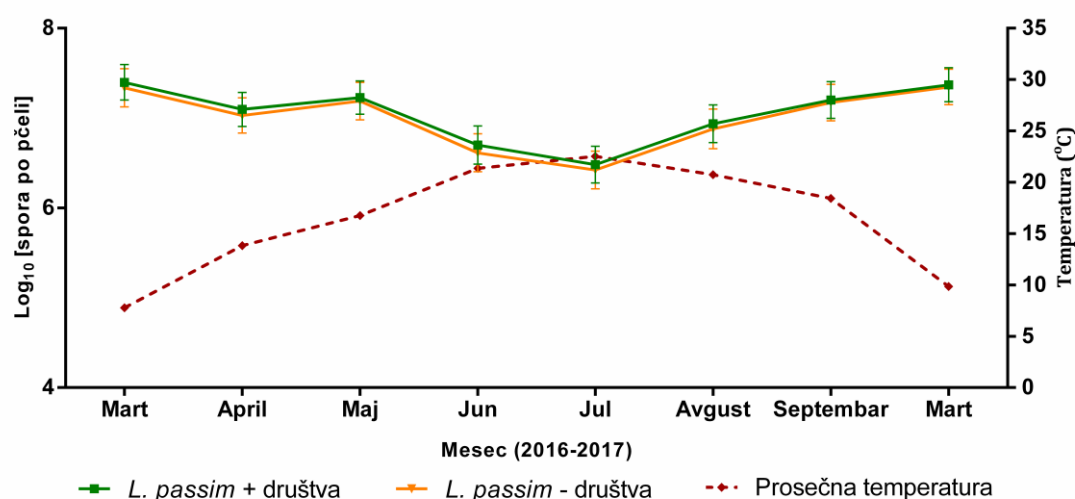
Grafikon 6. Dijagram raspršenosti (Scatter diagram) nivoa infekcije *N. ceranae* (\log_{10} spora po pčeli) u odnosu na temperaturu ($^{\circ}\text{C}$) kod *L. passim* - društava. Negativna korelacija \log_{10} spora po pčeli i temperature je statistički značajna ($n = 80$, Spearman $|r| = 0,75$, $p < 0,0001$).

Posmatrajući nivoe infekcije kod *L. passim* + društava ustanovljenje su statistički značajne razlike između mesečnih nivoa infekcije *N. ceranae* i *L. passim* kao i kod infekcije sa *N. ceranae* kod *L. passim* – društava (Tabela 9). Posmatrajući nivo infekcije sa *N. ceranae* kod *L. passim* + društava i *L. passim* – društava nije ustanovljena statistički značajna razlika u nivou infekcije između ove dve grupe po svim vremenima (dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjem u jednom faktoru; $F=2,153$, $p>0,05$) (Grafikon 7).

Tabela 9. Mesečni nivoi infekcije *N. ceranae* i *L. passim* kod *L. passim* + i *L. passim* – društava. Razlike između meseci unutar svake vrste prikazane su unutar kolona.

Godina	Mesec	<i>Lotmaria passim</i> + društva			<i>Lotmaria passim</i> - društva		
		n	Mesečno opterećenje infekcijom (log ₁₀ prosek±SD)		n	Mesečno opterećenje infekcijom (log ₁₀ prosek±SD)	
			<i>N. ceranae</i>	<i>L. passim</i>		<i>N. ceranae</i>	<i>L. passim</i>
2016	Mart	10	7,40±0,20 ^{ABC}	5,91±0,27 ^{ABCD}	10	7,34±0,21 ^{ABC}	ND
	April	10	7,10±0,19 ^{DE}	5,44±0,29 ^{AEFG}	10	7,03±0,20 ^{DE}	ND
	Maj	10	7,23±0,18 ^{FG}	5,78±0,23 ^{HI}	10	7,19±0,21 ^{FG}	ND
	Jun	10	6,70±0,21 ^{ADFHI}	5,30±0,28 ^{BHJKL}	10	6,61±0,21 ^{ADFHI}	ND
	Jul	10	6,48±0,20 ^{BEGJKL}	4,44±0,24 ^{CEIJMNO}	10	6,42±0,21 ^{BEGJKL}	ND
	Avgust	10	6,94±0,21 ^{CJM}	5,43±0,22 ^{DMPR}	10	6,88±0,22 ^{CJM}	ND
	Septembar	10	7,20±0,21 ^{HK}	6,12±0,23 ^{FKNP}	10	7,17±0,20 ^{HK}	ND
2017	Mart	10	7,37±0,19 ^{ILM}	6,22±0,23 ^{GLOR}	10	7,35±0,20 ^{ILM}	ND

n - broj košnica; ND – nije detektovano; Nivo infekcije *N. ceranae* je izražen kao log₁₀ spora/pčeli; Nivo infekcije *L. passim* je izražen kao log₁₀ ćelija/pčeli; Vrednosti sa istim slovima unutar iste kolone statistički se značajno razlikuju ^{A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, R} ($p\leq 0,05$).



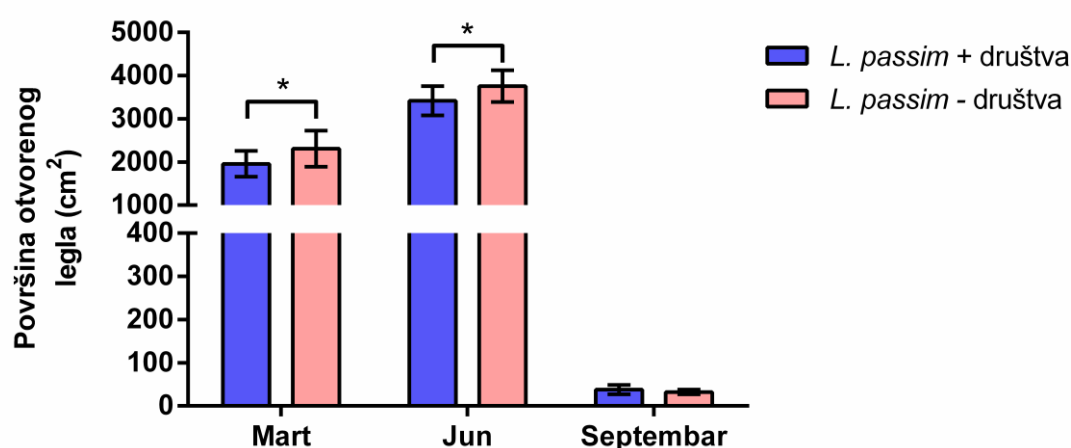
Grafikon 7. Prosečna mesečna temperatura i nivoi infekcije *N. ceranae* (srednja vrednost \pm standardna devijacija) kod *L. passim* + društava i *L. passim* - društava

5.3. Uticaj *L. passim* na jačinu i zdravstveno stanje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarskoj proizvodnji

5.3.1. Parametri jačine pčelinjih društava

5.3.1.1. Površina otvorenog legla

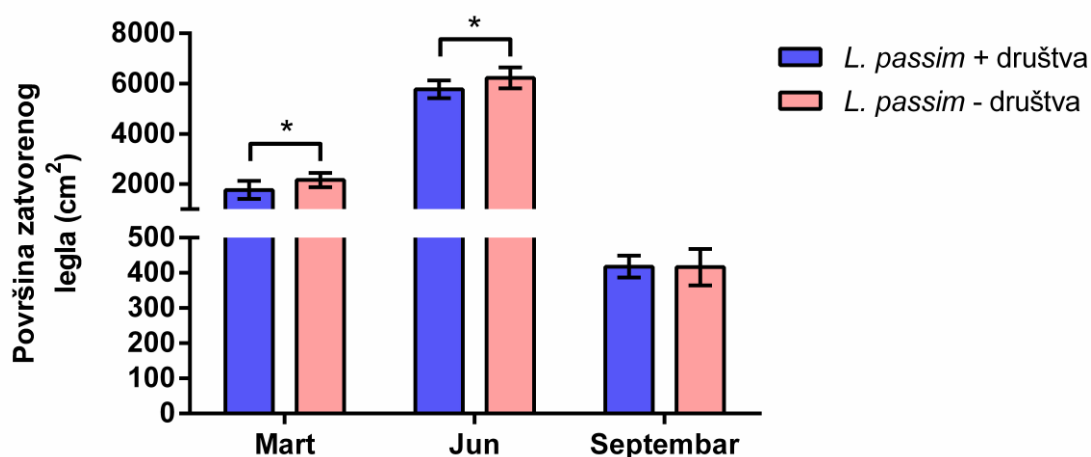
Statističkom analizom podataka za površinu otvorenog legla (cm^2) između dve posmatrane grupe u tri posmatrana perioda, ustanovljeno je da su u martu *L. passim* – društva ($2310,00 \pm 416,92$) imala statistički značajno (*t* test za nezavisne uzorke, $t=2,17$ $df=18$, $p<0,05$) veću površinu otvorenog legla (cm^2) u odnosu na mart kod *L. passim* + društava ($1958,00 \pm 297,39$). Daljom statističkom analizom ustanovljena je površina otvorenog legla (cm^2) u junu kod *L. passim* – društava ($3756,50 \pm 369,01$) bila statistički značajno (*t* test za nezavisne uzorke, $t=2,13$ $df=18$, $p<0,05$) veća u odnosu na jun kod *L. passim* + društava ($3418,50 \pm 341,26$). U septembru su *L. passim* + društva ($37,80 \pm 10,91$) imala veću površinu otvorenog legla (cm^2) u odnosu na *L. passim* – društva ($32,30 \pm 5,52$), ali između njih nije ustanovljena statistički značajna razlika (*t* test za nezavisne uzorke, $t=1,422$ $df=18$, $p>0,05$) (Grafikon 8).



Grafikon 8. Površina otvorenog legla prikazana u cm², a predstavljena kao srednja vrednost ± standardna devijacija kod košnica iz *L. passim* + društava i *L. passim* – društava posmatranih u tri perioda. Za poređenje dve grupe korišćen je *t* test za nezavisne uzorke. Statistički značajne razlike su prikazane sa **p*<0,05; *n*=10.

5.3.1.2. Površina zatvorenog legla

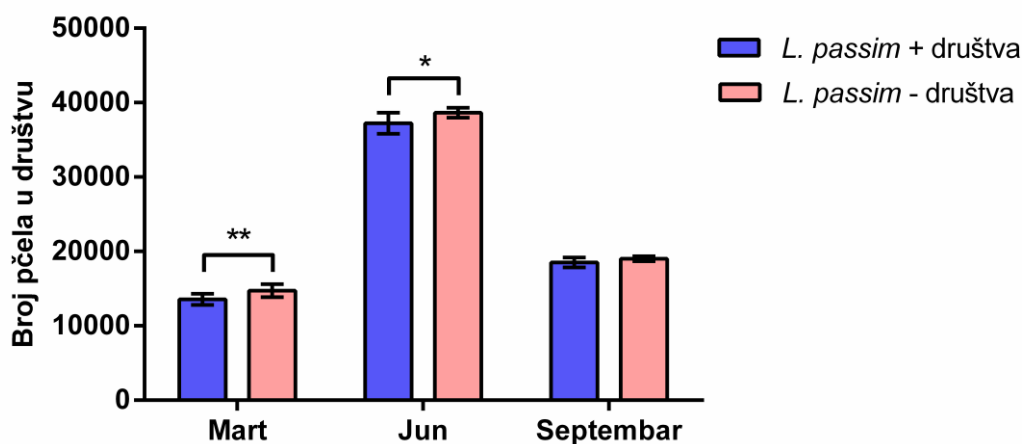
Statističkom analizom podataka za površinu zatvorenog legla (cm²) između dve posmatrane grupe u tri posmatrana perioda, ustanovljeno je da su u martu *L. passim* – društava (2162,50±285,21) imala statistički značajno (*t* test za nezavisne uzorke, *t*=2,74 *df*=18, *p*<0,05) veću površinu zatvorenog legla (cm²) u odnosu na isti mesec kod *L. passim* + društava (1764,00±360,25). Daljom statističkom analizom ustanovljeno je da je površina zatvorenog legla (cm²) u junu kod *L. passim* – društava (6224,00±415,62) bila statistički značajno (*t* test za nezavisne uzorke, *t*=2,60 *df*=18, *p*<0,05) veća u odnosu na jun kod *L. passim* + društava (5774,00±356,96). U septembru nije ustanovljena statistički značajna razlika (*t* test za nezavisne uzorke, *t*=0,08 *df*=18, *p*>0,05) između površine zatvorenog legla (cm²) kod *L. passim* + (417,09±31,26) i *L. passim* – društava (416,40±51,96) (Grafikon 9).



Grafikon 9. Površina zatvorenog legla prikazana u cm², a predstavljena kao srednja vrednost ± standardna devijacija kod košnica iz *L. passim* + društava i *L. passim* – društava posmatranih u tri perioda. Za poređenje dve grupe korišćen je *t* test za nezavisne uzorke. Statistički značajne razlike su prikazane sa **p*<0,05; *n*=10.

5.3.1.3. Broj odraslih pčela u košnici

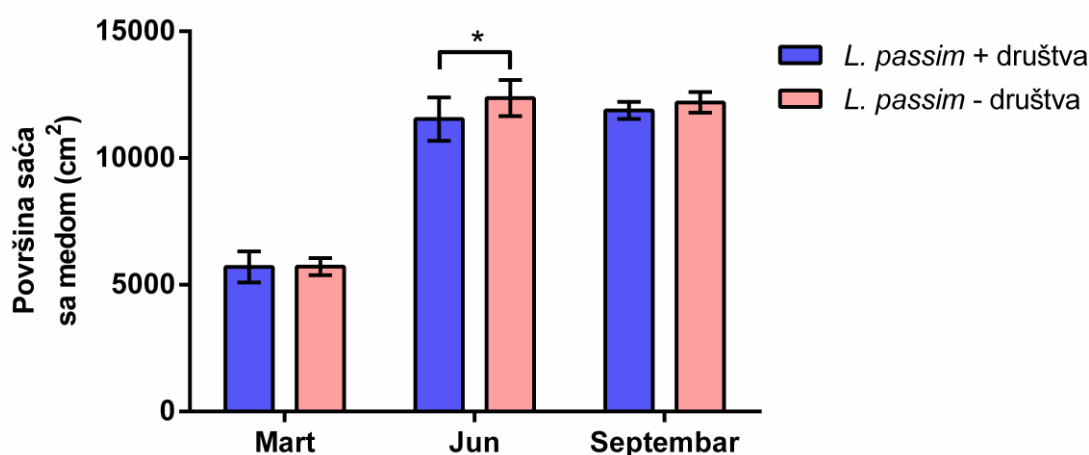
Statističkom analizom podataka za broj odraslih pčela između dve posmatrane grupe u tri posmatrana perioda, ustanovljeno je da su u martu *L. passim* – društava (14720,00±872,80) imala statistički vrlo značajno (*t* test za nezavisne uzorke, *t*=3,15 *df*=18, *p*<0,01) veći broj odraslih pčela u odnosu na isti mesec kod *L. passim* + društava (13561,00±767,56). Daljom statističkom analizom ustanovljeno je da je broj pčela u junu kod *L. passim* – društava (38639,30±654,70) bio statistički značajno (*t* test za nezavisne uzorke, *t*=2,84 *df*=18, *p*<0,05) veći u odnosu na jun kod *L. passim* + društava (37232,30±1425,17). U septembru nije ustanovljena statistički značajna razlika (*t* test za nezavisne uzorke, *t*=2,05 *df*=18, *p*>0,05) između broja pčela kod *L. passim* + (18518,00±678,60) i *L. passim* – društava (19007,80±335,93) (Grafikon 10).



Grafikon 10. Broj pčela u društvu predstavljena kao srednja vrednost \pm standardna devijacija kod košnica iz *L. passim* + društava i *L. passim* – društava posmatranih u tri perioda. Za poređenje dve grupe korišćen je *t* test za nezavisne uzorke. Statistički značajne razlike su prikazane sa * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 10$.

5.3.1.4. Rezerve meda

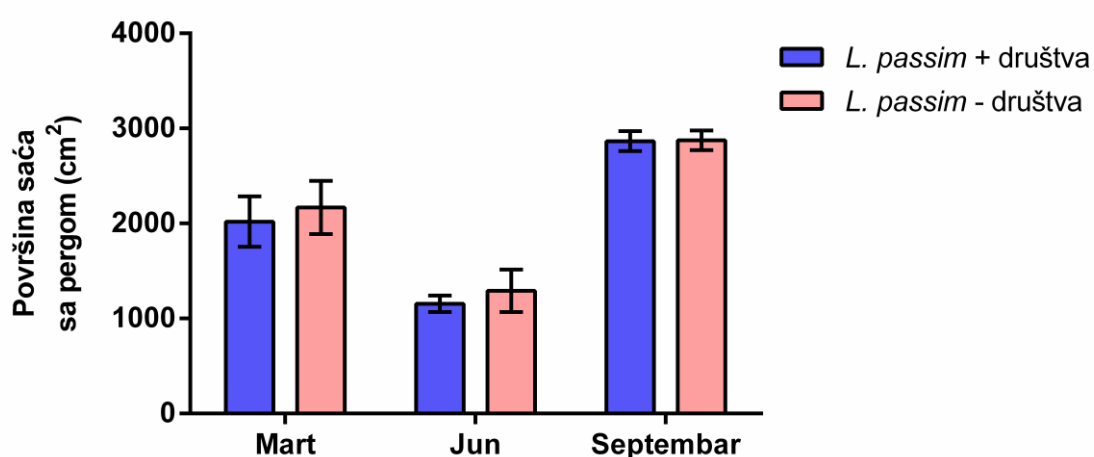
Statističkom analizom podataka za rezerve meda između dve posmatrane grupe u tri posmatrana perioda, utvrđeno je da u martu između *L. passim* – društava ($5722,00 \pm 334,86$) i *L. passim* + društava ($5708,00 \pm 615,30$) nije ustanovljena statistički značajna razlika (*t* test za nezavisne uzorke, $t = 0,06$ $df = 18$, $p > 0,05$). Daljom statističkom analizom ustanovljeno je da su rezerve meda u junu kod *L. passim* – društava ($12365,00 \pm 712,14$) bile statistički značajno (*t* test za nezavisne uzorke, $t = 2,33$ $df = 18$, $p < 0,05$) veća u odnosu na isti mesec kod *L. passim* + društava ($11542,50 \pm 857,44$). U septembru nije ustanovljena statistički značajna razlika (*t* test za nezavisne uzorke, $t = 1,88$ $df = 18$, $p > 0,05$) između rezervi meda kod *L. passim* + ($11881,40 \pm 343,23$) i *L. passim* – društava ($12196,00 \pm 404,67$) (Grafikon 11).



Grafikon 11. Površina saća sa medom prikazana u cm², a predstavljena kao srednja vrednost ± standardna devijacija kod košnica iz *L. passim* + društava i *L. passim* – društava posmatranih u tri perioda. Za poređenje dve grupe korišćen je *t* test za nezavisne uzorke. Statistički značajne razlike su prikazane sa **p*<0,05; *n*=10.

5.3.1.5. Rezerve perge

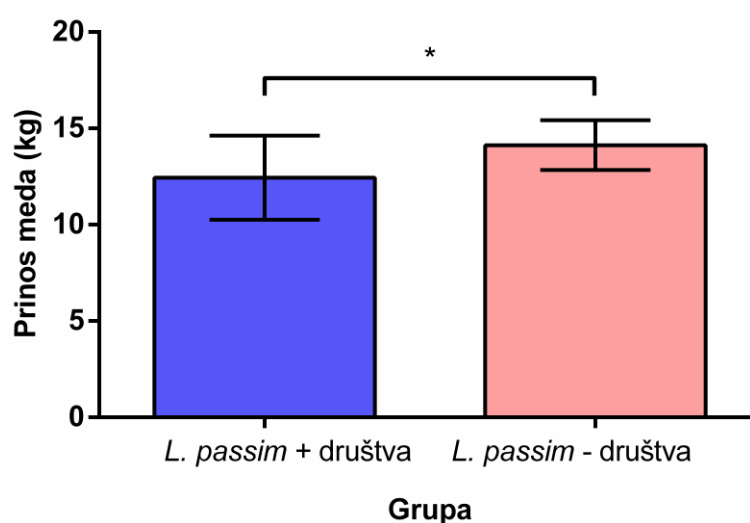
Statističkom analizom podataka za rezerve perge između dve posmatrane grupe u tri posmatrana perioda, nije utvrđena statistički značajna razlika. U maru su *L. passim* – društva (2019,00±265,39) imala veću prosečnu količinu perge u odnosu na isti mesec kod *L. passim* + društva (2168,50±278,83), ali između njih nije utvrđena statistički značajna razlika (*t* test za nezavisne uzorke, *t*=1,228 *df*=18, *p*>0,05). U junu su *L. passim* – društva (1291,00±224,30) imala veću prosečnu količinu perge u odnosu na jun kod *L. passim* + društva (1155,00±86,28), međutim između ove dve grupe nije utvrđena statistički značajna razlika (*t* test za nezavisne uzorke, *t*=1,79 *df*=18, *p*>0,05). Takođe i u septembru su *L. passim* – društva (2875,00±224,30) imala veću prosečnu količinu perge u odnosu na isti mesec kod *L. passim* + društva (2866,60±104,62), međutim ni između ove dve grupe nije ustanovljena statistički značajna razlika (*t* test za nezavisne uzorke, *t*=0,1809 *df*=18, *p*>0,05) (Grafikon 12).



Grafikon 12. Površina saća sa pergom prikazana u cm², a predstavljena kao srednja vrednost ± standardna devijacija kod košnica iz *L. passim* + društava i *L. passim* – društava posmatranih u tri perioda. Za poređenje dve grupe korišćen je *t* test za nezavisne uzorke.

5.3.2. Produktivnost pčelinjih društava

Statističkom analizom podataka za prinos meda (kg) između dve posmatrane grupe, ustanovljeno je da su *L. passim* – društva (14,13±1,29) imala statistički značajno veći (*t* test za nezavisne uzorke, $t=2,133$ $df=18$, $p<0,05$) prinos meda u odnosu na *L. passim* + društva (12,44±2,19). Minimalni prinos meda u *L. passim* – društvima je 12,25 kg, dok je maksimalni prinos bio 16,56 kg. Minimalni prinos meda u *L. passim* + društvima je 8,24 kg, a maksimalan prinos je bio 15,05 kg (Grafikon 13).



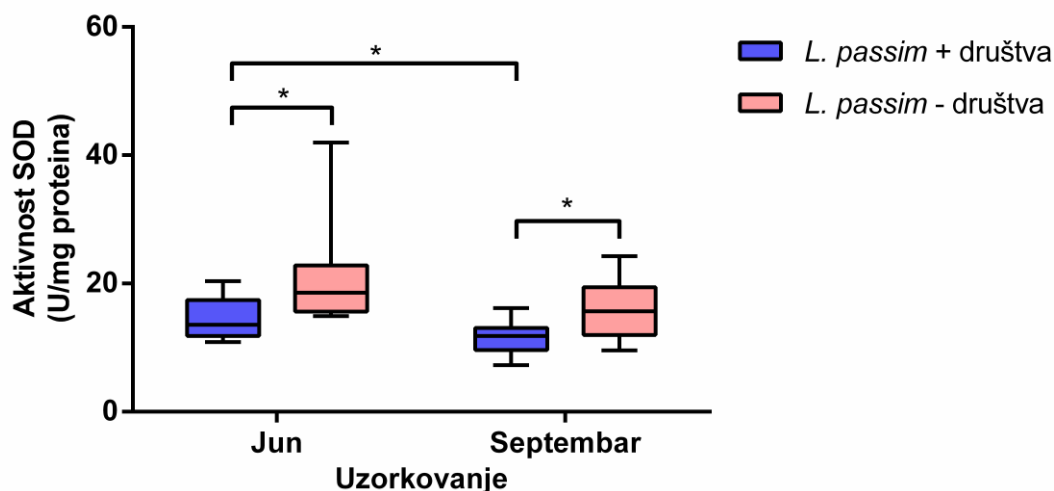
Grafikon 13. Prinos meda prikazan u kg, a predstavljen kao srednja vrednost \pm standardna devijacija kod košnica iz *L. passim* + društava i *L. passim* – društava. Za poređenje dve grupe korišćen je *t* test za nezavisne uzorke. Statistički značajne razlike su prikazane sa * $p < 0,05$; $n = 10$.

5.3.3. Parametri oksidativnog stresa

5.3.3.1. Aktivnost superoksid dismutaze

Statističkom obradom podataka za SOD ustanovljeno je da su *L. passim* - društva u junskom uzorkovanju imala najveću vrednost (medijana=18,55; interkvartilni opseg=15,62-22,84), sto je statistički značajno više (Mann-Whitney U-test; $p < 0,05$) u odnosu na junsko uzorkovanje kod *L. passim* + društava (medijana=13,56; interkvartilni opseg=11,82-17,40). Daljom analizom ustanovljena je statistički značajna razlika (Mann-Whitney U-test; $p < 0,05$) između septembarskog uzorkovanja kod *L. passim* + društava (medijana=11,83; interkvartilni opseg=9,63-13,06) i *L. passim* - društava (medijana=15,68; interkvartilni opseg=11,99-19,43). Statistički značajna razlika (*t* test za zavisne uzorke; $t = 2,56$; $df = 9$; $p < 0,05$) ustanovljena je između junskog (medijana=13,56; interkvartilni opseg=11,82-17,40) i septembarskog (medijana=11,83; interkvartilni opseg=9,63-13,06) uzorkovanja kod *L. passim* + društava. Statistički značajna razlika nije ustanovljena (Wilcoxon matched pairs test; $p > 0,05$) između

junskog (medijana=18,55; interkvartilni opseg=15,62-22,84) i septembarskog (medijana=15,68; interkvartilni opseg=11,99-19,43) uzorkovanja kod *L. passim* – društava (Grafikon 14).

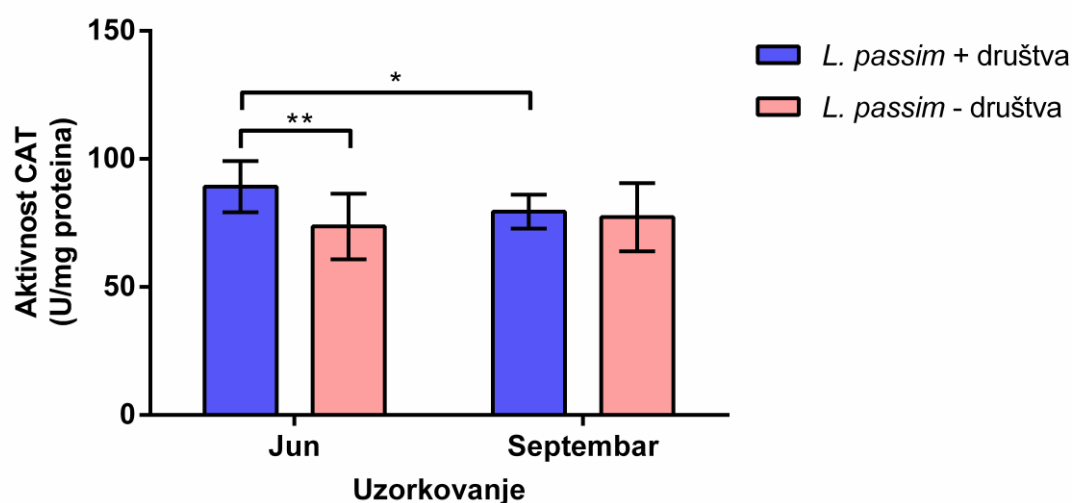


Grafikon 14. Specifična aktivnost superoksid dismutaze (SOD) izražena u jedinicama enzima po miligramu ukupnih proteina je predstavljena boxplotom koji prikazuje interkvartilni opseg (kutija), medijanu (linija koja preseca kutiju), minimalnu i maksimalnu vrednost (horizontalne linije iz kutije) kod pčela iz *L. passim* + društava i *L. passim* – društava iz dva perioda. Za poređenje dve grupe korišćen je Mann-Whitney U-test, a za poređenje grupe sa ponovljenim merenjem *t* test za zavisne uzorke, ili Wilcoxon matched pairs test. Statistički značajne razlike su prikazane sa * $p < 0,05$; $n = 10$.

5.3.3.2. Aktivnost katalaze (CAT)

Analizom podataka za CAT utvrđeno je da su *L. passim* + društva u junskom uzorkovanju imala najveću vrednost CAT ($89,18 \pm 10,05$), sto je statistički vrlo značajno više (*t* test za nezavisne uzorke; $t = 3,01$; $df = 18$; $p < 0,01$) u odnosu na junsko uzorkovanje kod *L. passim* - društava koja su imala najmanju vrednost CAT ($73,67 \pm 12,82$), a statistički značajno više (*t* test za zavisne uzorke; $t = 3,20$; $df = 9$; $p < 0,05$) u odnosu na septembarsko uzorkovanje kod *L. passim* + društava ($79,42 \pm 6,63$). Između junskog ($73,67 \pm 12,82$) i septembarskog ($77,26 \pm 13,34$) uzorkovanja kod *L. passim* - društava nije ustanovljena statistički značajna razlika (*t* test za zavisne uzorke; $t = 1,11$; $df = 9$; $p > 0,05$). Takođe, statistički značajna razlika nije ustanovljena (*t* test za nezavisne

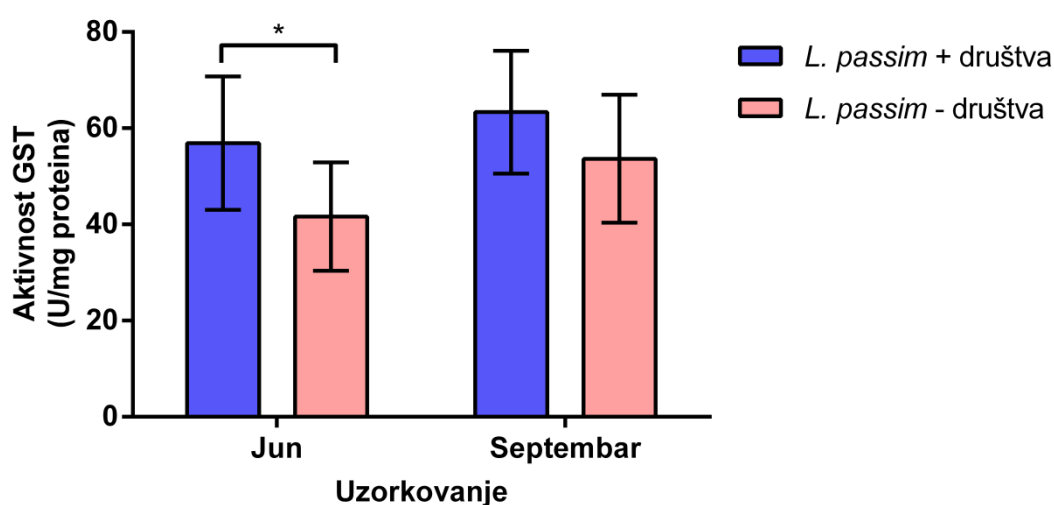
uzorke; $t=0,46$; $df=18$; $p>0,05$) ni između septembarskog uzorkovanja kod *L. passim* + društava ($79,42\pm 6,63$) i *L. passim* - društava ($77,26\pm 13,34$) (Grafikon 15).



Grafikon 15. Specifična aktivnost katalaze (CAT) izražena u jedinicama enzima po miligramu ukupnih proteina i predstavljena kao srednja vrednost \pm standardna devijacija kod pčela iz *L. passim* + društava i *L. passim* – društava iz dva perioda. Za poređenje dve grupe korišćen je *t* test za nezavisne uzorke, a za poređenje grupe sa ponovljenim merenjem korišćen je *t* test za zavisne uzorke. Statistički značajne razlike su prikazane sa * $p<0,05$, ** $p<0,01$, $n=10$.

5.3.3.3. Aktivnost glutation S-transferaze

Statističkom analizom podataka GST, utvrđeno je da najmanju vrednost imaju *L. passim* - društva u junskom uzorkovanju ($41,66\pm 11,26$) što je statistički značajno manje (*t* test za nezavisne uzorke; $t=2,69$; $df=18$; $p<0,05$) u odnosu na isto uzorkovanje u *L. passim* + društava ($56,87\pm 13,87$). Kod septembarskog uzorkovanja između *L. passim* + društava ($63,34\pm 12,77$) i *L. passim* – društava ($53,66\pm 13,32$) nije ustanovljena statistički značajna razlika (*t* test za nezavisne uzorke $t=1,66$; $df=18$; $p>0,05$). Statistički značajna razlika nije ustanovljena ni između junskog ($56,87\pm 13,87$) i septembarskog ($63,34\pm 12,77$) uzorkovanja kod *L. passim* + društava (*t* test za zavisne uzorke; $t=0,91$; $df=9$; $p>0,05$), kao ni između junskog ($41,66\pm 11,26$) i septembarskog ($53,66\pm 13,32$) uzorkovanja kod *L. passim* – društava (*t* test za zavisne uzorke; $t=1,975$; $df=9$; $p>0,05$) (Grafikon 16).

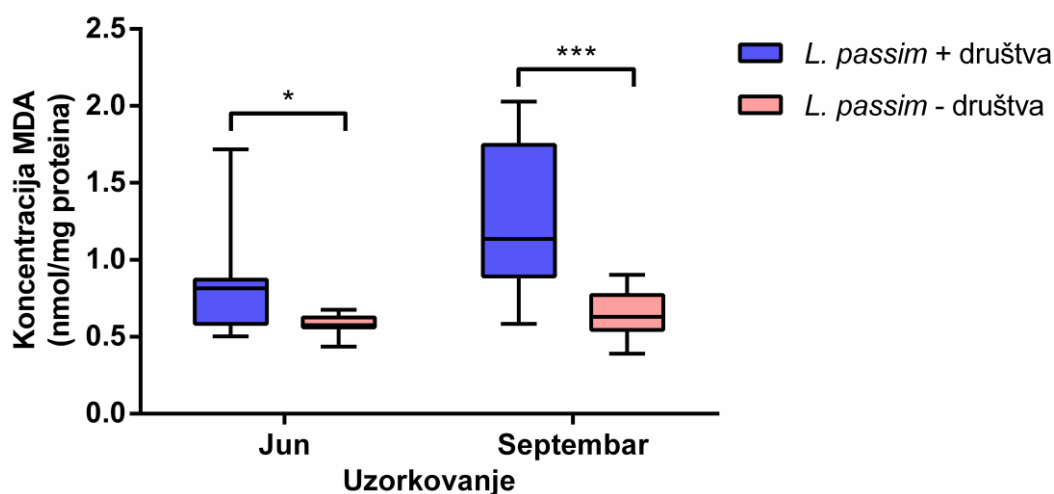


Grafikon 16. Specifična aktivnost glutation S-transferaze (GST) izražena u jedinicama enzima po miligramu ukupnih proteina i predstavljena kao srednja vrednost \pm standardna devijacija kod pčela iz *L. passim* + društava i *L. passim* – društava iz dva perioda. Za poređenje dve grupe korišćen je *t* test za nezavisne uzorke, a za poređenje grupe sa ponovljenim merenjem *t* testom za zavisne uzorke. Statistički značajne razlike su prikazane sa * $p < 0,05$; $n = 10$.

5.3.3.4. Koncentracija malondialdehida (MDA)

Statističkom obradom podataka za MDA ustanovljeno je da su *L. passim* + društva u septembarskom uzorkovanju imala najveću vrednost (medijana=1,14; interkvartilni opseg=0,89-1,75), što je statistički vrlo značajno više (Mann-Whitney U test; $p < 0,001$) u odnosu na septembarsko uzorkovanje kod *L. passim* - društava (medijana=0,63; interkvartilni opseg=0,54-0,77). Daljom analizom ustanovljena je statistički značajna razlika (Mann-Whitney U test; $p < 0,05$) između janskog uzorkovanja kod *L. passim* + društava (medijana=0,82; interkvartilni opseg=0,59-0,87) i *L. passim* – društava (medijana=0,58; interkvartilni opseg=0,56-0,63). Statistički značajna razlika nije ustanovljena (Wilcoxon matched pairs test; $p > 0,05$) između janskog (medijana=0,82; interkvartilni opseg=0,59-0,87) i septembarskog (medijana=1,14; interkvartilni opseg=0,89-1,75) uzorkovanja kod *L. passim* + društava. Takođe, nije ustanovljena statistički značajna razlika (*t* test za zavisne uzorke; $t = 1,17$; $df = 9$; $p > 0,05$) ni između janskog (medijana=0,58; interkvartilni opseg =0,56-0,63) i septembarskog

(medijana=0,63; interkvartilni opseg =0,54-0,77) uzorkovanja kod *L. passim* - društava (Grafikon 17).



Grafikon 17. Koncentracija malondialdehida (MDA) izražena je u nanomolima po miligramu ukupnih proteina (nmol/mg proteina) i predstavljena je boxplotom koji prikazuje interkvartilni opseg (kutija), medijanu (linija koja preseca kutiju), minimalnu i maksimalnu vrednost (horizontalne linije iz kutije) kod pčela iz *L. passim* + društava i *L. passim* – društava iz dva perioda. Za poređenje dve grupe korišćen je Mann-Whitney U-test, a za poređenje grupe sa ponovljenim merenjem ili *t* test za zavisne uzorke, ili Wilcoxon matched pairs test. Statistički značajne razlike su prikazane sa * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n=10$.

5.3.4. Determinacija faktora i izrada programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima

Jedan od vrlo važnih stavki pri izradi programa je utvrđivanje i kvantifikacija svih troškova neophodnih za pravilno i kontinuirano sprovođenje programa. Izrada programa za smanjenje infekta u pčelinjim društvima je kompleksan, vrlo obiman i delikatan posao, pa smo pri njegovoj izradi koristili određene normativne vrednosti, dobijene rezultate prethodnog istraživanja i tehničko-tehnološke standarde kao polazne elemente koji su neophodni za pravilno definisanje potrebnih aktivnosti. Svi navedeni novčani

iznosi, odnosno cene koje su korišćene u analizi, izračunate su na osnovu tržišnih cena na dan 20.06.2018. godine.

Nakon planiranih troškova za sprovođenje programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima, planirana je i dobit koja se očekuje od primene mera u sprovođenju programa.

Prilikom određivanja trajanja vremenskog perioda koji je optimalan za izradu programa za smanjenje infekta u pčelinjim društvima, koristili smo rezultate sopstvenih istraživanja. Odredili smo da optimalna dužina trajanja programa iznosi pet godina. Na osnovu naših saznanja ovo je optimalan rok da jedan ovako kompleksan i sveobuhvatan program da relevantne rezultate.

Analizirajući planirane troškove u petogodišnjem periodu sprovođenja programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima ustanovljeno je da kod modela A oni iznose 4.210.557,13 dinara. Od ukupnih troškova kod modela A na troškove nabavke materijala i održavanje odlazi 24,99%, 4,77% obuhvataju troškovi nabavke rojeva i matica, na prihranjivanje odlazi 9,50%, na veterinarske usluge 9,17%, 1,11% iznosi dezinfekcija košnica i prostora, a ukupni troškovi rada iznose 2.124.561,60 dinara, odnosno 50,46% (Tabela 10)

Tabela 10. Struktura planiranih troškova kod modela A za izradu programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima (sve vrednosti su prikazane u dinarima)

Troškovi	Godine					Ukupno
	1	2	3	4	5	
Nabavka materijala i održavanje	210.444,00	210.444,00	210.444,00	210.444,00	210.444,00	1.052.220,00
Nabavka rojeva i matica	40.130,61	40.130,61	40.130,61	40.130,61	40.130,61	200.653,05
Prihranjivanje	80.000,00	80.000,00	80.000,00	80.000,00	80.000,00	400.000,00
Veterinarske usluge	77.242,50	77.242,50	77.242,50	77.242,50	77.242,50	386.212,48
Dezinfekcija košnica i prostora	9.382,00	9.382,00	9.382,00	9.382,00	9.382,00	4.6910,00
Rad	424.912,32	424.912,32	424.912,32	424.912,32	424.912,32	2.124.561,60
Ukupno	842.112,43	842.113,43	842.114,43	842.115,43	842.116,43	4.210.557,13

Planirana dobit kod modela A iznosi 9.168.180,46 dinara. Od ukupne planirane dobiti proizvodnja rojeva i matica iznosi 22,19%, proizvodnja meda 42,27%, 15,08% iznosi

proizvodnja voska, proizvodnja polena 16,02% i proizvodnja propolisa 4,45% (Tabela 11)

Tabela 11. Struktura planirane dobiti kod modela A za izradu programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima (sve vrednosti su prikazane u dinarima)

Proizvodnja	Godine					Ukupno
	1	2	3	4	5	
Rojeva i matica	359.995,16	377.994,92	395.994,68	431.994,19	467.993,71	2.033.972,65
Meda	672.777,84	706.416,73	741.737,57	815.911,33	938.298,02	3.875.141,49
Voska	240.000,00	252.000,00	264.600,00	291.060,00	334.719,00	1.382.379,00
Polena	255.000,00	267.750,00	281.137,50	309.251,25	355.638,94	1.468.777,69
Propolisa	70.818,72	74.359,66	78.077,64	85.885,40	98.768,21	407.909,63
Ukupno	1.598.591,72	1.678.521,31	1.761.547,38	1.934.102,17	2.195.417,88	9.168.180,46

Ukupni planirani troškovi za sprovođenje petogodišnjeg programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima kod modela B iznose 4.260.557,13 dinara. Razmatrajući strukturu troškova utvrđeno je da najveći procenat zauzimaju troškovi rada (49,87%), zatim troškovi nabavke materijala i održavanja (24,70%), a zatim troškovi prihranjivanja (9,39%), troškovi veterinarskih usluga (9,06%), troškovi registracija gazdinstva i košnica (1,17%) i troškovi dezinfekcije košnica i prostora (1,10%) (Tabela 12)

Tabela 12. Struktura planiranih troškova kod modela B za izradu programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima (sve vrednosti su prikazane u dinarima)

Troškovi	Godine					Ukupno
	1	2	3	4	5	
Nabavka materijala i održavanje	210.444,00	210.444,00	210.444,00	210.444,00	210.444,00	1.052.220,00
Nabavka rojeva i matica	40.130,61	40.130,61	40.130,61	40.130,61	40.130,61	200.653,05
Prihranjivanje	80.000,00	80.000,00	80.000,00	80.000,00	80.000,00	400.000,00
Veterinarske usluge	77.242,50	77.242,50	77.242,50	77.242,50	77.242,50	386.212,48
Dezinfekcija košnica i prostora	9.382,00	9.382,00	9.382,00	9.382,00	9.382,00	46.910,00
Rad	424.912,32	424.912,32	424.912,32	424.912,32	424.912,32	2.124.561,60
Registracija gazdinstva i košnica	10.000,00	10.000,00	10.000,00	10.000,00	10.000,00	50.000,00
Ukupno	852.112,43	852.113,43	852.114,43	852.115,43	852.116,43	4.260.557,13

Ukupna planirana dobit kod modela B koja nastaje kao posledica sprovođenja mera za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima iznosi 9.528.180,46 dinara. U strukturu planirane dobiti najveći procenat obuhvata proizvodnja meda (40,67%), zatim proizvodnja rojeva i matica (21,35%), proizvodnja polena (15,42%), proizvodnja voska (14,51%), proizvodnja propolisa (4,28%) i subvencije (3,78%) (Tabela 13)

Tabela 13. Struktura planirane dobiti kod modela B za izradu programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima (sve vrednosti su prikazane u dinarima)

Proizvodnja	Godine					Ukupno
	1	2	3	4	5	
Rojeva i matica	359.995,16	377.994,92	395.994,68	431.994,19	467.993,71	2.033.972,65
Meda	672.777,84	706.416,73	741.737,57	815.911,33	938.298,02	3.875.141,49
Voska	240.000,00	252.000,00	264.600,00	291.060,00	334.719,00	1.382.379,00
Polena	255.000,00	267.750,00	281.137,50	309.251,25	355.638,94	1.468.777,69
Propolisa	70.818,72	74.359,66	78.077,64	85.885,40	98.768,21	407.909,63
Subvencije	72.000,00	72.000,00	72.000,00	72.000,00	72.000,00	360.000,00
Ukupno	1.670.591,72	1.750.521,31	1.833.547,38	2.006.102,17	2267417,88	9.528.180,46

5.3.5. Analiza troškova i dobiti

Nakon utvrđivanja svih troškova neophodnih za sprovođenje programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima, kao i prikaza i procene svih dobiti nastalih kao posledica tog smanjenja, pristupljeno je ekonomskoj evaluaciji projektovanog programa. Opravdanost programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima, odnosno ekonomska evaluacija izvedena je pomoću *cost-benefit* analize. Pošto je u pitanju primena dinamičkog metoda, bilo je neophodno izvršiti diskontovanje svih novčanih vrednosti koje bi se koristile u ovom programu kako bi se one svele na sadašnju vrednost. Da bi se ovo uradilo primenjen je odgovarajući diskontni faktor. Na osnovu trenutnih inflatornih kretanja, bankarskih kamata i procene kamatnih stopa u budućnosti ustanovili smo se da se sva diskontovanja izvedu na osnovu diskontne stope od 3,00%. Procesom diskontovanja je utvrđena sadašnja vrednost troškova i dobiti i na osnovu ove analize određeni su osnovni kriterijumi za ocenu ekonomske opravdanosti sprovođenja programa za

smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima. Ekonomska opravdanost programa procenjena je na osnovu neto sadašnje vrednosti (NSV), odnosa dobiti i troškova (CBR) i interne stope povraćaja (ISP). Prilikom izračunavanja parametara postavljena su dva modela: **model A** pri čijem izračunavanju nisu uzeti u obzir troškovi registracije domaćinstva i košnica i **model B** koji obuhvata sve troškove predviđene programom za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima.

Analizirajući dobijene rezultate ekonomske evaluacije projektovanih modela za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima pomoću *cost-benefit* analize ustanovljeno je da je NSV (Neto sadašnja vrednost) u oba ispitivana modela veća od nule (Tabela 14 i 15). Neto sadašnja vrednost modela A iznosi 4.501.837,77 dinara, a NSV modela B je 4.785.779,61 dinara. Na osnovu izračunatog pozitivnog odnosa dobiti i troškova u oba modela (model A 2,17 i model B 2,23) ustanovili smo da je ekonomska opravdanost programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima pozitivna i ekonomski opravdana jer se dobija pozitivni finansijski efekat u oba modela. Na osnovu analiza izvršenih pomoću interne stope povraćaja (ISP) utvrđeno je da je ekonomska opravdanost oba modela slična i postojana sve dok kamatna stopa na godišnjem nivou ne neprelazi 42,80%.

Tabela 14. Modeli programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima

Godine	Model A		Model B	
	Troškovi	Dobit	Troškovi	Dobit
1	842112,43	1598591,72	852112,43	1670591,72
2	842113,43	1678521,31	852113,43	1750521,31
3	842114,43	1761547,38	852114,43	1833547,38
4	842115,43	1934102,17	852115,43	2006102,17
5	842116,43	2195417,88	852116,43	2267417,88
Ukupno	4210572,13	9168180,46	4260572,13	9528180,46

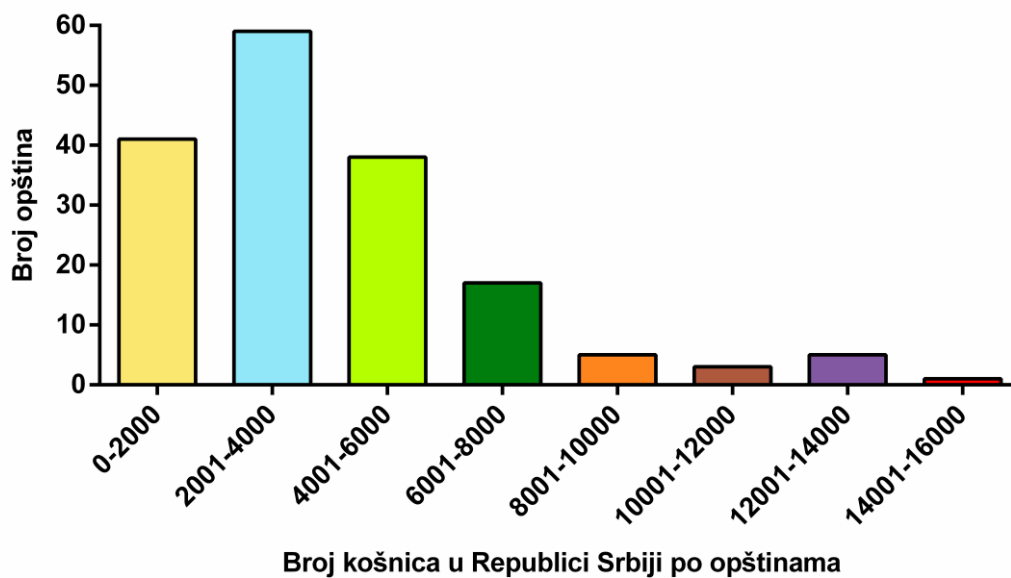
Tabela 15. *Cost-Benefit* analiza programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima (sve vrednosti su prikazane u dinarima)

Godine	Diskontni faktor	Model A		Model B													
		Troškovi	Dobit	Troškovi	Dobit												
1	0,97	817584,88	1552030,80	827293,62	1621933,71												
2	0,94	793772,67	1582167,32	803198,63	1650034,22												
3	0,92	770653,99	1612065,40	779805,41	1677955,59												
4	0,89	748208,65	1718424,73	757093,52	1782395,79												
5	0,86	726417,03	1893786,75	735043,11	1955894,58												
Ukupno		3856637,22	8358474,99	3902434,29	8688213,90												
<table border="1" style="margin: auto;"> <tr> <td>Kamatna stopa %</td> <td>3</td> </tr> </table>						Kamatna stopa %	3										
Kamatna stopa %	3																
<table border="1" style="margin: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>Model A</th> <th>Model B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NSV</td> <td>4501837,77</td> <td>4785779,61</td> </tr> <tr> <td>CBR</td> <td>2,17</td> <td>2,23</td> </tr> <tr> <td>ISP</td> <td>42,80</td> <td>42,80</td> </tr> </tbody> </table>							Model A	Model B	NSV	4501837,77	4785779,61	CBR	2,17	2,23	ISP	42,80	42,80
	Model A	Model B															
NSV	4501837,77	4785779,61															
CBR	2,17	2,23															
ISP	42,80	42,80															

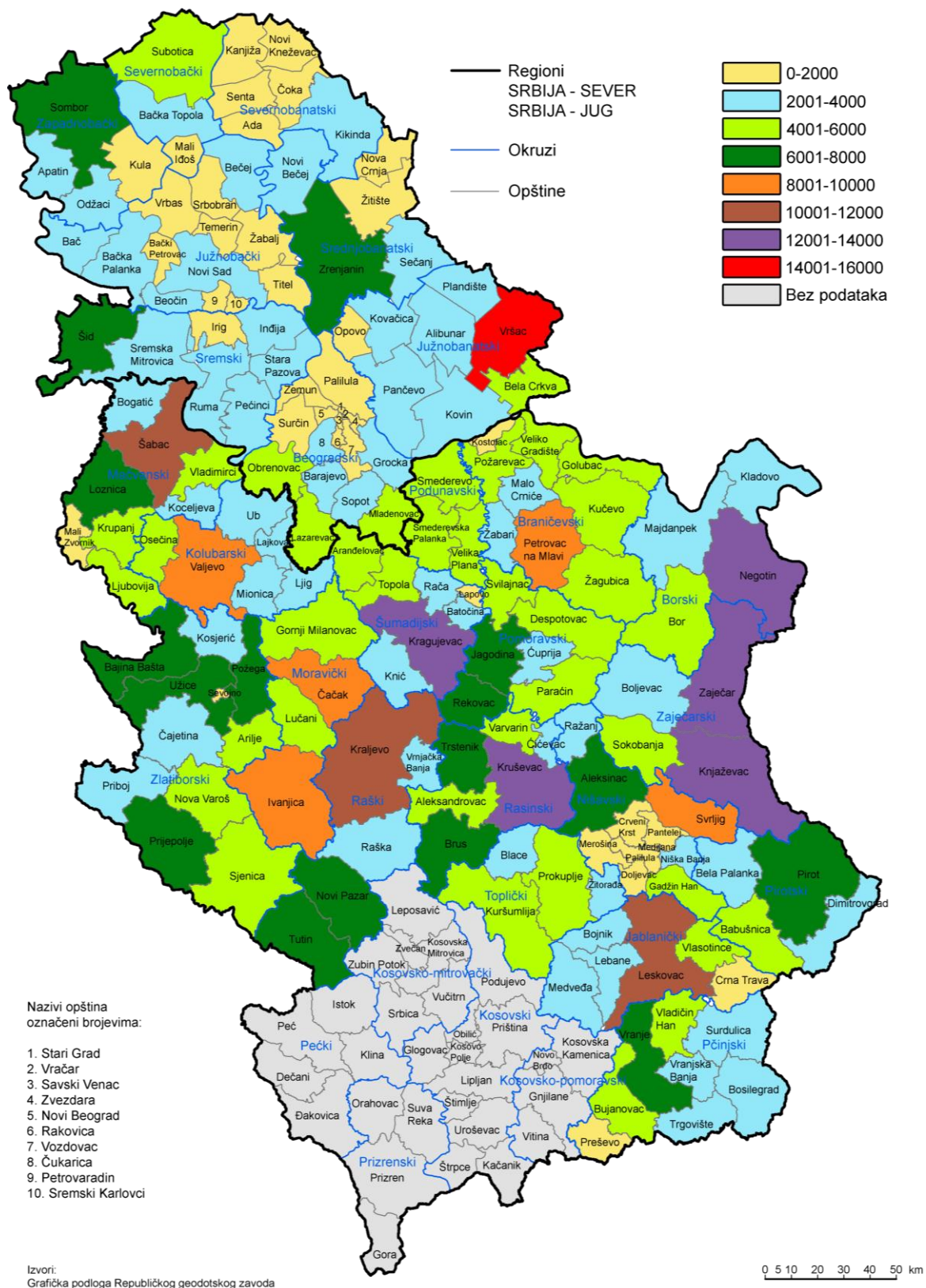
5.3.6. Zastupljenost košnica u Republici Srbiji

5.3.6.1. Broj košnica u Republici Srbiji po opštinama

Posmatrajući broj košnica po opštinama u Republici Srbiji može se videti da najveći broj opština, njih 59, odnosno 34,91% od ukupnog broja opština ima broj košnica u rasponu od 2001 do 4000. Opštine koje imaju broj košnica u rasponu od 0 do 2000 je 41, odnosno 24,26%, 38 opština, odnosno 22,49% ima broj košnica u rasponu od 4001 do 6000, 17 opština, odnosno 10,06% ima broj košnica u rasponu od 6001-8000. Zatim sledi 5 opština, odnosno 2,96 % koje imaju broj košnica u rasponu od 8001 do 10000, 5 opština, odnosno 2,96% imaju broj košnica u rasponu od 12001 do 14000, 3 opštine, odnosno 1,78% ima broj košnica u rasponu od 10001 do 12000 i jedna opština odnosno 0,59% ima broj košnica u rasponu od 14001 do 16000. Koeficijent asimetrije analizirane distribucije je 0,80, on je pozitivan, odnosno veći je od nule ($\alpha_3 > 0$) i ispitivana distribucija ima desnu pozitivnu asimetriju (Slika 9; Grafikon 18).



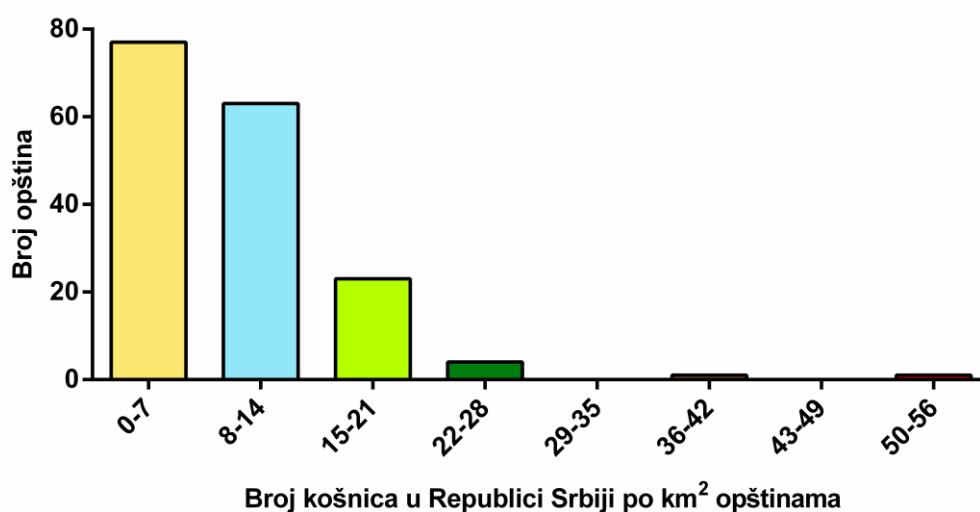
Grafikon 18. Opštine u Republici Srbiji sa različitim brojem košnica



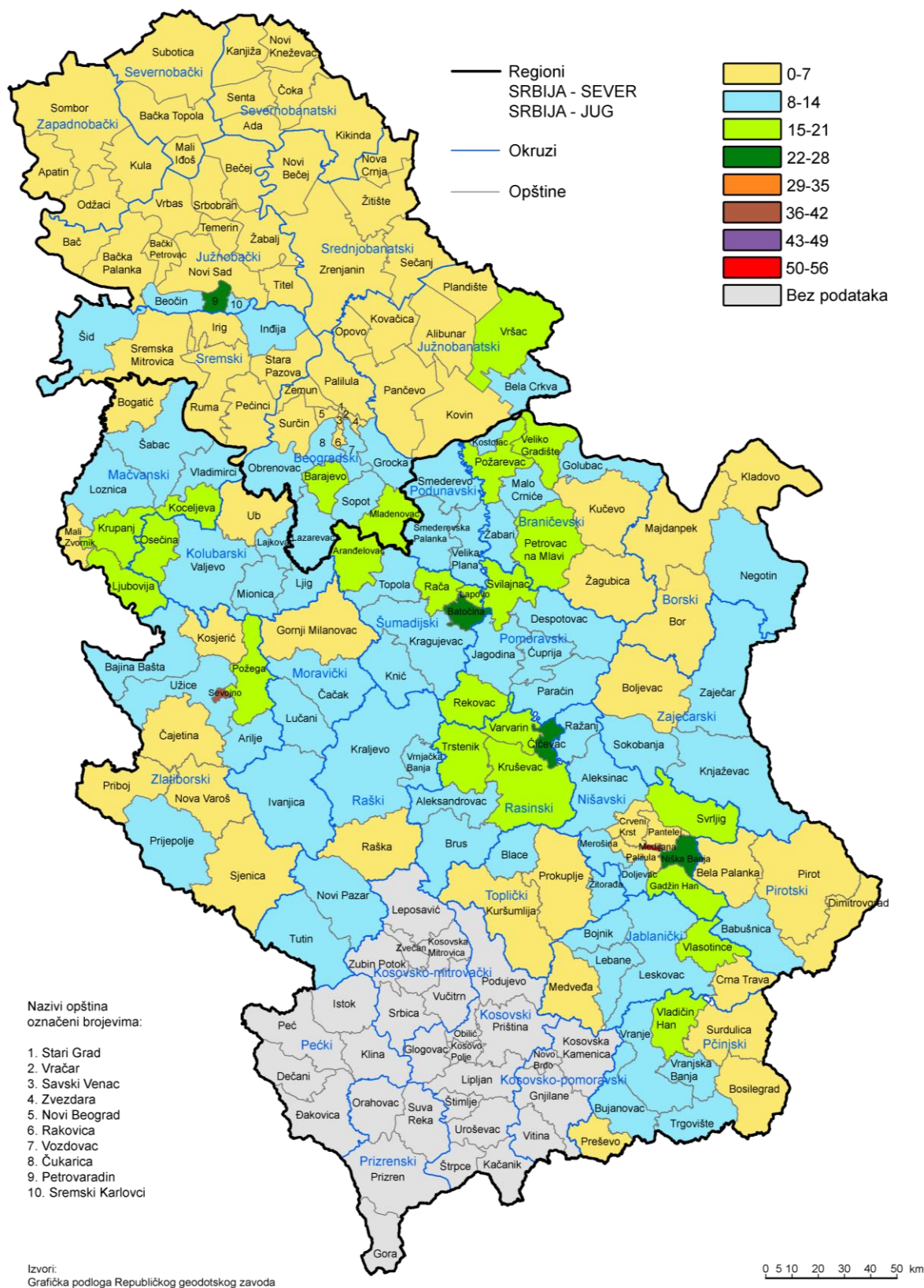
Slika 9. Kartogramski prikaz broja košnica u Republici Srbiji po opštinama

5.3.6.2. Broj košnica u Republici Srbiji po km² opštine

Posmatrajući broj košnica po km² opštine u Republici Srbiji može se videti da najveći broj opština, njih 77 odnosno 45,56% ima na km² od 0 do 7 košnica, zatim sledi 63 opštine, odnosno 37,28% koje na km² imaju od 8 do 14 košnica. Opštine koje imaju na km² od 15 do 21 košnice je 23, odnosno 13,61%, 4 opštine odnosno 2,37% imaju na km² od 22 do 28 košnica, 1 opština odnosno 0,59% ima na km² od 36 do 42 košnice i 1 opština odnosno 0,59% ima na km² od 50 do 56 košnica. U rasponu od 29 do 35 košnica kao i od 43 do 49 košnica na km² nije ustanovljena ni jedna opština. Koeficijent asimetrije analizirane distribucije je 1.29, on je pozitivan, odnosno veći je od nule ($\alpha_3 > 0$) i ispitivana distribucija ima desnu pozitivnu asimetriju (Slika 10; Grafikon 19).



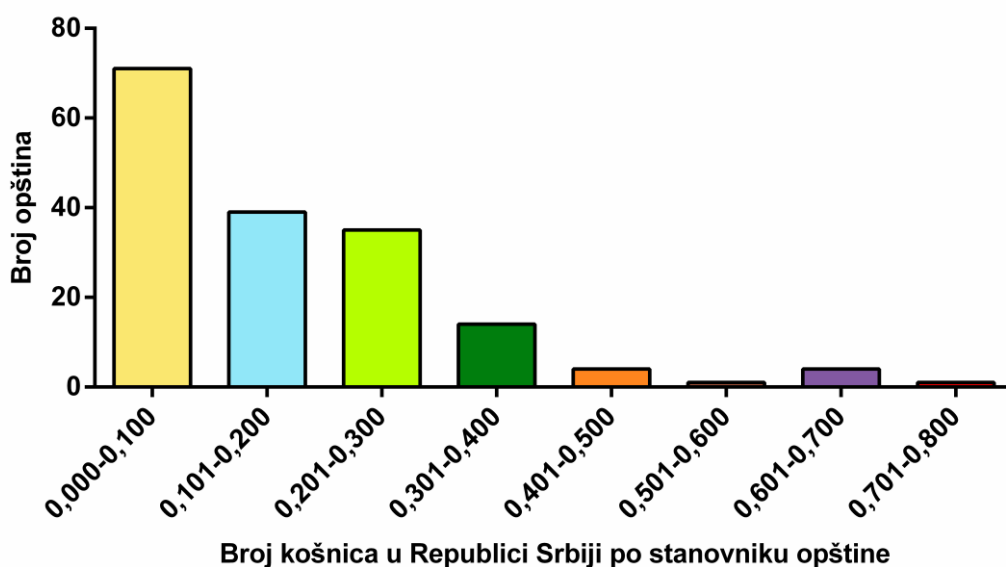
Grafikon 19. Opštine u Republici Srbiji sa različitim brojem košnica po km² opštine



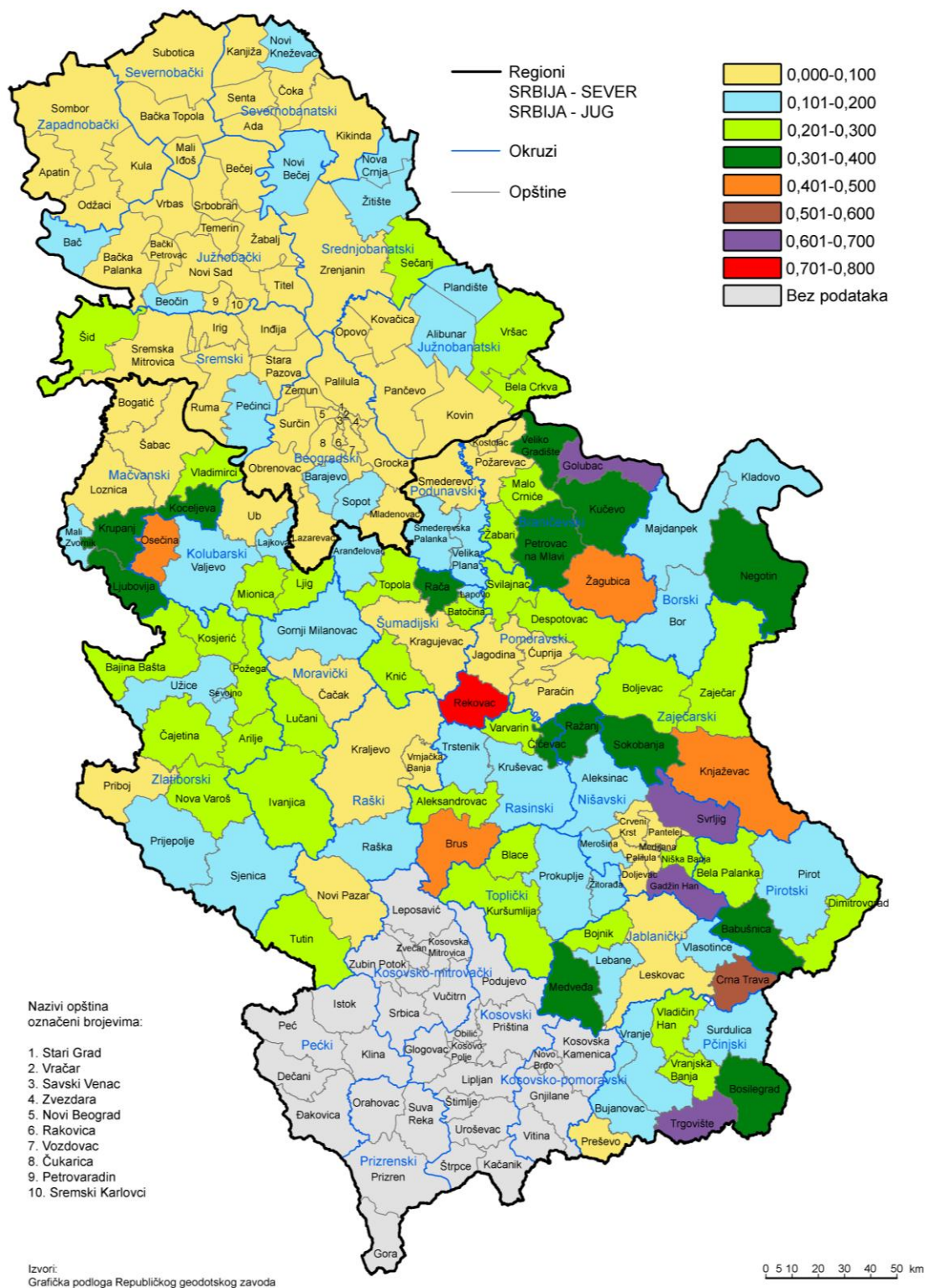
Slika 10. Kartogramski prikaz broja košnica u Republici Srbiji po km² opštine

5.3.6.3. Broj košnica u Republici Srbiji, po stanovniku u opštini

Posmatrajući broj košnica u odnosu na broj stanovnika u opštini, može se videti da najveći broj opština, njih 71, odnosno 42,01% ima u rasponu od 0 do 0,1 košnica po stanovniku opštine, 39 opština, odnosno 23,08% ima u rasponu od 0,101 do 0,2 košnice po stanovniku opštine. Opštine koje su imale raspon od 0,201 do 0,3 košnica po stanovniku opštine je 35, odnosno 20,71%, 14 opština, odnosno 8,28% ima u rasponu od 0,301 do 0,4 košnica po stanovniku opštine. Kod 4 opštine, odnosno 2,37% ima u rasponu od 0,401 do 0,5 košnica po stanovniku opštine, 4 opštine, odnosno 2,37% ima u rasponu od 0,601 do 0,7 košnica po stanovniku opštine. U rasponu od 0,501 do 0,6 košnica po stanovniku opštine ima 1 opština, odnosno 0,59% i 1 opština, odnosno 0,59% ima u rasponu od 0,701 do 0,8 košnica po stanovniku opštine. Koeficijent asimetrije analizirane distribucije je 1,26, on je pozitivan, odnosno veći je od nule ($\alpha_3 > 0$) i ispitivana distribucija ima desnu pozitivnu asimetriju (Slika 11; Grafikon 20).



Grafikon 20. Opštine u Republici Srbiji sa različitim brojem košnica po stanovniku u opštini



Slika 11. Kartogramski prikaz broja košnica u Republici Srbiji, po stanovniku u opštini

6. DISKUSIJA

Do sada nisu postojale informacije o prisustvu pčelinjih tripanozoma u Srbiji kao ni u okolnim zemljama. Uzorci pčela koji su inicijalno sakupljeni za molekularni skrining na mikrosporidije tokom devetogodisnjeg perioda (2007.-2015.) poslužili su za molekularni skrining na tripanozome. Na ovaj način smo u mogućnosti da vidimo da li je novootkrivena tripanozoma bila prisutna i ranije u odnosu na do sada poznate vrste (**Schwarz i sar., 2015a**). Ovim istraživanjem uradili smo prvi, najduži molekularni skrining (> 1 godinu) za svaku od do sada poznatih tripanozoma koje inficiraju medonosne pčele, a ujedno ovo istraživanje predstavlja i prvi dokaz prisustva *L. passima* u Srbiji.

U ispitivanom devetogodišnjem periodu *L. passim* je u srpskim pčelama bila prisutna svake godine počev od 2007. godine od umerene do visoke prevalencije (38,9-83,3%). Ova frekvencija i odsustvo *C. mellificae* u ovim uzorcima potkrepljuju postojeću hipotezu (**Schwarz i sar., 2015a, Ravoet i sar., 2015; Arismendi i sar., 2016**) da je *L. passim* uobičajeni parazit *A. mellifera* i da je sada dominantna vrsta tripanozoma kod odraslih pčela radilica. **Arismendi i sar. (2016)** su u okviru jednogodišnjeg istraživanja pronašli *L. passim* pri sličnim umerenim i visokim stopama prevalencije koja se kreće od 44% do 92% u različitim regionima Čilea. Mada oni nisu ispitali prisustvo *C. mellificae* tako da status ove vrste u Čileu ostaju nepoznat. Oni su jedini za koje znamo da imaju druge validirane prajmere specifične za *L. passim*, a koji unakrsno ne reaguju sa *C. mellificae* i mogu da nam pruže uporedive, species-specifične podatke sa istraživanjem sprovedenim na našim uzorcima. Na osnovu trenutno dostupnih podataka *L. passim* je u odnosu na *C. mellificae* dominantna tripanozoma, međutim treba imati u vidu da mali broj sprovedenih istraživanja ne garantuje pretpostavku da prethodna istraživanja na tripanozome sprovedena sa univerzalnim tripanozomnim prajmerima ili nepotvrđene metagenomične analize treba pripisati *L. passim*. **Ravoet i sar. (2015)** su nedavno analizom sekvence potvrdili prisustvo *C. mellificae* i to ne samo kod *A. mellifera* već i kod solitarnih pčela (*Osmia spp.*). Stoga, ostaje potreba da se istraži trenutni i istorijski status ove vrste u različitim geografskim oblastima i domaćinima.

Otkriće *L. passim* u uzorcima *A. mellifera* prikupljenim u Srbiji od 2007. godine ukazuje na najranije otkriće ove vrste do sada (na globalnom nivou), godinu dana ranije nego što je pre bilo poznato (**Stevanovic i sar., 2016**). Pre ove studije, najraniji potvrđeni nalaz *L. passim* predstavljale su nukleotidne sekvence GU321191.2 i GU321196.1 arhivirane u genskoj bazi (GenBank). Iako su ove sekvence, izolovane iz *A. mellifera* prikupljene u Švajcarskoj tokom 2008. godine, prvobitno pogrešno identifikovane kao *C. mellificae*, **Schwarz i sar. (2015a)** su objavili korigovanu taksonomsku identifikaciju, potvrđujući da su ove sekvence, zajedno sa svim drugim prethodno objavljenim tripanosomatidnim sekvencama iz uzoraka pčele, zapravo bile *L. passim*. Do danas, jedina molekularno potvrđena *C. mellificae* iz *A. mellifera* bila je iz Belgije, gde se inače javlja retko (**Ravoet i sar., 2015**). Iako istorija pčelinjih tripanozoma možda neće nikada biti u potpunosti razotkrivena, rezultati ovog istraživanja svakako poboljšavaju istorijsko razumevanje ove vrste i daju dodatne informacije koje ukazuju da nema dokaza da u Srbiji u periodu od 2007. i 2015. godine *L. passim* pojavljivala zajedno sa *C. mellificae*. Drugi istraživači koji imaju pristup arhivskim uzorcima pčela (tkiva ili prečišćene nukleinske kiseline) podstaknuti su da prate pristup koji je ovde prikazan kako bi se objasnila pojava *L. passim* i istorija dinamike parazitizma tripanozoma kod pčela.

Infekcija pčela jednim parazitom može uticati na njihovu podložnost ka infekciji sa drugim parazitom, bilo povećanjem ili smanjenjem osetljivosti na ko-infekciju domaćina (opisano u **Evans i Schwarz (2011)** i **Schwarz i sar. (2015b)**). Na osnovu devetogodišnjeg perioda istraživanja utvđena je visoka stopa (60,5%) ko-infekcije medonosne pčele sa *L. passim* i *N. ceranae* (**Stevanovic i sar., 2016**). Na osnovu Fisher exact testa nije utvrđena statistički značajna razlika u stepenu infekcije pčelinjih društava sa ova dva parazira. Izostanak statistički značajne razlike najverovatnije je posledica visokog broja infekcije pčelinjih društava sa *N. ceranae* u ovom regionu i retkost društava koja nisu inficirane sa *N. ceranae* i *L. passim* (2,5%). Testiranje odnosa između ove dve vrste u budućim istraživanjima iz područja gdje je *N. ceranae* manje prisutna poboljšaće statističku moć testa i mogla bi dati važan uvid u njihovu međuspecijsku dinamiku infekcije. Retkost društava koja su inficirana samo sa *L. passim*, a da su bez *N. ceranae* sugerise da je malo verovatno da je *L. passim* smanjila podložnost pčela na infekciju sa *N. ceranae*. Međusobna dinamika između ovih

zajedničkih parazita pčela ostaje nepoznata, njihovi kombinovani efekti na domaćina mogli bi biti sinergistički. **Ravoet i sar. (2013)** su otkrili da su društva medonosne pčele koje su uginula u toku prezimljevanja bile inficirane sa *N. ceranae* i tripanozomama (negativna sinergija). Fiziološki uticaji interakcije ovih vrsta identifikovani su putem izmene imunološkog odgovora pčela (**Schwarz i Evans, 2013**). Ovo zajedno sa zastupljenošću tripanozoma i mikrosporidijalnih parazita u Srbiji kao i u društvima medonosne pčela iz SAD (npr. **VanEngelsdorp i sar., 2009a; Runckel i sar., 2011; Cornman i sar., 2012**), Japana (**Morimoto i sar., 2013**), Kine (**Yang i sar., 2013**) i Turske (**Tozkar i sar., 2015**) sugerise da je potrebno dodatno istraživanje kako bi se razumela dinamika između ovih parazita i domaćina. Pored toga, u budućim istraživanjima tripanozoma i analizi njihovog uticaja na domaćine treba uzeti u obzir i različite podvrste medonosne pčele.

Na osnovu dva opisana soja, jednog za *L. passim* i drugog za *C. mellifica*e odabran je *citohrom b* gen za dizajn cpecijes-specifičnog prajmera, jer je poznato da ima 11-12% interspecijske varijabilnosti, ali je ipak veoma konzervisan unutar vrste (<1% intraspecijske varijacije) (**Schwarz i sar., 2015a**). Ovi prajmeri su pažljivo dizajnirani i optimizovani za upotrebu u tradicionalnom PCR, kao što je prikazano ovde, ili u *real-time* PCR ukoliko je veličina amplikona ispod 250 baznih parova (**Stevanovic i sar., 2016**). **Ravoet i sar. (2015)** imaju drugačiji pristup molekularnoj detekciji tripanozoma, u njihovom istraživanju oni koriste jedan par prajmera koji je komplementaran sa regionima unutar *internal transcribed spacer region-1* (ITS-1), a koji daje amplifikone različite dužine. Ovaj pristup neselektivno umnožava pčelinje tripanozome (tj. *L. passim*, *C. mellifica*e, *C. bombi*, *Crithidia ekpoeki*) i oslanja se na species-specifične polimorfizme (fragment length polymorphisms). ITS region *L. passim* i *C. mellifica*e je visoko varijabilan, sa prijavljenom 33,5-35,3% interspecijske varijabilnosti i do 2% intraspecijske varijabilnosti (**Schwarz i sar., 2015a**). Primenom ovih prajmera nakon amplifikacije nije moguće gel elektroforezom jasno razlikovati vrste *C. mellifica*e i *L. passim*, jer su njihovi amplikoni približno iste veličine (~140 bp) (**Stevanovic i sar., 2016**). Osim toga, u uslovima mešovite infekcije navedeni prajmeri ne mogu omogućiti jasan rezultat zbog velike mogućnosti preklapanja amplikona ove dve vrste, kao i zbog preferencijalne amplifikacije one vrste koja je više zastupljena u uzorku ili one vrste koja ima manje polimorfizama zbog čega se prajmeri bolje podudaraju. Pored toga,

visoka varijabilnost ovog lokusa zahteva dodatnu oprez, jer i druge vrste (npr. *C. bombi*, *C. ekpoeki*), kao i potencijalno novi sojevi mogu dovesti do preklapanja fragmenta što specijes-specifičnu detekciju čini nepouzdanom bez potvrde sekvence.

Prajmeri za PCR specifičnu detekciju *C. mellificae* prikazani u ovom doktoratu su prvi od svoje vrste dok su PCR dijagnostički prajmeri za specifičnu detekciju *L. passim* prijavili **Arismendi i sar. (2016)**. Ovi prajmeri ciljaju različite lokuse, SSU rRNK (459 bp) i gGAPDH (402 bp). Iako ovi prajmeri nisu testirani u uslovima mešanih infekcija, oni nisu unakrsno reagovali sa čistom DNK *C. mellificae* niti sa *C. bombi*. Nismo koristili ove prajmere jer smo već razvili i sakupili podatke sa našim. Svi ovi prajmeri će ipak biti korisni za empirijsko i tačno utvrđivanje tripanozoma kod pčela. Ovo je veoma važno jer, kao što je ranije rečeno (**Schwarz i sar., 2015a**, **Arismendi i sar., 2016**), mnoge sekvence u javnim bazama podataka (npr. GenBank) su pogrešno identifikovane i nastavljaju nenamerno da dovode do pogrešnih rezultata o vrstama tripanosomatida (**Cersini i sar., 2015**), što dalje dovodi do nerazumevanja nastanka i distribucije ovih mikroorganizama.

Real-time PCR koji je razvijen omogućava detekciju i kvantifikaciju *L. passim* u jednoj reakciji (**Vejnovic i sar., 2018**). Primenom novorazvijene metode omogućeno je precizno praćenje dinamike infekcije sa *L. passim* kao i procene kvantitativnog odnosa između ove tripanozome i drugih patogena koji se istovremeno mogu pronaci kod medonosne pčele. Specifični prajmeri za *L. passim* korišćeni u reakciji za *real-time* PCR omogućavaju dobijanje kvalitativnih i kvantitativnih rezultata lakše, brže i jeftinije nego druge metode (**Ravoet i sar., 2015**; **Tritschler i sar., 2017**) kod kojih je potrebna naknadna analiza PCR produkta sekvencioniranjem. Ovi specijes-specifični *real-time* PCR prajmeri takođe obezbeđuju preciznu kvantifikaciju *L. passim* posebno zato što ni jedna druga vrsta koja se nalazi kod pčela neće biti amplifikovana (**Vejnovic i sar., 2018**).

Metoda koja je ovde razvijena utvrdila je da su sve košnice iz *L. passim* + društava tokom celog ispitivanog perioda bile pozitivne na *L. passim*, dok kod *L. passim* – društava u istom periodu nije detektovano prisustvo DNK *L. passim*. *N. ceranae* u ispitivanom periodu je bila prisutna u svim košnicama i kod *L. passim* + društava i kod *L. passim* – društava. Posmatrajući parazite *N. ceranae* i *L. passim* kod *L. passim* + društava, ustanovljena je pozitivna korelacija između nivoa infekcije ovim

parazitima što je u skladu sa nalazima **Tritschlera i sar. (2017)**. Međutim, naš nalaz o konstantno većem broju *N. ceranae* nego *L. passim* kod *L. passim* + društava je u suprotnosti sa podacima iz Švajcarske (**Tritschler i sar., 2017**). Ovo se može objasniti različitim metodološkim pristupima: naši rezultati su dobijeni analizom pulovanih uzoraka pčela, dok su **Tritschler i sar. (2017)** analizirao pojedinačne radilice. Osim toga, treba uzeti u obzir i razlike u klimatskim uslovima između Srbije i Švajcarske, kao i prijavljenu prevalenciju *Nosema* spp. u ovim zemljama. U Srbiji je čak 95,7% pčelinjih društava inficirano sa *Nosema* spp. (**Stevanović i sar., 2016**), dok je u Švajcarskoj infekcija zabeležena u 46,7% društava (**Retschnig i sar., 2017**). Nedavni dokazi ukazuju na dominaciju iste vrste *Nosema* u Srbiji (**Stevanovic i sar., 2011, 2013, 2016**) i Švajcarskim pčelama (**Dainat i sar., 2012; Retschnig i sar., 2017**). Generalno gledano, veća prevalenca *N. ceranae* u odnosu na *N. apis* može biti posledica veće efikasnosti alternativnih tretmana u kontroli *N. apis* (**Michalczyk i sar., 2016**). Međutim, *N. ceranae* je osetljivija na niskim temperaturama (**Fries, 2010; Gisder i sar., 2010**), zbog čega se očekuje da bude bolje prilagođen klimi u Srbiji nego u Švajcarskoj. Štaviše, dvostruko veća prevalencija *N. ceranae* u srpskim pčelama može biti posledica pčelarske prakse, odnosno kupovina matica i paketnih rojeva od lokalnih uzgajivača matica koji nemaju potvrdu o zdravstvenom uverenju. Ova praksa, zajedno sa selećim pčelarenjem, može doprineti brzom ekspanziji *N. ceranae* i *L. passim*, što je već dokazano za *N. ceranae* (**Traynor i sar., 2016**). Iako genetička raznovrsnost doprinosi smanjenju prevalencije parazita i patogena među članovima pčelinjskih društava (**Liersch i Schmid-Hempel, 1998; Tarpy, 2003**), visok genetski diverzitet afirmisan za srpske pčele (**Muñoz i sar., 2012**) očigledno nije mogao nadomestiti nepovoljne faktore i smanjiti prevalenciju *N. ceranae*. Učestalost *L. passim* u srpskim pčelama je takođe bila velika i iznosila je u devetogodišnjem periodu (2007-2015) u proseku 62,3% (**Stevanovic i sar., 2016**). Ovi podaci i nalaz značajne pozitivne korelacije između nivoa infekcije *N. ceranae* i *L. passim* dovode nas do hipoteze da *L. passim* u srpskim pčelama prati "sudbinu" *N. ceranae* kada je u pitanju dinamika incidencije (njihova godišnja dinamika je slična), verovatno zato što oba parazita kolonizuju digestivni sistem pčele kao domaćina. Takođe je moguće da na oba parazita utiču svi mikro i makroekološki faktori (ishrana, mikroklima, godišnje doba, pčelarska praksa). Međutim, dok *N. ceranae* inficira epitelne ćelije srednjeg creva (**Fries, 2010**), *L. passim*

po mogućnosti kolonizuje crevni epitel zadnjeg creva (**Schwarz i sar., 2015a**), samim tim ne postoji razlog za njihovu kompeticiju, tako da u njihovoj dinamici infekcije nema nikakve prepreke za međusobno pozitivnu korelaciju. S obzirom na nedostatak adekvatnih epidemioloških podataka o istovremenim infekcijama pčela sa ova dva parazita u drugim zemljama, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se potvrdila ova hipoteza.

Na osnovu značajnih razlika u nivoima infekcije između određenih meseci, može se zaključiti da je u ovom istraživanju utvrđena sezonalnost kod *N. ceranae*, slična onima koji su prethodno primećeni u Srbiji (**Stevanovic i sar., 2013; Vejnovic i sar., 2018**) i severoistočnoj Nemačkoj (**Gisder i sar., 2017**). Slična sezonalnost je primećena i kod *L. passim*. Varijabilnost nivoa infekcije je mnogo veća u slučaju *L. passim* u poređenju sa *N. ceranae* to je verovatno posledica razlike u biologiji paraziti i osetljivosti domaćina. Varijabilnost *L. passim* u pčelinjim društvima već je pripisana razlikama u genetičkom poreklu domaćina i mikrobiomskom sastavu (**Schwarz i sar., 2016**).

Ovo istraživanje je otkrilo negativnu korelaciju između opterećenja sa *N. ceranae* i *L. passim* i prosečne spoljašnje temperature. Visoki pikovi *N. ceranae* i *L. passim* bili su zabeleženi u svim hladnim mesecima, pa se može zaključiti da je zima idealan period za razvoj oba parazita (**Vejnovic i sar., 2018**). Najniži nivo infekcije oba parazita zabeleženi su u julu, kada su prosečne mesečne temperature bile najviše. Na osnovu ovoga se može steći utisak da visoke letnje temperature negativno utiču na *N. ceranae* i *L. passim*. Međutim, istina je da je opterećenje parazita najniže u letnjem periodu zbog fluktuacije gustine populacije pčela (**Vejnovic i sar., 2018**). Zapravo, najveće smanjenje opterećenja parazita u leto kod pčela je posledica intenzivnog povećanja broja novoizleženih pčela (**Higes i sar., 2010, 2013**). Podaci o nivou infekcije sa *N. ceranae* su u saglasnosti sa onima dobijenim na Tajvanu, gdje je u letnjim mesecima zabeležen manji broj spora po pčeli (**Chen i sar., 2012**). Najveći pad infekcije *N. ceranae* u ovom istraživanju zabeležen je u leto, takođe je u saglasnosti sa ranijim nalazima (**Stevanovic i sar., 2013**) gde je najmanji procenat inficiranih društava sa *N. ceranae* zabeležen u ovom periodu godine. Štaviše, visoki nivoi infekcije sa *N. ceranae* i *L. passim* neposredno pre i posle zazimljavanja mogu se objasniti činjenicom

da se zimske pčele nalaze u fazi biološkog i ekološkog mirovanja (Higes i sar., 2010, 2013).

U analiziranim društvima nisu pronađeni ni *C. mellifica* ni *N. apis*. Ovi nalazi su u skladu sa prethodno objavljenim istraživanjima koja nisu otkrila zamenu *N. apis* sa *N. ceranae* (Stevanovic i sar., 2011, 2013, 2016; Martín-Hernández i sar., 2012; Forsgren i Fries, 2013; Gisder i sar., 2017). Što se tiče tripanozoma, na osnovu rezultata sadašnjeg i našeg prethodnog rada (Stevanovic i sar., 2016), odsustvo detekcije populacije *C. mellifica* u pčelinjim društvima širom Srbije od 2007. godine ne može da odgovori na pitanje da li je sveprisutnija *L. passim* udruženo delovala sa populacijom *C. mellifica* na ovom prostoru.

Kako bi se procenio uticaj *L. passim* na parametre jačine (OL, ZL, BP, RM i RP) i proizvodnje pčelinjih društava (količina izvrcanog meda), formirane su dve grupe košnica na različitim lokalitetima. Jedna grupa košnica je tokom celokupnog ispitujućeg perioda bila pozitivna na *L. passim* (*L. passim* + društva) i druga grupa kod koje nije ustanovljeno prisustvo DNK *L. passim* (*L. passim* - društva). I kod jedne i kod druge grupe, tokom ispitujućeg perioda konstantno je bila prisutna infekcija sa *N. ceranae*. Pošto nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) u broju spora na mesečnom nivou, kao ni u celokupno ispitivanom periodu ($p > 0,05$), celokupan efekat razlike između ove dve grupe pripisan je uticaju *L. passim*.

Posmatrajući površinu otvorenog legla (cm^2) u martu je ustanovljena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između *L. passim* + društava ($1958,00 \pm 297,39$) i *L. passim* - društava ($2310,00 \pm 416,92$). *L. passim* - društva ($3756,50 \pm 369,01$) su u junu imala statistički značajno veću ($p < 0,05$) površinu otvorenog legla u odnosu na *L. passim* + društva ($3418,50 \pm 341,26$). U oba meseca, *L. passim* - društva su imala veću površinu otvorenog legla (cm^2). Razlog smanjenja broja otvorenog legla kod *L. passim* + društava se može objasniti ili sa smanjenim polaganjem jaja od strane matice, ili sa kašnjenjem razvoja društva, ili su u pitanju oba faktora. Posmatrajući intenzitet infekcije samo kod *L. passim* + društava, može se videti da je najveći intenzitet infekcije u zimskim mesecima. Moguće je da je *L. passim* sama ili u sinergiji sa *N. ceranae* dovela do smanjene sposobnosti matice za polaganjem jaja i prolongiranja prolećnog razvoja društva. Sve je to za posledicu imalo i zaostajanje *L. passim* + društava u površini otvorenog legla u junu. U septembru nije ustanovljena statistički značajna razlika

($p > 0,05$) između *L. passim* + društva ($37,80 \pm 10,91$) i *L. passim* – društva ($32,30 \pm 5,52$). Razlog ovakvog stanja se može objasniti činjenicom da se broj otvorenog legla u tom periodu drastično smanjuje, kako bi se društvo pripremio za period zimskog mirovanja. Međutim taj period kod *L. passim* + društava je verovatno prolongiran, što za posledicu ima neznatno veću površinu otvorenog legla u odnosu na *L. passim* – društva.

Kod površine zatvorenog legla (cm^2), između *L. passim* + društava i *L. passim* – društava može se ustanoviti statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u dva posmatrana perioda, u martu i u junu, dok u septembru to nije slučaj. *L. passim* – društva su i u martu ($2162,50 \pm 285,21$) i u junu ($6224,00 \pm 415,62$) imala statistički značajno ($p < 0,05$) veću površinu (cm^2) zatvorenog legla u odnosu na mart ($1764,00 \pm 360,25$), odnosno jun ($5774,00 \pm 356,96$) kod *L. passim* + društava. Ovo se može objasniti manjom količinom otvorenog legla, jer je ustanovljena statistički značajna razlika između ove dve grupe u istim mesecima posmatranja. Sve ovo ide u prilog de je kod *L. passim* + društava prolongiran prolećni razvoj (mart), što se opet odražava i na jun. U septembru nije ustanovljena statistički značajna razlika između ove dve posmatrane grupe, a to je najverovatnije posledica smanjenja površine zatvorenog legla zbog pripreme društva za period mirovanja.

L. passim + društva ($13561,00 \pm 767,56$) u martu su imala statistički vrlo značajno manji ($p < 0,01$) broj pčela u društvu u odnosu na isti period kod *L. passim* – društva ($14720,00 \pm 872,80$). Broj pčela u junu je bio statistički značajno veći kod *L. passim* – društava ($38639,30 \pm 654,70$) u odnosu na *L. passim* + društava ($37232,30 \pm 1425,17$). U septembru nije ustanovljena statistički značajna ($p > 0,05$) razlika između *L. passim* + ($18518,00 \pm 678,60$) i *L. passim* – društva ($19007,80 \pm 335,93$). Navedeni rezultati ukazuju da je *L. passim* + grupa imala prolongiran period prolećnog razvoja.

Površina saća sa medom (cm^2) između *L. passim* + društava ($11542,50 \pm 857,44$) i *L. passim* – društava ($12365,00 \pm 712,14$) se statsitički značajno ($p < 0,05$) razlikovala u junu, dok u druga dva perioda nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Razlog veće površine saća sa medom (cm^2) može biti u većem broju pčela izletnica kod *L. passim* – društava.

Analizirajući površinu saća sa pergom (cm^2) između *L. passim* + društava i *L. passim* – društava u tri posmatrana perioda nije ustanovljena statistički značajna razlika

($p > 0,05$). Može se primetiti veća površina saća sa pergom u martu i junu kod *L. passim* – društava, koja nije bila statistički značajna ($p > 0,05$). Razlog za ovo se možda može naći u površini otvorenog legla (cm^2). *L. passim* – društava imaju statistički značajno veću ($p < 0,05$) površina otvorenog legla u martu i junu u odnosu na *L. passim* + društva, a samim tim i veću potrebu za pergom. Posmatrajući septembar, nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) između ove dve grupe, jer u ovom periodu društva imaju jako male potrebe za pergom, odnosno, imaju malo otvorenog legla.

Količina meda (kg) se statistički značajno razlikovala ($p < 0,05$) između *L. passim* – društva ($14,13 \pm 1,29$) i *L. passim* + društva ($12,44 \pm 2,19$). Imajući u vidu i da se broj pčela u martu ($p < 0,01$) i junu ($p < 0,05$) značajno razlikovao između ove dve grupe, može se zaključiti da je povećana proizvodnja meda kod *L. passim* – grupe posledica većeg broja izletnica. Kod bumbara koji su inficirani sa tripanozomom *C. bombi* produženo je vreme koje je potrebno kako bi inficirani bumbari pristupili cvetnom nektaru (Brown i sar., 2003; Yourth i Schmid Hempel, 2006; Gomez-Moracho i sar., 2017). Možda je ovo slučaj i kod pčela izletnica, ali su dodatna istraživanja potrebna.

Superoksid dismutaza i katalaza predstavljaju osnovnu odbranu od ROS. Aktivnost ovih enzima ukazuje na nivo superoksid anjon radikala i vodonik peroksida u organizmu tj. o potrebi za njihovim uklanjanjem (Kojić i sar., 2009; Grubor-Lajšić i sar., 2013).

Superoksid dismutaze (SOD) katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala pri čemu nastaje H_2O_2 koji je supstrat za CAT. *L. passim* + društva (medijana=13,56; interkvartilni opseg=11,82-17,40) su imala statistički značajno ($p < 0,05$) manju vrednost SOD u junuskom uzorkovanju u odnosu na *L. passim* – društva (medijana=18,55; interkvartilni opseg=15,62-22,84). U septembarskom uzorkovanju *L. passim* + društava (medijana=11,83; interkvartilni opseg=9,63-13,06) su imala statistički značajno manju ($p < 0,05$) aktivnost SOD u odnosu na *L. passim* - društva (medijana=15,68; interkvartilni opseg=11,99-19,43). Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) je ustanovljena između janskog (medijana=13,56; interkvartilni opseg=11,82-17,40) i septembarskog (medijana=11,83; interkvartilni opseg=9,63-13,06) uzorkovanja kod *L. passim* + društava. Dok kod *L. passim* – društava između janskog (medijana=18,55; interkvartilni

opseg=15,62-22,84) i septembarskog (medijana=15,68; interkvartilni opseg=11,99-19,43) uzorkovanja nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p>0,05$).

Superoxid dismutaze (SOD) i katalaza (CAT) su funkcionalno povezani, kao što se videlo iz prethodnog dela, SOD katalizuje dismutaciju superoksid anjon radikala pri čemu nastaje H_2O_2 koji je supstrat za CAT, a koja razlaže H_2O_2 na molekul kiseonika i vodu. *L. passim* – društva ($73,67\pm 12,82$) u junu su imala statistički vrlo značajno ($p<0,01$) manju aktivnost CAT u odnosu na isti period uzorkovanja kod *L. passim* + društava ($89,18\pm 10,05$). U septembarskom uzorkovanju nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p>0,05$) između *L. passim* + društava ($79,42\pm 6,63$) i *L. passim* – društava ($77,26\pm 13,34$). Posmatrajući svaku grupu pojedinačno po uzorkovanju, ustanovljena je statistički značajna razlika ($p<0,05$) između juna ($89,18\pm 10,05$) i septembra ($79,42\pm 6,63$) kod *L. passim* + društava. Kod *L. passim* – društava nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p>0,05$) između dva uzorkovanja. U našem radu prvi put je analiziran uticaj *L. passim* na parametre oksidativnog stresa kod pčela. Rezultati su pokazali da u toku aktivne sezone (u junu) dolazi do značajnog ($p<0,05$) smanjenja aktivnosti SOD i značajnog ($p<0,05$) povećanja aktivnosti CAT kod društava koja su inficirana sa *L. passim*. Značajno veće smanjenje aktivnosti SOD kod društava gde je prisutna *L. passim* može se objasniti mogućom inaktivacijom SOD od strane njenog proizvoda, vodonik peroksida (Nikolic-Kokic i sar., 2010), čija se koncentracija može povećati usled dismutacije superoksidnog anjon radikala. Analizirajući antioksidativne enzime (SOD, CAT i askorbat peroksidazu) aktivne (letnje) i umereno aktivne (jesenje) sezone kod pčela, Korayem i sar. (2012) su utvrdili da su povećani nivoi antioksidativnih enzima pčela u pozitivnoj korelaciji sa intenzivnim aktivnostima pčela u toku letnje sezone.

Glutation S-transferaze (GST) predstavljaju familiju multifunkcionalnih enzima koji imaju ključnu ulogu u eliminaciji ksenobiotika i antioksidativnoj zaštiti u organizmu. Povećana aktivnost GST se smatra konzervisanim ćelijskim odgovorom na oksidativni stres (Hayes i sar., 2005). *L. passim* + društva ($56,87\pm 13,87$) u junu su imala statistički značajno veću ($p<0,05$) aktivnost GST u odnosu na isto uzorkovanje kod *L. passim* – društava ($41,66\pm 11,26$). U septembarskom uzorkovanju aktivnost GST je bila povećana kod *L. passim* + društava ($63,34\pm 12,77$), ali između nje i *L. passim* – društava ($53,66\pm 13,32$) nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p>0,05$).

Posmatrajući svaku grupu pojedinačno u dva uzorkovanja, nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) ni u jednoj grupi. Povećanu aktivnost GST u junu kod *L. passim* + društava je posledica oksidativnog stresa i veće produkcije nepoželjnih produkata oksidativnog metabolizma koje ovaj enzim uklanja. **Dussaubat i sar. (2012)** su u svom istraživanju ispitivali uticaj infekcije pčela sa *N. ceranae* na parametre oksidativnog stresa (SOD, CAT, GST), od svih navedenih parametara jedino je aktivnost GST bila značajno veća kod inficiranih pčela. Naši podaci upućuju da je *L. passim* u periodu intenzivne aktivnosti pčela (jun) dovela do značajnog povećanja aktivnosti GST.

Jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina je malondialdehid (MDA) koji se često koristi kao biomarker oksidativnog stresa (**Del Rio i sar., 2005**). *L. passim* + društva (medijana=0,82; interkvartilni opseg=0,59-0,87) su u junskom uzorkovanju imala statistički značajno veću ($p < 0,05$) aktivnost MDA u odnosu na *L. passim* - društva (medijana=0,58; interkvartilni opseg=0,56-0,63). U septembarskom uzorkovanju *L. passim* - društva (medijana=0,63; interkvartilni opseg=0,54-0,77) su imala statistički vrlo značajno manju ($p < 0,001$) aktivnost MDA u odnosu na *L. passim* + društva (medijana=1,14; interkvartilni opseg=0,89-1,75). Nije ustanovljena statistički značajna razlika ($p > 0,05$) unutar iste grupe u dva perioda uzorkovanja. Sve ovo ukazuje da u toku aktivne sezone *L. passim* poboljšava peroksidaciju masnih kiselina, što se ogleda u povećanim koncentracijama MDA i oštećenjima ćelijskih membrana koje nastaju usled povećanog stvaranja slobodnih radikala. Peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina koju izazivaju ROS, može dovesti do povećane rigidnosti ćelijske membrane, a to za posledicu može imati i njeno pucanje, što se svakako može odraziti na smanjenu živonog veka radilica. Analizirajući aktivnost SOD, CAT, GST i koncentraciju MDA između zimskih i letnjih pčela, **Orcic i sar. (2017)** su utvrdili da kod zimskih pčela dolazi do pada aktivnosti SOD, GST i koncentracije MDA, dok je aktivnost CAT povećana. Njihovi rezultati ukazuju da se kod zimskih pčela smanjuje nivo antioksidativne enzimske zaštite, što može biti posledica smanjene produkcije ROS. Poznato je da insekti koriste ROS kao odbrambeni mehanizam za borbu protiv patogena (**Nikolenko i sar., 2012**), međutim ROS ujedno predstavljaju i glavnu pokretačku snagu u starenju, izazivajući štetna makromolekularna oštećenja (**Harman, 1956, 1981**). Stoga se može zaključiti da

smanjena proizvodnja ROS kod zimskih pčela produžava životni vek pčela, ali ujedno povećava njihovu podložnost na patogene. Ovo je možda razlog zašto se najveći broj društava koja su uginula u toku zimskih meseci, a bila su pozitivna na *L. passim* dešava upravo zimi kada je infekcija sa ovom tripanozomom najintenzivnija. Da bi se ova teorija potvrdila, potrebna su dodatna istraživanja.

Pri izradi programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima neophodno je sprovesti sledeće postupke: demografska i ekonometrijska istraživanja; procenjivanje osetljivosti, procenjivanje fizičke izvodljivosti, specifikacija i kvantifikacija troškova, specifikacija i kvantifikacija dobiti, određivanje vremenskog perioda, izbor i priprema diskontne stope, određivanje kriterijuma prihvatljivosti, analize senzitivnosti, pisanje i izdavanje izveštaja (**Carpenter, 1993**).

Planirano sprovođenje programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima u trajanju od pet godina, na osnovu kalkulacija koje su urađene, ukupni troškovi kod modela A su 4.210.572,13 dinara, dok kod modela B uznose 4.260.572,13 dinara. Od ukupnih troškova kod modela A na troškove nabavke materijala i održavanje odlazi 24,99% (1.052.220,00 din.), 4,77% (200.653,05 din.) obuhvataju troškovi nabavke rojeva i matica, na prihranjivanje odlazi 9,50% (400.000,00 din.), dok na veterinarske usluge 9,17% (386.212,48 din.), 1,11% (46.910,00 din.) iznosi dezinfekcija košnica i prostora, a ukupni troškovi rada iznose 2.124.561,60 dinara, odnosno 50,46%. Od ukupnih troškova kod modela B na troškove rada odlazi 49,87% (2.124.561,60 din.), troškovi nabavke materijala i održavanja 24,70% (1.052.220,00 din), troškovi prihranjivanja 9,39% (400.000,00 din.), troškovi veterinarskih usluga 9,06% (386.212,48 din.), troškovi registracija gazdinstva i košnica 1,17% (50.000,00 din.) i troškovi dezinfekcije košnica i prostora 1,10% (46.910,00 din.).

Planirana ukupna dobit u petogodišnjem periodu kod modela A iznosi 9.168.180,46 dinara, a kod modela B iznosi 9.528.180,46 din. Od ukupne planirane dobiti kod modela A proizvodnju rojeva i matica iznosi 2.033.972,65 din. (22,19%), proizvodnja meda 3.875.141,49 din. (42,27%), 1.382.379,00 din. (15,08%) iznosi proizvodnja voska, proizvodnja polena 1.468.777,69 din. (16,02%) i proizvodnja propolisa 407.909,63 din. (4,45%). Od ukupne planirane dobiti u petogodišnjem periodu kod modela B proizvodnja meda iznosi 3.875.141,49 din. (40,67%), proizvodnja rojeva i matica 2.033.972,65 din. (21,35%), proizvodnja polena 1.468.777,69 din. (15,42%),

proizvodnja voska 1.382.379,00 din. (14,51%), proizvodnja propolisa 407.909,63 din. (4,28%) i subvencije 360.000,00 din. (3,78%).

Analizirajući dobijene rezultate ekonomske evaluacije projektovanih modela za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima pomoću *cost-benefit* analize ustanovljeno je da je NSV (Neto sadašnja vrednost) u oba ispitivana modela veća od nule. Neto sadašnja vrednost (NSV) modela A iznosi 4.501.835,77 dinara, a NSV modela B je 4.785.779,61 dinara. Na osnovu izračunatog pozitivnog odnosa dobiti i troškova u oba modela (model A 2,17 i model B 2,23) ustanovili smo da je ekonomska opravdanost oba programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima pozitivna i ekonomski opravdana jer se dobija pozitivni finansijski efekat u oba modela. Na osnovu analiza izvršenih pomoću interne stope povraćaja (ISP) utvrđeno je da je ekonomska opravdanost oba modela slična i postojana sve dok kamatna stopa na godišnjem nivou ne neprelazi 42,80%.

Posmatrajući broj košnica po opštinama u Republici Srbiji, može se videti da najveći broj opština 34,91% (n=59), ima u rasponu od 2001 do 4000 košnica. Opštine koje imaju broj košnica u rasponu od 0 do 2000 je 24,26% (n=41), 22,49% (n=38) opština ima broj košnica u rasponu od 4001 do 6000, 10,06% (n=17) opština ima broj košnica u rasponu od 6001-8000. Zatim sledi 2,96% (n=5) opština koje imaju broj košnica u rasponu od 8001 do 10000, 2,96% (n=5) opština imaju broj košnica u rasponu od 12001 do 14000, 1,78% (n=3) opština ima broj košnica u rasponu od 10001 do 12000 i 0,59% (n=1) opština ima broj košnica u rasponu od 14001 do 16000.

Rezultati broja košnica po km² opštine u Republici Srbiji ukazuju da najveći broj opština 45,56% (n=77) ima na km² od 0 do 7 košnica, zatim sledi 37,28% (n=63) opštine koje na km² imaju od 8 do 14 košnica. Opštine koje imaju na km² od 15 do 21 košnice je 13,61% (n=23), 2,37% (n=4) opština ima na km² od 22 do 28 košnica, 0,59% (n=1) opština ima na km² od 36 do 42 košnice i 0,59% (n=1) opština ima na km² od 50 do 56 košnica. U rasponu od 29 do 35 košnica kao i od 43 do 49 košnica na km² nije ustanovljena ni jedna opština.

Posmatrajući broj košnica u odnosu na broj stanovnika opštine u Republici Srbiji, može se videti da najveći broj opština 42,01% (n=71) ima u rasponu od 0 do 0,1 košnica po stanovniku opštine, 23,08% (n=39) opština ima u rasponu od 0,101 do 0,2 košnica po stanovniku opštine. Opštine koje su imale u rasponu od 0,201 do 0,3 košnica po

stanovniku opštine je 20,71% (n=35), 8,28% (n=14) opština ima u rasponu od 0,301 do 0,4 košnica po stanovniku opštine. Kod 2,37% (n=4) opština ima u rasponu od 0,401 do 0,5 košnica po stanovniku, a 2,37% (n=4) opština ima u rasponu od 0,601 do 0,7 košnica po stanovniku opštine. U rasponu od 0,501 do 0,6 košnica po stanovniku opštine ima 0,59% (n=1) opština i 0,59% (n=1) opština ima u rasponu od 0,701 do 0,8 košnica po stanovniku opštine.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz aktuelne literature, može se zaključiti sledeće:

1. Dizajnirani su i validirani prvi prajmeri i konvencionalna PCR metoda za identifikaciju vrsta *L. passim* i *C. mellifica* čime je omogućeno rutinsko ispitivanje prevalencije, kao i epizootiološko istraživanje ovih parazita pčela.
2. Retrospektivna analiza uzoraka iz devetogodišnjeg perioda (2007-2015) obavljena u ovom radu predstavlja prvo dugoročno ispitivanje prisustva obe vrste pčelinjih tripanozoma u svetu.
3. Kod pčela u Srbiji poreklom iz perioda 2007-2015 utvrđeno je prisustvo samo jedne vrste pčelinjih tripanozoma, *L. passim*, čija je godišnja zastupljenost bila u opsegu 38,9–83,3%, a prosečna zastupljenost za navedeni 9-godišnji period 62,3%.
4. Detekcijom *L. passim* u analiziranim uzorcima pčela obezbeđen je prvi nalaz ove vrste u Srbiji, a otkriće *L. passim* u uzorcima iz 2007. godine predstavlja najstariji genetički potvrđen nalaz ovog parazita na globalnom nivou.
5. Većina pčelinjih društava (60,5%) analiziranih u periodu 2007-2015 bila je ko-inficirana sa *L. passim* i *N. ceranae*, dok je zastupljenost društava inficiranih sa *L. passim* bila samo 1,9%, na osnovu čega se može zaključiti da ove dve vrste imaju različite mikroekološke niše, tako da nesmetano parazitiraju u istom domaćinu.
6. Dizajnirani su prajmeri za *real-time* PCR i obavljena optimizacija te metode koja obezbeđuje istovremenu detekciju i kvantifikaciju *L. passim*, a samim tim i detaljno praćenje *L. passim* infekcije na terenu.
7. Značajna pozitivna korelacija ($p < 0,0001$) između nivoa infekcije *L. passim* i *N. ceranae* ukazuje na sličnu godišnju dinamiku infekcije ova dva parazita.
8. Značajne razlike ($p < 0,05$) u nivoima infekcije *L. passim* i *N. ceranae* između meseci ukazuju na sezonski karakter u učestalosti oba parazita.

9. Najveće opterećenje pčela sa *N. ceranae* i *L. passim* je zabeleženo u zimskim mesecima, a najmanje tokom leta, odnosno u julu pri najvišim temperaturama.
10. Smanjenje aktivnost superoksid dismutaze (SOD) uz istovremeno povećanje aktivnosti katalaze (CAT) i glutation S-transferaze (GST), kao i koncentracije malondialdehida (MDA) tokom aktivne sezone, ukazuje da infekcija sa *L. passim* izaziva oksidativni stres, što može negativno uticati na kondiciju i produktivnost pčela a samim tim i na ekonomske efekte u pčelarstvu.
11. Ekonomska evaluacija izrađenih modela za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima, pokazala je da postoji pozitivan ekonomski efekat kod oba modela. Pozitivna neto sadašnja vrednost (NSV) modela A je 4.501.835,77 dinara, a modela B je 4.785.779,61 dinara. Parametar koji pokazuje odnos dobiti i troškova je veći od jedan ($ODT \geq 1,00$) i iznosi kod modela A=2,17, a kod modela B=2,23. Na osnovu vrednosti interne stope povećanja (ISP) ustanovljeno je da bi oba programa za smanjenje broja infekta u pčelinjim društvima bili ekonomski opravdani.

8. LITERATURA

1. Aebi H, 1984, Catalase in vitro, *Methods in enzymology*, 105, 121-126.
2. Agnew P, Becnel JJ, Ebert D, Michalakakis Y, 2003, Symbiosis of microsporidia and insects, *Insect Symbiosis*, 1, 145-161.
3. Aizen MA, Harder LD, 2009, The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination, *Current biology*, 19 (11), 915-918.
4. Arismendi N, Bruna A, Zapata N, Vargas M, 2016, PCR-specific detection of recently described *Lotmaria passim* (Trypanosomatidae) in Chilean apiaries, *Journal of invertebrate pathology*, 134, 1-5.
5. Aslett M, Aurrecoechea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, Carrington M, Depledge DP, Fischer S, Gajria B, Gao X, Gardner MJ, 2010, TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae, *Nucleic acids research*, 38, D457-D462.
6. Bacandritsos N, Granato A, Budge G, Papanastasiou I, Roinioti E, Caldon M, Falcaro C, Gallina A, Mutinelli F, 2010, Sudden deaths and colony population decline in Greek honey bee colonies, *Journal of invertebrate pathology*, 105 (3), 335-340.
7. Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasc AC, Cazzulo JJ, Krishna S, 2003, The trypanosomiases, *The Lancet*, 362(9394), 1469-1480.
8. Berry JA, Delaplane KS, 2001, Effects of comb age on honey bee colony growth, brood survivorship, and adult mortality, *Journal of Apicultural Research*, 40 (1), 3-8.
9. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, 2012, Oxidative stress and antioxidant defense, *World Allergy Organization Journal*, 5 (1), 9-19.
10. Bommarco R, Kleijn D, Potts SG, 2013, Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security, *Trends in ecology & evolution*, 28(4), 230-238.

11. Botías C, Martín-Hernández R, Barrios L, Meana A, Higes M, 2013, *Nosema* spp. infection and its negative effects on honey bees (*Apis mellifera iberiensis*) at the colony level, *Veterinary research*, 44 (1), 25.
12. Bourgeois L, Rinderer TE, Beaman LD, Danka RG, 2010, Genetic detection and quantification of *Nosema apis* and *N. ceranae* in the honey bee, *Journal of Invertebrate Pathology*, 103 (1), 53-58.
13. Bradford MM, 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
14. Brodschneider R, Gray A, Adjlane N, Ballis A, Brusbardis V, Charrière JD, Chlebo R, Coffey MF, Dahle B, de Graaf DC, Dražić MM, Evans G, Fedoriak M, Forsythe I, Gregorc A, Grzęda U, Hetzroni A, Kauko L, Kristiansen P, Martikkala M, Martín-Hernández R, Medina-Flores CA, Mutinelli F, Raudmets A, Ryzhikov VA, Simon-Delso N, Stevanovic J, Uzunov A, Vejsnæs F, Wöhl S, Zammit-Mangion M, Danihlík J, 2018, Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey, *Journal of Apicultural Research*, 57, 452-457.
15. Brown MJ, Schmid-Hempel R, Schmid-Hempel P, 2003, Strong context-dependent virulence in a host–parasite system: reconciling genetic evidence with theory, *Journal of Animal Ecology*, 72 (6), 994-1002.
16. Buchon N, Broderick NA, Poidevin M, Pradervand S, Lemaitre B, 2009, *Drosophila* intestinal response to bacterial infection: activation of host defense and stem cell proliferation, *Cell host & microbe*, 5 (2), 200-211.
17. Buha AA, 2015, Toksični efekti produžene izloženosti kadmijumu i/ili polihlorovanim bifenilima u pacova, Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1-194.
18. Calderone NW, 2012, Insect Pollinated Crops, Insect Pollinators and US Agriculture: Trend Analysis of Aggregate Data for the Period 1992–2009, *PLoS one*, 7 (5), e37235.
19. Carpenter ET, 1993, Animal Health and Production Economics, *California, USA*.

20. Cepero A, Martín-Hernández R, Bartolomé C, Gómez-Moracho T, Barrios L, Bernal J, Teresa Martín M, Meana A, Higes M, 2015, Passive laboratory surveillance in Spain: pathogens as risk factors for honey bee colony collapse, *Journal of Apicultural Research*, 54 (5), 525-531.
21. Cepero A, Ravoet J, Gómez-Moracho T, Bernal JL, Del Nozal MJ, Bartolomé C, Maside X, Meana A, González-Porto AV, de Graaf DC, 2014, Holistic screening of collapsing honey bee colonies in Spain: a case study, *BioMed Central Research Notes*, 7 (1), 649.
22. Cersini A, Antognetti V, Conti R, Velletrani F, Formato G, 2015, First PCR isolation of *Crithidia mellificae* (Euglenozoa: Trypanosomatidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Italy, *Fragmenta entomologica*, 47 (1), 45-49.
23. Chakrabarti P, Rana S, Sarkar S, Smith B, Basu P, 2015, Pesticide-induced oxidative stress in laboratory and field populations of native honey bees along intensive agricultural landscapes in two Eastern Indian states, *Apidologie*, 46 (1), 107-129.
24. Chen Y, Chung WP, Wang CH, Solter LF, Huang WF, 2012, *Nosema ceranae* infection intensity highly correlates with temperature, *Journal of invertebrate pathology*, 111 (3), 264-267.
25. Chen Y, Evans JD, Zhou L, Boncristiani H, Kimura K, Xiao T, Litkowski A, Pettis JS, 2009, Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees, *Journal of invertebrate pathology*, 101 (3), 204-209.
26. Collins AM, Williams V, Evans JD, 2004, Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*, *Insect molecular biology*, 13 (2), 141-146.
27. Copley TR, Jabaji SH, 2012, Honeybee glands as possible infection reservoirs of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in naturally infected forager bees, *Journal of applied microbiology*, 112 (1), 15-24.
28. Cornman RS, Tarpy DR, Chen Y, Jeffreys L, Lopez D, Pettis JS, van Engelsdorp D, Evans JD, 2012, Pathogen webs in collapsing honey bee colonies, *PLoS one*, 7 (8), e43562.

29. Corona M, Hughes KA, Weaver DB, Robinson GE, 2005, Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity, *Mechanisms of ageing and development*, 126(11), 1230-1238.
30. Corona M, Robinson GE, 2006, Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation phylogeny, *Insect molecular biology*, 15 (5), 687-701.
31. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, 2007, A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder, *Science*, 318 (5848), 283-287.
32. Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P, 2012, Predictive markers of honey bee colony collapse, *PLoS one*, 7 (2), e32151.
33. DeGrandi-Hoffman G, Wardell G, Ahumada-Segura F, Rinderer T, Danka R, Pettis J, 2008, Comparisons of pollen substitute diets for honey bees: consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations, *Journal of apicultural research*, 47 (4), 265-270.
34. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N, 2005, A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress, *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 15 (4), 316-328.
35. Delaplane KS, Harbo, JR, 1987, Effect of queenlessness on worker survival, honey gain and defence behaviour in honey bees, *Journal of Apicultural Research*, 26 (1), 37-42.
36. Delaplane KS, Van Der Steen J, Guzman-Novoa E, 2013, Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. In: Dietemann V, Ellis JD, Neumann P. (Eds.), *The Coloss Beebook, Volume I: Standard methods for Apis mellifera research*, *Journal of Apicultural Research*, 52: <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.03>
37. Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi JH, Hernández RM, Botías C, Cousin M, McDonnell C, Bonnet M, Belzunces LP, Moritz RFA, Conte YL, Alaux C, 2012, Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*, *PloS one*, 7 (5), e37017.
38. Eckert CD, Winston ML, Ydenberg RC, 1994, The relationship between population size, amount of brood, and individual foraging behaviour in the honey bee, *Apis mellifera* L, *Oecologia*, 97 (2), 248-255.

38. Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, 2009, Colony collapse disorder: a descriptive study, *PloS one*, 4 (8), e6481.
39. Evans JD, Schwarz RS, 2011, Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health, *Trends in microbiology*, 19 (12), 614-620.
40. Felton GW, Summers CB, 1995, Antioxidant systems in insects, *Archives of insect biochemistry and physiology*, 29 (2), 187-197.
41. Forsgren E, Fries I, 2010, Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees, *Veterinary parasitology*, 170 (3-4), 212-217.
42. Forsgren E, Fries I, 2013, Temporal study of *Nosema* spp. in a cold climate, *Environmental Microbiology Reports*, 5 (1), 78-82.
43. Francis RM, Nielsen SL, Kryger P, 2013, Varroa-Virus Interaction in Collapsing Honey Bee Colonies, *PLoS ONE*, 8 (3), e57540.
44. Franzen C, 2005, How do microsporidia invade cells?, *Folia parasitologica*, 52 (1/2), 36-40.
45. Fries I, 2010, *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*), *Journal of invertebrate pathology*, 103, S73-S79.
46. Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek NJ, 1996, *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae), *European Journal of Protistology*, 32 (3), 356-365.
47. Fries I, Martin R, Meana A, Garcia-Palencia P, Higes, M, 2006, Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees, *Journal of Apicultural Research*, 45 (4), 230-233.
48. Gallai N, Salles J-M, Settele J, Vaissière BE, 2009, Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline, *Ecological economics*, 68 (3), 810-821.
49. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P, 2004, Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker, *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 57 (9-10), 453-455.

49. Gegeer RJ, Otterstatter MC, Thomson JD, 2005, Does parasitic infection impair the ability of bumblebees to learn flower-handling techniques?, *Animal Behaviour*, 70 (1), 209-215
50. Geiszt M, Witta J, Baffi J, Lekstrom K, Leto TL, 2003, Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense, *The FASEB journal*, 17 (11), 1502-1504.
51. Genersch E, von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Büchler R, Berg S, Ritter W, Mühlen W, Gisder S, Meixner M, Liebig G, Rosenkranz P, (2010) The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies, *Apidologie*, 41 (3), 332-352.
52. Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz M-C, Linde A, Genersch E, 2010, Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*?, *Applied and environmental microbiology*, 76 (9), 3032-3038.
53. Gisder S, Schüler V, Horschler LL, Groth D, Genersch E, 2017, Long-Term Temporal Trends of *Nosema* spp. Infection Prevalence in Northeast Germany: Continuous Spread of *Nosema ceranae*, an Emerging Pathogen of Honey Bees (*Apis mellifera*), but No General Replacement of *Nosema apis*, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 301.
54. Glavinić U, Stanković A, Stevanović J, Simeunović P, Aleksić N, Stanimirović Z, 2013, Komparacija metoda za detekciju mikrosporidija iz roda *Nosema* kod medonosne pčele (*Apis mellifera*), *Arhiv veterinarske medicine*, 6 (1), 19-27.
55. Gomez-Moracho T, Heeb P, Lihoreau M, 2017, Effects of parasites and pathogens on bee cognition, *Ecological Entomology*, 42, 51-64.
56. Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL, 2015, Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers, *Science*, 347 (6229), 1255957.
57. Grissell E, 2010, Bees, Wasps, and Ants: The Indispensable Role of Hymenoptera in Gardens, *Timber Press*, 335.
58. Grubor-Lajšić G, Petri ET, Kojić D, Purać J, Popović ŽD, Worland MR, Clark SM, Mojović M, Blagojević DP, 2013, Hydrogen peroxide and ecdysone in the

- cryoprotective dehydration strategy of *Megaphorura arctica* (Onychiuridae: Collembola), *Archives of insect biochemistry and physiology*, 82 (2), 59-70.
59. Ha EM, Oh CT, Bae YS, Lee WJ, 2005a, A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity, *Science*, 310 (5749), 847-850.
60. Ha EM, Oh CT, Ryu JH, Bae YS, Kang SW, Jang IH, Brey PT, Lee WJ, 2005b, An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*, *Developmental cell*, 8 (1), 125-132.
61. Hafi A, Reynolds R, Oliver M, 1994, Economic Impact of Newcastle Disease on the Australian Poultry Industry, *ABARE Research Report*, 94, 7.
62. Hagib WH, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974, Glutathione S-transferases, *Journal of biological Chemistry*, 249 (22), 7130-7139.
63. Hanahan D, 1985, Techniques for transformation of *E. coli*, *DNA cloning: a practical approach*, 1, 109-135.
64. Harman D, 1956, Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *Journal of Gerontology*, 11, 298-300.
65. Harman D, 1981, The aging process, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78 (11), 7124-7128.
66. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR, 2005, Glutathione transferases, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51-88.
67. Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A, 2007, Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia), *Journal of invertebrate pathology*, 94 (3), 211-217.
68. Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, 2008, How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse, *Environmental microbiology*, 10 (10), 2659-2669.
69. Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, 2010, *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis, *Apidologie*, 41 (3), 375-392.
70. Higes M, Meana A, Bartolomé C, Botías C, Martín-Hernández R, 2013, *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen, *Environmental microbiology reports*, 5 (1), 17-29.

71. Holt HL, Grozinger CM, 2016, Approaches and challenges to managing *Nosema* (Microspora: Nosematidae) parasites in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies, *Journal of economic entomology*, 109 (4), 1487-1503.
72. Hubert J, Bicianova M, Ledvinka O, Kamler M, Lester PJ, Nesvorna M, Kopecky J, Erban T, 2017, Changes in the bacteriome of honey bees associated with the parasite *Varroa destructor*, and pathogens *Nosema* and *Lotmaria passim*, *Microbial ecology*, 73 (3), 685-698.
73. Imdorf A, Gerig L, 2001, Course in determination of colony strength, *Swiss Federal Dairy Research Institute, Liebefeld*, 106, 199-204.
74. Jarratt IS, Franco-Dixon MA, 1999, Cost-Benefit Analysis of American Foulbrood (AFB) Disease Management Options in Queensland—Preliminary Results, In Paper for the 43rd Annual Conference of the Australian Agricultural and Resource Economics Society, New Zealand.
75. Kinnula VL, Adler KB, Ackley NJ, Crapo JD, 1992, Release of reactive oxygen species by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro, *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 262 (6), L708-L712.
76. Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, 2007, Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*, *Journal of invertebrate pathology*, 96 (1), 1-10.
77. Klein AM, Brittain C, Hendrix SD, Thorp R, Williams N, Kremen C, 2012, Wild pollination services to California almond rely on semi-natural habitat, *Journal of Applied Ecology*, 49 (3), 723-732.
78. Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007, Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 274 (1608), 303-313.
79. Koch H, Schmid-Hempel P, 2011, Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (48), 19288-19292.
80. Kojić D, Spasojević I, Mojović M, Blagojević D, Worland R, Grubor-Lajšić G, Spasić MB, 2009, Potential role of hydrogen peroxide and melanin in the cold

- hardiness of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), *European Journal of Entomology*, 106 (3), 451-454.
80. Korayem AM, Khodairy MM, Abdel-Aal AA, El-Sonbaty AAM, 2012, The protective strategy of antioxidant enzymes against hydrogen peroxide in honey bee, *Apis mellifera* during two different seasons, *Journal of Biology and Earth Sciences*, 2 (2), 93-109.
81. Kozmus P, Stevanovic J, Stanimirovic Z, Stojic V, Kulisic Z, Meglic V, 2007, Analysis of mitochondrial DNA in honey bees (*Apis mellifera*) from Serbia, *Acta Veterinaria*, 57 (5-6), 465-476.
82. Krogh A, Weis-Fogh T, 1951, The respiratory exchange of the desert locust (*Schistocerca gregaria*) before, during and after flight, *Journal of Experimental Biology*, 28 (3), 344-357.
83. Langridge DF, McGhee RB, 1967, *Crithidia mellifica* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*, *The Journal of protozoology*, 14 (3), 485-487.
84. Le Conte Y, Ellis M, Ritter W, 2010, Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses?, *Apidologie*, 41 (3), 353-363.
85. Lee KV, Steinhauer N, Rennich K, Wilson ME, Tarpy DR, Caron DM, Rose R, Delaplane KS, Baylis K, Lengerich EJ, Pettis J, 2015, A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA, *Apidologie*, 46, 292-305.
86. Li W, Evans JD, Huang Q, Rodríguez-García C, Liu J, Hamilton M, Grozinger CM, Webster TC, Su S, Chen YP, 2016, Silencing the Honey Bee (*Apis mellifera*) Naked Cuticle Gene (*nkd*) Improves Host Immune Function and Reduces *Nosema ceranae* Infections, *Applied and environmental microbiology*, 82, 6779-6787.
87. Liersch S, Schmid-Hempel P, 1998, Genetic variation within social insect colonies reduces parasite load, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265 (1392), 221-225.
88. Loidl A, Crailsheim K, 2001, Free fatty acids digested from pollen and triolein in the honeybee (*Apis mellifera carnica* Pollmann) midgut, *Journal of*

- Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 171 (4), 313-319.
88. Lukeš J, Guilbride DL, Votýpka J, Ziková A, Benne R, Englund PT, 2002, Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure, *Eukaryotic Cell*, 1 (4), 495-502.
89. Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, Martínez-Salvador A, Prieto L, Meana A, Higes M, 2012, Microsporidia infecting *Apis mellifera*: Coexistence or competition. Is *Nosema ceranae* replacing *Nosema apis*?, *Environmental Microbiology*, 14 (8), 2127–2138.
90. Martín-Hernández R, Botías C, Barrios L, Martínez-Salvador A, Meana A, Mayack C, Higes M, 2011, Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*), *Parasitology research*, 109 (3), 605-612.
91. Martín-Hernández R, Meana A, Prieto L, Salvador AM, Garrido-Bailón E, Higes M, 2007, Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*, *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (20), 6331-6338.
92. Maslov DA, Votýpka J, Yurchenko V, Lukeš J, 2013, Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed, *Trends in parasitology*, 29 (1), 43-52.
93. Matheson A, Reid M, 2018, Practical Beekeeping in New Zealand: The Definitive Guide, Exisle Publishing.
94. Meana A, Martín-Hernández R, Higes M, 2010, The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees, *Journal of Apicultural Research*, 49 (2), 212-214.
95. Mehlhorn H, 2008, Encyclopedia of Parasitology: AM (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
96. Meixner MD, 2010, A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them, *Journal of invertebrate pathology*, 103, 80-95.
97. Michalczyk M, Sokół R, Koziatek S, 2016, Evaluation of the effectiveness of selected treatments of *Nosema* spp. infection by the hemocytometric method and duplex PCR, *Acta Veterinaria*, 66 (1), 115-124.

97. Mirilović M, 2006, Ekonomska analiza epizootiološko-epidemiološkog stanja trihineloze u Srbiji i izrada programa za eradikaciju, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, 1-190.
98. Misra HP, Fridovich I, 1972, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *Journal of Biological chemistry*, 247 (10), 3170-3175.
99. Mittapalli O, Neal JJ, Shukle RH, 2007, Antioxidant defense response in a galling insect, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104 (6), 1889-1894.
100. Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Yang B, Kadowaki T, 2012, Molecular Identification of Chronic bee paralysis virus Infection in *Apis mellifera* Colonies in Japan, *Viruses*, 4 (7), 1093-1103.
101. Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Yang B, Peng G, Kadowaki T, 2013, Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan, *Environmental microbiology reports*, 5 (1), 74-77.
102. Moritz RF, Härtel S, Neumann P, 2005, Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity, *Ecoscience*, 12 (3), 289-301.
103. Muñoz I, Stevanovic J, Stanimirovic Z, De la Rúa P, 2012, Genetic variation of *Apis mellifera* from Serbia inferred from mitochondrial analysis, *Journal of Apicultural Science*, 56 (1), 59-69.
104. Mutinelli F, Costa C, Lodesani M, Baggio A, Medrzycki P, Formato G, Porrini C, 2010, Honey bee colony losses in Italy, *Journal of Apicultural Research*, 49 (1), 119-120.
105. Muüch D, Amdam GV, Wolschin F, 2008, Ageing in a eusocial insect: molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee, *Functional ecology*, 22 (3), 407-421.
106. Natsopoulou ME, McMahon DP, Doublet V, Bryden J, Paxton RJ, 2015, Interspecific competition in honeybee intracellular gut parasites is asymmetric and favours the spread of an emerging infectious disease, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20141896.

106. Neumann P, Carreck N, 2010, Honey bee colony losses, *Journal of Apicultural Research*, 49, 1-6.
107. Nikolenko AG, Saltykova ES, Gaifullina LR, 2012, Molecular mechanisms of antioxidant protective processes in honeybee *Apis mellifera*, *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspect of Cell Signaling*, 279-293.
108. Nikolić T, 2017, Molekularne osnove odgovora medonosne pčele (*Apis mellifera*, L.) na stres izazvan jonima teških metala, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 1-156.
109. Nikolic TV, Purac J, Orcic S, Kojic D, Vujanovic D, Stanimirovic Z, Grzetic I, Ilijevic K, Sikoparija B, Blagojevic DP, 2015, Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 90 (4), 181-194.
110. Nikolic-Kokic A, Blagojevic D, Spasic M, 2010, Complexity of free radical metabolism in human erythrocytes, *Journal of Medical Biochemistry*, 29 (3), 189-195.
111. OIE – World Organisation for Animal Health, 2013, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 2.2.4. Nosemosis of honey bees, Dostupno na: http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.02.04_NOSE_MOSIS_FINAL.pdf.
112. Oldroyd BP, 2007, What's Killing American Honey Bees?, *PLoS Biology*, 5 (6), e168.
113. Orcic S, Nikolic T, Purac J, Šikoparija B, Blagojevic DP, Vukasinovic E, Plavska N, Stevanovic J, Kojic D, 2017, Seasonal variation in the activity of selected antioxidantenzymes and malondialdehyde level in worker honey bees, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 165 (2-3), 120-128.
114. Page RE, Scheiner R, Erber J, Amdam GV, 2006, The Development and Evolution of Division of Labor and Foraging Specialization in a Social Insect (*Apis mellifera* L.), *Current topics in developmental biology*, 74, 253-286.

114. Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I, 2007, *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*, *Apidologie*, 38 (6), 558-565.
115. Pecci CD, 2011, Oxidation of Ingested Phenolic Compounds Creates Oxidative Stress in the Midgut Tissues of *Lymantria dispar* Caterpillars, BSc Thesis, University of Michigan, Ann Arbor, MI, USA.
116. Pislak Ocepek M, Toplak I, Zajc U, Jenčič V, Žvokelj L, Vreček ŠJ, Bevk D, 2018, Study of some pathogens in bumblebees and honeybees at four different locations in Slovenia, Abstract Book, 8th Congress of Apidology (EurBee 8), Sept 18-20, pp. 108, Ghent, Belgium.
117. Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin, WE, 2010, Global pollinator declines: trends, impacts and drivers, *Trends in Ecology & Evolution*, 25 (6), 345-353.
118. Rasmussen R, 2001, Quantification on the LightCycler. In Rapid Cycle Real-Time PCR, Springer Press, Berlin, Heidelberg, 21-34.
119. Ravoet J, Maharramov J, Meeus I, de Smet L, Wenseleers T, Smagghe G, de Graaf DC, 2013, Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality, *PLoS ONE*, 8 (8), e72443.
120. Ravoet J, Schwarz RS, Descamps T, Yañez O, Tozkar CO, Martín-Hernández R, Bartolomé C, De Smet L, Higes M, Wenseleers T, Schmid-Hempel R, 2015, Differential diagnosis of the honey bee trypanosomatids *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*, *Journal of invertebrate pathology*, 130, 21-27.
121. Ravoet Jorgen, Smet LD, Meeus I, Smagghe G, Wenseleers T, de Graaf DC, 2014, Widespread occurrence of honey bee pathogens in solitary bees, *Journal of Invertebrate Pathology*, 122, 55-58.
122. Regan T, Barnett MW, Laetsch DR, Bush SJ, Wragg D, Budge GE, ... & Freeman TC, 2018, Characterisation of the UK honey bee (*Apis mellifera*) metagenome, *bioRxiv*, 293647. doi: <https://doi.org/10.1101/293647>

-
123. Retschnig G, Williams GR, Schneeberger A, Neumann P, 2017, Cold ambient temperature promotes *Nosema* spp. intensity in honey bees (*Apis mellifera*), *Insects*, 8 (1), 20.
124. Ruiz-González MX, Brown MJ, 2006, Honey bee and bumblebee trypanosomatids: specificity and potential for transmission, *Ecological Entomology*, 31(6), 616-622.
125. Runckel C, DeRisi J, Flenniken ML, 2014, A draft genome of the honey bee trypanosomatid parasite *Crithidia mellifica*, *PLoS one*, 9 (4), 95057.
126. Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, DeRisi JL, 2011, Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*, *PLoS one*, 6 (6), 20656.
127. Ryu JH, Ha EM, Lee WJ, 2010, Innate immunity and gut-microbe mutualism in *Drosophila*, *Developmental & Comparative Immunology*, 34 (4), 369-376.
128. Scharlaken B, de Graaf DC, Goossens K, Brunain M, Peelman LJ, Jacobs FJ, 2008, Reference gene selection for insect expression studies using quantitative realtime PCR: the head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge, *Journal of insect Science*, 8 (1), 33.
129. Schmid-Hempel R, Tognazzo M, 2010, Molecular divergence defines two distinct lineages of *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae), parasites of bumblebees, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57 (4), 337-345.
130. Schwarz RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, de Graaf DC, Evans JD, 2015a, Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellifica* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62 (5), 567-583.
131. Schwarz RS, Evans JD, 2013, Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honeybees, *Developmental & Comparative Immunology*, 40 (3-4), 300-310.

131. Schwarz RS, Huang Q, Evans JD, 2015b, Hologenome theory and the honey bee pathosphere, *Current opinion in insect science*, 10, 1-7.
132. Schwarz RS, Moran NA, Evans JD, 2016, Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113 (33), 9345-9350.
133. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M, 2012, Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions, *Journal of Botany*, 2012: 1-26.
134. Short C, Bailey G, Ashton D, 1997, Ovine Johne's Disease - Evaluation of Control and Eradication Strategies, ABARE.
135. Simeunovic P, Stevanovic J, Cirkovic D, Radojicic S, Lakic N, Stanisic Lj, Stanimirovic Z, 2014, *Nosema ceranae* and queen age influence the reproduction and productivity of the honey bee colony, *Journal of Apicultural Research*, 53 (5), 545-554.
136. Slater TF, 1984, Overview of methods used for detecting lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*, 105, 283-93.
137. Stanimirovic Z, Pejovic D, Stevanovic J, Vucinic M, Mirilovic M, 2002, Investigations of hygienic behaviour and disease resistance in organic beekeeping of two honeybee ecogeographic varieties from Serbia, *Acta Veterinaria*, 52 (2-3), 169-180.
138. Stanimirovic Z, Popeskovic D, Pejovic D, 1999a, Biodiversity of the honeybee *Apis mellifera*, Linne (1758), from the Yugoslav regions I – the biometric variability of the Banate and Sjenicko–Peshtersky ecotypes chromosomes, *Acta Veterinaria*, 49 (2-3), 199-205.
139. Stanimirovic Z, Stevanovic J, Cirkovic D, 2005a, Behavioural defenses of the honey bee ecotype from Sjenica – Pester against *Varroa destructor*, *Acta Veterinaria*, 55 (1), 69-82.
140. Stanimirovic Z, Vucinic M, Stevanovic J, 1999b, Biodiversity of the honeybee *Apis mellifera*, Linne (1758), from some Yugoslav regions: II – Ultrastructural chromosomal differences between Banat and Syenichko-Peshterski honeybee ecotypes, *Acta Veterinaria*, 49 (2-3), 207-214.

141. Stanimirovic Zoran, Stevanovic Jevrosima, Andjelkovic Marko, 2005b, Chromosomal diversity in *Apis mellifera carnica* from Serbia, *Apidologie*, 36 (1), 31-42.
142. Stanimirović Zoran, Soldatović Bogosav, Vučinić Marijana, 2000, Biologija pčela, Medonosna pčela, Fakultet veterinarske medicine, Medicinska knjiga-Medicinske komunikacije, Beograd, 375.
143. Stevanovic J, Schwarz RS, Vejnovic B, Evans JD, Irwin RE, Glavinic U, Stanimirovic Z, 2016, Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007-2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees, *Journal of Invertebrate Pathology*, 139, 6-11.
144. Stevanovic J, Simeunovic P, Gajic B, Lakic N, Radovic D, Fries I, Stanimirovic Z, 2013, Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies, *Apidologie*, 44 (5), 522-536.
145. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic R S, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N, 2011, Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder, *Apidologie*, 41 (1), 49-58.
146. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Radakovic M, Kovacevic RS, 2010, Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses, *Russian Journal of Genetics*, 46 (5), 603-609.
147. Stevanović J, 2002, Istraživanja morfometrijske i hromozomske varijabilnosti u funkciji očuvanja diverziteta kranjske medonosne pčele (*Apis mellifera carnica* Pollmann, 1879) na teritoriji Srbije, Magistarska teza, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1-190.
148. Stevanović J, 2007, Ekološko-etološki odbrambeni mehanizmi *Apis mellifera carnica* prema ektoparazitu *Varroa destructor* na području Srbije, Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1-202.
149. Stojiljković Lj, 2005, Ekonomski i zdravstveni značaj trihineloze i izrada programa za suzbijanje na epizootiološkom području Požarevac, Magistarska teza, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
150. Stokstad E, 2007, The case of the empty hives, *Science*, 316 (5827), 970-972.

151. Sumner DA, Matthews WA, Medellín-Azuara J, Bradley A, 2014, The Economic Impacts of the California Almond Industry, University of California Agricultural Issues Center.
152. Tarpy DR, 2003, Genetic diversity within honeybee colonies prevents severe infections and promotes colony growth, *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270 (1510), 99-103.
153. Teixeira EW, Chen Y, Pettis J, Evans JD, 2008, First metagenomic analysis of microorganisms in honey bees from Brazil, *Boletim de Indústria Animal*, 65 (4), 355-361.
154. Tesic M, Zugic G, Kljajic R, Stojiljkovic Lj, Rogozarski D, Blagojevic M, 2004, Trichinelosis outspread in district area and development of its eradication program, Proceedings 18th IPVS, Hamburg, June 27-1 July, Germany.
155. Tlak-Gajger I, Kolodziejek J, Bakonyi T, Nowotny N, 2014, Prevalence and distribution patterns of seven different honeybee viruses in diseased colonies: a case study from Croatia, *Apidologie*, 45 (6), 701-706.
156. Tozkar CÖ, Kence M, Kence A, Huang Q, Evans JD, 2015, Metatranscriptomic analyses of honey bee colonies, *Frontiers in genetics*, 6, 100.
157. Traynor J, 2017, A History of Almond Pollination in California, *Bee World*, 94 (3), 69-79
158. Traynor KS, Rennich K, Forsgren E, Rose R, Pettis J, Kunkel G, Madella S, Evans J, Lopez D, vanEngelsdorp D, 2016, Multiyear survey targeting disease incidence in US honey bees, *Apidologie*, 47 (3), 325-347.
159. Tritschler M, Retschnig G, Yañez O, Williams GR, Neumann P, 2017, Host sharing by the honey bee parasites *Lotmaria passim* and *Nosema ceranae*, *Ecology and evolution*, 7 (6), 1850-1857.
160. vanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Frazier J, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpy DR, Pettis JS, 2009a, Colony collapse disorder: a descriptive study, *PLoS ONE*, 4 (8), 6481.
161. vanEngelsdorp D, Hayes JJ, Underwood RM, Pettis J, 2009b, A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008, *PLoS ONE*, 3 (12), e4071.

162. Vavilova VY, Konopatskaia ID, Luzyanin SL, Woyciechowski M, Blinov AG, 2017, Parasites of the genus *Nosema*, *Crithidia* and *Lotmaria* in the honeybee and bumblebee populations : a case study in India. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 21 (8), 943-951.
163. Vejnovic B, Stevanovic J, Schwarz RS, Aleksic N, Mirilovic M, Jovanovic NM, Stanimirovic Z, 2018, Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*, *Journal of invertebrate pathology*, 151, 76-81.
164. Waters TL, 2018, The distribution and population dynamics of the honey bee pathogens *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in New Zealand, Victoria University of Wellington.
165. Weirich G, Collins A, Williams V, 2002, Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*, *Apidologie*, 33 (1), 3-14.
166. Winston ML, 1991, The biology of the honey bee, Harvard University Press.
167. Wright GA, Nicolson SW, Shafir S, 2017, Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees, *Annual review of entomology*, 63.
168. Yang B, Peng G, Li T, Kadowaki T, 2013, Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China, *Ecology and evolution*, 3 (2), 298-311.
169. Yourth CP, Brown MJF, Schmid-Hempel P, 2008, Effects of natal and novel *Crithidia bombi* (Trypanosomatidae) infections on *Bombus terrestris* hosts, *Insectes sociaux*, 55 (1), 86-90.
170. Yourth CP, Schmid-Hempel P, 2006, Serial passage of the parasite *Crithidia bombi* within a colony of its host, *Bombus terrestris*, reduces success in unrelated hosts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273 (1587), 655-659.

BIOGRAFIJA

Branislav Vejnović rođen je 12. januara 1989. godine u Sremskoj Mitrovici. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je 2008. godine, a diplomirao 2013. godine sa prosečnom oceno 9,36. Iste godine upisao je doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Položio je sve ispite predviđene planom i programom poslediplomskih studija sa prosečnom ocenom 9,81.

Od martu 2014. godine angazovan je kao istraživač saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane” (rukovodilac Prof. dr Zoran Stanimirović, ev. br. 46002). U martu 2016. godine izabran je u zvanje asistenta na Katedri za ekonomiku i statistiku Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

Za vreme osnovnih studija bio je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije u periodu od 2009-2013, kao i opštine Šid u priodu od 2011 do 2013. godine.

U okviru CEEPUS programa, 2018. godine boravio je na stručnom usavršavanju na Fakultetu veterinarske medicine u Brnu (Češka Republika).

Kao autor ili koautor objavio je 23 naučna i stručna rada, od kojih je šest objavio u časopisu sa SCI liste.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Branislav Vejnović

broj upisa 15/06

Izjavljujem

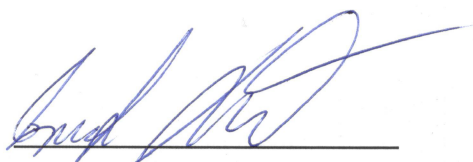
da je doktorska disertacija pod naslovom

„Molekularno-genetička identifikacija tripanozome *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 i analiza njenih efekata na zdravlje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarstvu“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28. 09. 2018. god.



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Branislav Vejnović', is written over a horizontal line.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Branislav Vejnović

Broj upisa 15/06

Studijski program Doktorske akademske studije

Naslov rada "Molekularno-genetička identifikacija tripanozome *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 i analiza njenih efekata na zdravlje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarstvu"

Mentor Prof. dr Jevrosima Stevanović i Prof. dr Milorad Mirilović

Potpisani Branislav Vejnović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 28. 09. 2018. god.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Molekularno-genetička identifikacija tripanozome *Lotmaria passim* Schwarz, 2014 i analiza njenih efekata na zdravlje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarstvu“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu, 28. 09. 2018. god.

Potpis doktoranda



Branislav Vejnović