

Универзитет у Београду
Факултет ветеринарске медицине

Урош М. Главинић

**Утицај различитих антимикуробних
препарата и адитива на експресију гена
значајних за имунитет, оксидативни стрес
и преживљавање пчела *Apis mellifera*
инфицираних микроспоридијом
*Nosema ceranae***

Докторска дисертација

Београд, 2019.

University of Belgrade
Faculty of veterinary medicine

Uroš M. Glavinić

**The effects of various antimicrobials and
supplements on the expression of immune-
related genes, oxidative stress and survival of
honey bee *Apis mellifera* infected with
microsporidium *Nosema ceranae***

Doctoral thesis

Belgrade, 2019.

Ментор 1:

Др Зоран Станимировић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Ментор 2:

Тамаш Петровић, научни саветник

Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“, у Новом Саду

Чланови комисије:

Др Јевросима Стевановић, ванредни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Др Душан Мишић, ванредни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Др Мирослав Валчић, редовни професор

Факултет ветеринарске медицине, Универзитет у Београду

Датум одбране: _____ 2019. у Београду.

Докторска дисертација реализована је захваљујући ресурсима научноистраживачког пројекта „Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране” који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (ев. бр.ИИИИ 46002) и којим руководи. проф. др Зоран Станимировић

Посебну захвалност на помоћи, подршци и поверењу дугујем свом ментору, пријатељу и шефу, професору др. Зорану Станимировићу

*Овај рад, уз велику захвалност, посвећујем мојим
Главинићима, Вукићевићима и Ђојбашићима*

РЕЗИМЕ

Nosema ceranae је микроспоридија која паразитира код Европске медоносне пчеле, *Apis mellifera*, и доминантна је врста рода *Nosema* у југоисточној Европи. У зависности од степена инфекције и периода године, овај ендопаразит може имати далекосежне последице по пчеле, њихово здравље и продуктивност. Последњих година посебно је истраживан утицај *N. ceranae* на имунитет пчела а закључци појединих истраживања издвајају ефекат супресије гена значајних за имунитет пчела, односно доказују имуносупресивне последице инфекције врстом *N. ceranae*. Терапија ноземозе подразумева употребу антибиотика фумагилина, који има доказану ефикасност у сузбијању инфекције али његови споредни ефекти могу представљати проблем за саме пчеле и квалитет пчелињих производа, те је стога је његова примена у многим земљама ограничена. Имајући ово на уму константно се трага за природним и синтетским компонентама које би биле замена за фумагилин. Тестиране су многе супстанце, а међу онима које су показале најбољи ефекат издвајају се екстракти биљака и алги и синтетске витаминско-минералне мешавине. У овом раду је у кавезном експерименту тестирано пет препарата: (1) антибиотик фумагилин, (2) биљни екстракт тимол; и три адитива у исхрани пчела: (3) комерцијални препарат Beewell AminoPlus који представља витаминско-аминокиселинску мешавину, (4) комерцијални препарат Medenko forte који садржи екстракте храстове коре, пелена и жалфије и (5) полисахаридни екстракт гљиве *Agaricus blazei*. Пчеле су у свим третираним групама трећег дана живота инфициране спорама *N. ceranae*, а различите групе су третиране препаратима од првог, трећег и шестог дана. Код третираних пчела је праћен ефекат на преживљавање пчела, степен *Nosema* инфекције, нивое експресије гена значајних за имунитет пчела (абецин, дефензин, хименоптецин, апидецин и

вителогенин) и ниво оксидативног стреса праћен кроз активност антиоксидативних ензима (каталазе, супероксид дизмутазе и глутатион С-трансферазе) и концентрације малондиалдехида. Сви параметри су поређени са контролним (неинфицираним и инфицираним) групама.

Резултати су показали да је инфекција пчела микроспоридијом *N. ceranae* у овом експерименту изазвала повећан морталитет пчела, супресију већине гена значајних за имунитет и довела до оксидативног стреса.

Третман фумагилином није довео до значајног морталитета и појаве оксидативног стреса, али је имао благ имуносупресивни ефекат код неинфицираних пчела, док је код пчела инфицираних спорама *N. ceranae* статистички веома значајно смањио степен инфекције, повећао преживљавање пчела и смањио супресију гена за имунепептиде, чиме је доказан његов антинозематозни ефекат.

Третман тимолом није довео до морталитета, појаве оксидативног стреса, нити битно пореметио већину гена значајних за имунитет код неинфицираних пчела, док је показао значајан антинозематозни ефекат код пчела инфицираних спорама *N. ceranae* доказан кроз статистички веома значајно смањење степена инфекције, повећање преживљавања пчела, смање оксидативног стреса и супресије гена значајних за имунитет.

Исхрана пчела уз додатак препарата Beewell AminoPlus није довео до морталитета и појаве оксидативног стреса, а изазвала је имуностимулативни ефекат код неинфицираних пчела, док је код пчела инфицираних врстом *N. ceranae* довела до смањења морталитета, спречавања појаве оксидативног стреса, редукције степена инфекције *N. ceranae* и смањења супресије изазване инфекцијом, чиме је доказан његов имунопротективни ефекат.

Исхрана пчела уз додатак препарата Medenko forte није довела до морталитета, појаве оксидативног стреса нити ремећења гена значајних за имунитет неинфицираних пчела, док је код пчела инфицираних спорама

N. ceranae довела до смањења mortaliteta, количине спора, параметара оксидативног стреса и супресије већине гена значајних за имунитет пчела, доказујући његов антинозематозни ефекат.

Исхрана неинфицираних пчела сирупом коме је додат екстракт гљиве *A. blazei* није довела до mortaliteta и појаве оксидативног стреса, а постигла је веома значајан имуностимулативни ефекат, док је код пчела инфицираних спорамаа *N. ceranae* довела до смањења: mortaliteta пчела, количине спора *N. ceranae*, одређених параметара оксидативног стреса и снижавања експресије гена значајних за имунитет инфицираних пчела.

Кључне речи: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, имуносупресија, експресија гена значајних за имунитет, оксидативни стрес, антиоксидативни ензими, преживљавање пчела, третман ноземозе, имуностимулативни ефекат, фумагилин, тимол, адитиви у исхрани пчела, Beewel AminoPlus, Medenko forte, екстракт гљиве *Agaricus blazei*

Научна област: Ветеринарска медицина

Ужа научна област: Биологија, Биотехнологија, Зоологија, Ветеринарска генетика, Молекуларно-генетичка дијагностика, Узгој и нега пчела, Болести пчела, Паразитске болести

UDK број: 619:593.195:595.799

SUMMARY

Nosema ceranae is a microsporidian endoparasite of the European honey bee, *Apis mellifera*, and the dominant *Nosema* species in Southeast Europe. Depending on the infection level it could have significant consequences on bees, their health and productivity. The impact of *N. ceranae* on honey bees' immunity has been particularly investigated in recent years. Some conclusions of this research underline *N. ceranae*-induced suppression of immune-related genes, proving its immunosuppressive impact. Treatment for nosemosis includes the use of the antibiotic fumagillin. Fumagillin has proven effect in *Nosema* control, but its side effects may pose a problem for the bees and the quality of their products, which is why its application in many countries have been limited. Hence, researchers are constantly looking for natural and synthetic components which could be suitable substitutes for fumagillin. Many products have been tested and plant/algae extracts and synthetic vitamin-mineral complexes showed the best effects.

This laboratory (cage) experiment included testing of five products: (1) antibiotic fumagillin (2) a plant extract - thymol, and three dietary supplements: (3) a commercial amino acid and vitamin complex named Beewell AminoPlus, (4) a commercial mixture of oak bark, sage and absinth extracts named Medenko forte, and (5) a polysaccharide extract of *Agaricus blazei* mushroom. Bees in all treatment groups were infected with *N. ceranae* spores on day 3, and treated with the listed products from day 1, 3 or 6 after emergence. Bee survival, *Nosema* loads, levels of immune-related genes (abaecin, apidaecin, hymenoptaecin, defensin and vitellogenin) expression and the level of oxidative stress, assessed through the activity of antioxidative enzymes (catalase, glutathione S-transferase and superoxide dismutase) and the concentration of malondialdehyde, were measured in all experimental groups. The obtained values were compared with those of control (noninfected and infected) groups.

The results showed that *N. ceranae* infection increased bee mortality, suppressed the expression of the majority of immune-related genes and induced oxidative stress in infected bees.

Treatment with fumagillin in noninfected bees did not cause significant bee mortality or oxidative stress, but had mild immunosuppressive effect, whilst in infected bees it reduced the spore load and the suppression of genes for immune peptides, and increased the survival of *N. ceranae* infected bees, proving its anti-*Nosema* effect.

Treatment with thymol did not cause mortality, oxidative stress or significant disturbance in expression of immune-related genes in noninfected bees. However, it showed noticeable anti-*Nosema* effect confirmed through significantly decreased infection levels, oxidative stress and immunosuppression as well as increased surviving of *Nosema*-infected bees.

Feeding bees with the addition of Beewell AminoPlus did not cause mortality and oxidative stress, and acted as an immunostimulant of noninfected bees, while it decreased the mortality, *Nosema* loads, levels of oxidative stress and immunosuppression in bees infected with *N. ceranae*.

Food supplemented with Medenko forte did not induce mortality, oxidative stress or disturbance in the expression of immune-related genes in noninfected bees. Moreover, this supplementation reduced mortality, spore loads, oxidative stress levels and suppression of majority of monitored immune genes, showing desirable anti-*Nosema* effect.

The addition of *A. blazei* extract to food given to noninfected bees did not impact bee mortality and oxidative stress, but proved to act as a relevant immunostimulant. On the other hand, given to bees infected with *N. ceranae*, the extract decreased bee mortality, infection levels, some parameters of oxidative stress and the suppression of immune-related genes.

Key words: *Apis mellifera*, *Nosema ceranae*, immunosuppression, expression of immune-related genes, oxidative stress, antioxidative enzymes, bee survival, nosemosis treatment, immunostimulant, fumagillin, thymol, food supplements, Beewel AminoPlus, Medenko forte, *Agaricus blazei* extract

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Fields of Study: Biology, Biotechnology, Zoology, Veterinary Genetics, Molecular genetic diagnostics, Breeding and care of honey bees, Bee diseases, Parasitic diseases

UDK number: 619:593.195:595.799

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	3
2.1. Механизми одбране пчела.....	3
2. 1. 1. Индивидуални механизми одбране – индивидуални имунитет.....	5
2. 2. Микроспоридије <i>Nosema spp.</i> ендопаразити пчела.....	6
2. 3. Утицај <i>N. ceranae</i> на здравствено стање пчела.....	8
2. 3. 1. Промене у метаболизму.....	8
2. 3. 2. Оксидативни стрес и друге промене у виталним функцијама пчела.....	13
2. 3. 3. Утицај на имуни одговор пчела.....	14
2. 3. 4. Третман и исхрана друштва инфицираних са <i>N. ceranae</i>	17
3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ.....	22
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	23
4. 1. Материјал.....	23
4. 2. Методе.....	25
4. 2. 1. Излегање пчела и формирање група.....	25
4. 2. 2. Прављење инокулума и вештачко заражавање пчела.....	32
4. 2. 3. Узорковање пчела.....	32
4. 2. 4. Утврђивање нивоа експресије гена.....	33
4. 2. 4. 1. Екстракција РНК.....	33
4. 2. 4. 2. Реверзна транскрипција РНК.....	34
4. 2. 4. 3. Провера квалитета кДНК.....	35
4. 2. 4. 4. qReal-Time PCR анализа експресије гена значајних за имунитет пчела.....	36
4. 2. 5. Мерење параметара оксидативног стреса.....	38
4. 2. 5. 1. Одређивање концентрације протеина.....	38
4. 2. 5. 2. Одређивање активности глутатион С-трансферазе.....	39

4. 2. 5. 3. Одређивање активности укупне супероксид-дисмутазе.....	40
4. 2. 5. 4. Одређивање активности каталазе.....	41
4. 2. 5. 5. Одређивање концентрације малондиалдехида.....	42
4. 2. 6. Праћење морталитета пчела	43
4. 2. 7. Бројање спора <i>Nosema</i>	43
4. 2. 8. Статистичка анализа.....	44
5. РЕЗУЛТАТИ.....	46
5. 1. Преживљавање пчела у контролним групама.....	46
5. 1. 1. Преживљавање пчела третираних фумагилином.....	46
5. 1. 2. Преживљавање пчела третираних тимолом.....	47
5. 1. 3. Преживљавање пчела храњених уз додатак препарата Beewell AminoPlus.....	48
5. 1. 4. Преживљавање пчела храњених уз додатак препарата Medenko forte.....	50
5. 1. 5. Преживљавање пчела храњених уз додатак екстракта гљиве <i>Agaricus blazei</i>	51
5. 2. Број спора код пчела инфицираних са <i>N. ceranae</i>	53
5. 2. 1. Број спора код пчела инфицираних са <i>N. ceranae</i> и третираних фумагилином.....	53
5. 2. 2. Број спора код пчела инфицираних са <i>N. ceranae</i> и третираних тимолом.....	54
5. 2. 3. Број спора код пчела инфицираних са <i>N. ceranae</i> и храњених уз додатак препарата Beewell AminoPlus.....	56
5. 2. 4. Број спора код пчела инфицираних са <i>N. ceranae</i> и храњених уз додатак препарата Medenko forte.....	57
5. 2. 5. Број спора код пчела инфицираних са <i>N. ceranae</i> и храњених уз додатак екстракта гљиве <i>Agaricus blazei</i>	59
5. 3. Параметри оксидативног стреса.....	61
5. 3. 1. Поређење параметара оксидативног стреса код пчела храњених уз додатак фумагилина.....	61

5. 3. 2. Поређење параметара оксидативног стреса код пчела храњених уз додатак тимола.....	72
5. 3. 3. Поређење параметара оксидативног стреса код пчела храњених уз додатак препарата Beewell AminoPlus.....	81
5. 3. 4. Поређење параметара оксидативног стреса код пчела храњених уз додатак препарата Medenko forte.....	91
5. 3. 5. Поређење параметара оксидативног стреса код пчела храњених уз додатак екстракта гљиве <i>Agaricus blazei</i>	101
5. 4. Експресија гена значајних за имунитет код пчела.....	111
5. 4. 1. Експресија гена значајних за имунитет код пчела из група третираних фумагагилином.....	111
5. 4. 2. Експресија гена значајних за имунитет код пчела из група храњених уз додатак тимола.....	124
5. 4. 3. Експресија гена значајних за имунитет код пчела из група храњених уз додатак препарата Beewell AminoPlus.....	139
5. 4. 4. Експресија гена значајних за имунитет код пчела из група храњених уз додатак препарата Medenko forte.....	150
5. 4. 5. Експресија гена значајних за имунитет код пчела из група храњених уз додатак екстракта гљиве <i>Agaricus blazei</i>	164
6. ДИСКУСИЈА.....	177
6. 1. Утицај фумагагилина на праћене параметре.....	177
6. 2. Утицај тимола на праћене параметре.....	184
6. 3. Утицај адитива на праћене параметре.....	192
7. ЗАКЉУЧЦИ.....	201
8. ЛИТЕРАТУРА.....	204
БИОГРАФИЈА АУТОРА.....	235

1. УВОД

Медоносна пчела (*Apis mellifera*) најпознатији је представник надфамилије Apoidea). Назив врсте, медоносна пчела (лат. *Apis mellifera*), је добила на основу чињенице да из природе сакупља нектар и полен и у свом гнезду складишти мед, производ јединствених карактеристика кога човечанство користи од праисторијског доба. Међутим, осим што стварају мед, пчеле обављају и опрашивање биљака, активност која их чини једним од најкориснијих инсеката на планети. Јединствена, али не и једноставна биологија, физиологија, понашање и социјално устројство пчела, вековима су привлачили пажњу различитих култура и цивилизација, али и били предмет многих научних, филозофских и социолошких студија. Историјски подаци говоре о томе да је човек и пре каменог доба користио пчелиње производе. У почетку, човек је уништавао пчелиња легла и из њих узимао производе, да би касније почео пчеле да гаји у својој близини а онда полако развијао технику узимања производа без уништавања пчела и њиховог легла. Међу првима технику пчеларења познавали су Стари Египћани и Асирци. На нашим просторима пчеларство се значајно развило доласком Јужних Словена, а сачувани су српски историјски споменици о производњи и трговини медом на овим просторима из доба Стефана Првовенчаног и Краља Уроша Првог.

Од тренутка када је пчеле из дивљине преместио у своје непосредно окружење и почео да прави просторе за смештај пчелињих друштава (кошнице), човек је кренуо и са непосредном негом и бригом око здравља пчела. Као и свака животиња, пчела има своје биолошке непријатеље, односно микро- и макроорганизме који нарушавају здравствени статус, како пчеле као јединке, тако и целокупног пчелињег друштва. Експанзијом пчеларства која је на неки начин довела до индустријализације и комерцијализације узгоја пчела, пчеле су ицрпљиване, некада и преко својих граница; човекова потреба за што

већом продуктивношћу, а и сама еволуција, довели су до појачања патогеног ефекта појединих организама, али и до појаве нових патогена, који у данашње време озбиљно угрожавају здравље пчела. Последњих деценија сведоци смо драматичких губитака пчелињих друштава широм света који се описују различито: „нестајање пчела“, „губици пчела“, „колапс пчелињих друштава енг. *Colony Collapse Disorder, CCD*“ и др. Након опсежних научних истраживања спроведених у циљу откривања узрока овог нестајања пчела, већина резултата говори о мултифакторијалном стању, односно закључку да више удружених чинилаца (клима, квалитет и квантитет хране, инфекције патогенима, сама пчеларска техника, пестициди и многи други стресори) доводе до страдања друштава. Када је реч о патогенима, међу најзначајнијим истичу се микроспоридије (лат. *Microsporidia*) из рода *Nosema*, и то пре свега врста *N. ceranae*.

Када је реч о неспецифичним факторима који доводе до губитака у пчеларству, у које спадају хигијенско санитарни услови, старосна структура друштва, амбијентални и климатски услови, исхрана, генетика самих друштава и др., посебно се истиче утицај хране, како њена количина тако и састав, квалитет и чистоћа. Многа истраживања су показала да храна сиромашна протеинима води слабљењу здравственог стања, а пре свега имунитета пчела, посебно истичући удружени ефекат неизбалансиране исхране и инфекције ендопаразитом *N. ceranae* на основу чега је и дефинисана тема овог рада.

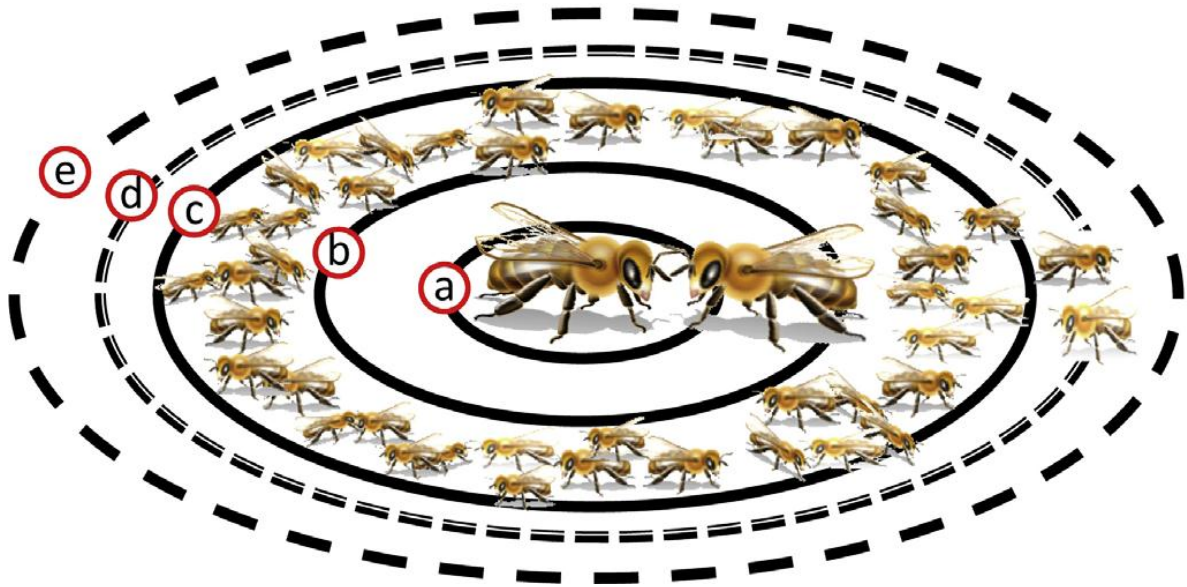
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Механизми одбране пчела

Имунитет представља скуп механизма којима се организам бори у циљу опстанка и очувања здравља. У зависности од механизма дејства имунитет се дели на две целине: урођени и стечени имунитет. Иако се дуго сматрало да инсекти поседују урођени имунитет и фагоцитозу као једини облик стеченог имунитета (Rumyantsev, 1998), каснија истраживања доказала су присуство специфичне имунолошке одбране, односно одређене форме доживотне заштите од агенаса са којима је организам већ био у контакту (Eans и Spivak, 2010; Gätschenberger и сар., 2013).

Опстанак пчела зависи од успешности њихове одбране од бројних агенаса из спољашње средине, патогених микроорганизама, паразита и предатора. Код медоносних пчела, обзиром на комплексан социјални начин живота, постоји више нивоа одбране (слика 1). Наиме, свака јединка у пчелињем друштву поседује такозвани “индивидуални имунитет”, који подразумева неколико нивоа индивидуалне заштите од страних агенаса, почев од физичких баријера до комплексних механизма конститутивног имунитета. При томе, одбрамбени механизми сваке појединачне пчеле доприносе отпорности читаве пчелиње заједнице (Воеcking и Spivak, 1999). Међутим, индивидуални механизми заштите нису довољни за опстанак пчелињег друштва због специфичних услова живота који владају у пчелињој заједници (Stanimirović и сар., 2000). Наиме, велика густина популације (велики број одраслих јединки, али и велика количина легла на скученом животном простору), висока температура и влажност, велико генетичко сродство међу члановима заједнице и константне интеракције међу јединкама како унутар генерација, тако и међу генерацијама, повећавају ризик од развоја болести, јер пружају идеалне услове за брзо

ширење патогена, али и за еволуцију специјализованих паразита (Schmid-Hempel, 1998; Richard и сар., 2008; Wilson-Rich и сар., 2009).



Слика 1: Нивои одбране у пчелињем друштву: (а) индивидуални механизми одбране (б) интеракције између две јединке као што је узајамно чишћење (ц) колективни механизми одбране као што је подела рада (д) минимизирање уласка инфективних агенаса (е) коришћење смола и других материја из природе. (Evans и Spivak, 2010).

Код пчела су се, осим индивидуалних механизма одбране, током еволуције развили и комплексни механизми колективне заштите од паразита и патогена којима оне смањују ризик од избијања болести (Cremer и сар., 2007). Таква колективна одбрана која проистиче из кооперације међу члановима пчелиње заједнице назива се “социјални имунитет” и обухвата физиолошке, бихејвиоралне и организационе адаптације и реакције којима се спречава улазак, смештање и ширење паразита како превентивно, тако и у ситуацијама када је потребна активна борба (Cremer и сар., 2007; Wilson-Rich и сар., 2009; Evans и Spivak, 2010).

веома битан аспект социјалног устројства пчелињег друштва предствљају хигијенско и неговатељско понашање пчела (Boecking и сар., 1993; Spivak и Gilliam, 1993, Stanimirovic и сар., 2002, 2003, 2005; Pejovic и сар., 2002).

2. 1. 1. Индивидуални механизми одбране – индивидуални имунитет

Прву линију одбране код инсеката представљају физичке баријере које спречавају да инфективни агенси доспеју у телесне шупљине (Feldhaar и Gross, 2008; Antúnez и сар., 2008). Ову улогу има чврста хитинска кутикула која облаже спољну површину тела (егзоскелет), али и делове цревног тракта (предње и задње црево), делове полног система и трахеје. Провентрикуларни залистак омогућава пчелама филтрирање спора унетих храном и на тај начин доприноси одбрани од инфекција. Интестинална микрофлора и биохемијски услови садржаја средњег црева спречавају раст и мултипликацију многих врста бактерија (Gilliam и сар., 1988; Dustmann, 1993; Gliński и Jarosz, 1995a). Перитрофна мембрана облаже средње црево и пропушта хранљиве материје и ензиме, али ипак обезбеђује извесну заштиту од продирања микроорганизама у хемоцел. Ипак, средње црево је комплетно лишено хитинозног омотача и због тога је потенцијално најосетљивији део алиментарног канала из ког микроби могу продрети у хемоцел. Из овог разлога, инфекције великим дозама спора (нпр. *Nosema*) или инфекције изазване високо патогеним врстама гљивица уништавају анатомске и физиолошке баријеру код медоносне пчеле (Gliński и Jarosz, 1995a,b) и тада микроорганизми доспевају у хемоцел и хемолимфу и могу довести до озбиљних штетних последица. Међутим, када код инсеката микроорганизми ипак доспеју у хемоцел, они имају начине да се одбране другим механизмима, односно на сцену ступа “друга линија одбране”.

Другу линију одбране код инсеката представља конститутивни имунитет (урођени, генетички детерминисан, наследни имунитет) кога чине

ћелијски и хуморални имунитет који су међусобно повезани (Feldhaar и Gross, 2008; Antúnez и sar., 2008; Wilson-Rich и sar., 2009)

Антимикробни пептиди - примарно их производи масно ткиво, али и хемоцити, као одговор на инфекцију микроорганизама (нпр. Грам + и Грам - бактерије, гљивице, паразити) против којих испољавају широк спектар дејства (Wilson-Rich и sar., 2009). У оквиру класе инсеката идентификовано је преко 170 имуних пептида (при чему механизам деловања већине није познат). Међутим, код пчела постоји само шест антимикробних пептида: - апидецин - абецин - хименоптецин - аписимин - дефензин 1 - дефензин 2 (Evans и sar., 2006) од којих се као најзначајнији издвајају апидецин, абецин, хименоптецин и дефензин (Evans и sar., 2006).

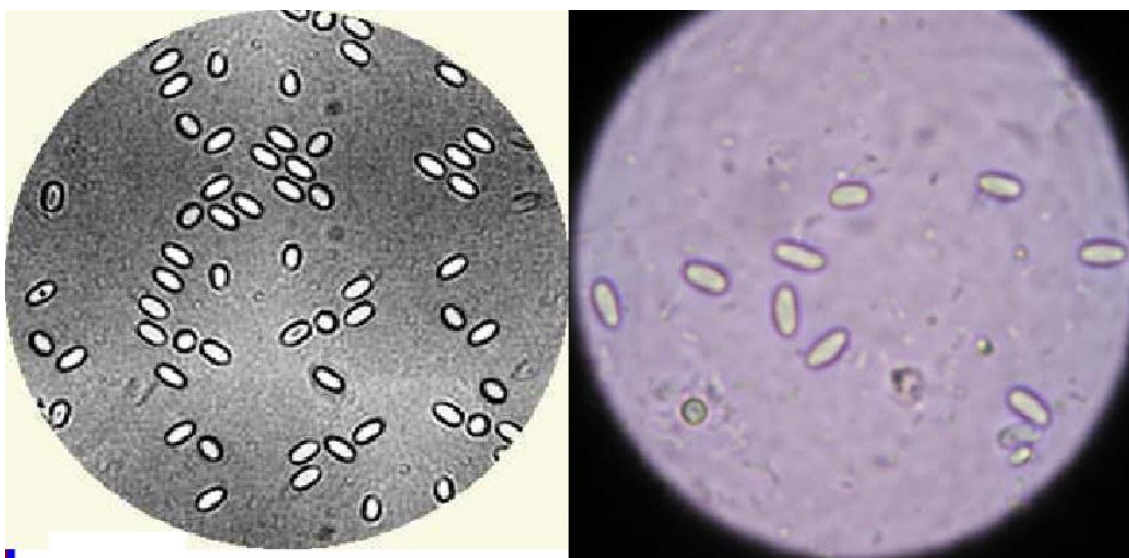
Вителогенин је протеин жуманца јајета специфичан за женке инсеката. Примарно се синтетише у масном телу и ослобађа у хемолимфу којом се преноси до оваријума и других ткива. Има функцију у репродукцији, регулише имуне функције и сматра се главним регулатором животног века пчела (Seehuus и sar., 2006, Corona и sar., 2007). Вителогенин помаже и у интеграцији организације (социјалног устројства) пчелињег друштва путем свог плејотропног дејства на поделу рада и специјализацију излетница (Amdam и Omholt, 2003; Nelson и sar., 2007). Осим тога, отпорност на оксидативни стрес код пчела повезан је са дејством вителогенина (Nelson и sar., 2007, Seehuus и sar., 2006; Corona и sar., 2007; али и са степеном загађености животне средине (Nikolic и sar., 2015). Масно ткиво ("паралела" јетре сисара), али и хемоцити, су главна места синтезе антимикробних пептида, ензима и вителогенина (који се након синтезе ослобађају у хемолимфу (Gillespie и sar., 1997; Lavine и Strand, 2002).

2. 2. Микроспоридије *Nosema spp.* ендопаразити пчела

Микроспориридије рода *Nosema* су чести паразити адултних пчела. До данас су описане две врсте микроспориридија које паразитирају код медоносних пчела: *Nosema apis* и *N. ceranae*. Обе врсте паразитирају код Европске медоносне пчеле (*Apis mellifera*) и сматрају се најраспрострањенијим патогенима пчела широм света (Fries, 2010; Higes и сар., 2010a). *N. apis* је позната научној јавности више од сто година (Zander, 1909), док је *N. ceranae* иницијално откривена (Fries и сар. 1996) као паразит азијске медоносне пчеле (*Apis cerana*) по којој је и добила име. Недуго затим, многи аутори широм света, детектовали су овог паразита у европској медоносној пчели (Chen и сар. 2008; Giersch и сар. 2009; Higes и сар. 2006; Huang и сар. 2007; Klee и сар. 2007; Paxton и сар. 2007). Даљим анализама узорака пчела из Европе утврђено је да *N. ceranae* чак доминира у односу на *N. apis* у већини земаља (Chauzat и сар., 2007; Martín-Hernández и сар., 2007; Klee и сар., 2007; Taraczi и сар., 2009; Granato и сар., 2009) укључујући Србију и околне земље бивше Југославије (Stevanovic и сар., 2011; 2013, 2016; Taric и сар., 2019). Болест проузрокована овим паразитом може се посматрати као глобални проблем, настао његовом великом преваленцијом на свих пет континената (Martín-Hernández и сар., 2007; Klee и сар., 2007; Giersch и сар., 2009; Higes и сар., 2009a; Higes и сар., 2013).

Све врсте микроспориридија (Phylum: Microsporidia) којима припадају и врсте из рода *Nosema* су интрацелуларни паразити. Ван ћелије домаћина могу се наћи искључиво у виду спора (слика 2) које представљају метаболички неактивну форму (Mehlhorn, 2008). Форма споре заправо и представља инфективни облик којим се паразит шири између домаћина и који поседује јединствене механизме за инвазију ћелија када доспе унутар организма домаћина (Fries, 2010). Споре су изузетно отпорне па и у спољашњој средини и на ниским температурама могу задржати вијабилност – у кошници и до годину дана (Bailey и Ball, 1991). Након доспевања споре у црево пчеле (ингестијом, најчешће током обављања

хигијенских активности у кошници или приликом размене хране међу пчелама) започиње процес инфекције. Овај процес почиње евагинацијом и протрузијом поларног филамента и пенетрацијом у ћелије домаћина. Након пенетрације кроз филамент у ћелију домаћина долази до ињектирања инфективне спороплазме. Након тога долази до репликације паразита и проласка кроз неколико развојних ступњева што коначно доводи до производње спора (Larsson, 1986). Производња спора доводи до оштећења ћелија домаћина и ослобађања великог броја спора у лумен црева одакле, описаним механизмом, могу инфицирати нове ћелије или путем фецеса бити избачене у спољашњу средину. Најчешће иницијално бивају инфицирани предњи делови средњег црева (вентрикулуса), након чега се инфекција постепено шири на задње партије (Fries, 1988).



Слика 2: Споре микроспоридија из рода *Nosema* (Stanimirovic и сар., 2015)

2. 3. Утицај *N. ceranae* на здравствено стање пчела

2. 3. 1. Промене у метаболизму

Сматрало се да *N. ceranae* код пчела инфицира искључиво цревни епител (Fries 2010), међутим има налаза спора и у другим ткивима као што су оваријуми, плјувачне, мандибуларне и хипофарингеалне жлезде (Steche 1960; Sokolov и Grobov 1963), Малпигијеви судови и масно ткиво (Chen и сар., 2009), као и мозак пчела (Gisder и сар., 2010). Споре ноземе детектоване су у меду (Giersch и сар., 2009; Botias и сар., 2012), полену који су на својим ногама носиле пчеле (Higes и сар., 2008a), воску (Malone и Gatehouse, 1998), млечу (Cox-Foster и сар., 2007), пчеларском материјалу (Van der Zee, 2010), као и у узорцима регургитованог садржаја птица пчеларица *Merops apiaster* (Higes и сар., 2008b), а њена ДНК детектована је и у хемолимфи пчела као и у ектопаразиту *Varroa destructor* (Glavinic и сар., 2014).

N. ceranae не само да изазива патолошке промене код пчела, како појединачно тако и на нивоу друштва, већ значајно утиче и на продуктивност пчелињих заједница (Higes и сар., 2013), и репродуктивност самих матица (Simeunovic и сар. 2014). *N. ceranae* може бити један од узрока колапса пчелињих друштава (*Colony Collapse Disorder - CCD*), односно појаве у којој јака друштва необјашњиво, „изненада“ ослабе и најчешће угину. Док неки аутори сматрају да *N. ceranae* има доминантну улогу у овим губицима пчела (Martín-Hernández и сар., 2009; Higes и сар., 2008c, 2009b, 2010b; Borneck и сар., 2010; Soroker и сар., 2010; Stanimirovic и сар., 2019), постоје истраживања која то не потврђују (Gisder и сар., 2010; Hedtke и сар., 2011; Stevanovic и сар., 2011; 2013; Fernández и сар., 2012; Dainat и сар., 2012a,b). Неусаглашени налази и резултати научника из различитих европских земља могу се објаснити разликама у еколошким факторима пре свега у клими (Fries, 2010) и последично у пчелињој паши, а претпостављено је и да различити сојеви *N. ceranae* немају исти патогени

потенцијал и способност да утичу на настанак колапса пчелињих друштава (Higes и сар., 2013; Genersch и сар., 2010; Huang и сар., 2012). мада до сада није утврђена корелација између описаних хаплотипова *Nosema* паразита и степена оштећења домаћина (Тау и сар., 2005; Williams и сар., 2008). Такође, доказано је да интензитет губитака варира и у зависности од величине пчелињака тј. броја кошница, односно да веће губитке имају пчелари са мањим бројем кошница (Brodtschneider и сар., 2018), што указује на значај саме пчеларске технике пчеларења, односно квалитета пчеларске праксе.

Од како је први пут описана инфекција микроспоридијом *N. ceranae*, појавила су се различита мишљења о последицама које она оставља на пчеле. Међутим, последњих неколико година већина истраживања потврђује да *N. ceranae* има одређени патогени ефекат на свог домаћина (Martín-Hernández и сар., 2018). Често су описиване лезије које је инфекција *N. ceranae* изазивала у средњем цреву пчела (Higes и сар., 2007; García-Palencia и сар., 2010), а заједнички закључак је да *N. ceranae* у скраћује живот пчела радилица из контролних група у кавезним експериментима (Mayack и Naug, 2009; Alaux и сар., 2010; Martín-Hernández и сар., 2011; Dussaubat и сар., 2012; Goblirsch и сар., 2013; Schwarz и Evans, 2013; Aufauvre и сар., 2014; Basualdo и сар., 2014; Doublet и сар., 2015a; Roberts и Hughes, 2014a,b; Williams и сар., 2014; Huang и сар., 2015). Са друге стране, само је неколико радова са супротним налазима (Milbrath и сар., 2013; Retschnig и сар., 2014; Garrido и сар., 2016).

Паразити из рода *Nosema* или њена ДНК пронађена је у оваријумима, плувачним, мандибуларним и хипофарингеалним жлездама (Stecche 1960; Sokolov и Grobov 1963), Малпигијевим судовима и масном ткивоу (Chen и сар., 2009), као и у мозгу пчела (Gisder и сар., 2010) али и њиховој хемолимфи (Glavinic и сар., 2014). Међутим, како је епител средњег црева

примарно место инфекције, већина истраживања патогеног ефекта била је фокусирана на њега. Медоносне пчеле користе нектар као извор угљеника, а полен као извор азота, за шта су неопходни обимни процеси у органима за варење (Kunieda и сар., 2006). Ензими метаболишу угљене хидрате и масти, разлажући их и ослобађајући енергију, поред тога омогућавају и складиштење енергије у организму (ревијално приказано у Klowden, 2002). Поремећаји у метаболизму угљених хидрата код пчела инфицираних *N. ceranae* често су забележени, указујући на активности патогена којима обезбеђује доступност хранљивих материја за своје потребе (ревијално приказано у Martín-Hernández и сар., 2018). У погледу експресије гена, овај утицај је очигледан у повећаној експресији гена α -глукозидазе и гена који су укључени у транспорт трехалозе (главни молекули за складиштење енергије угљених хидрата у инсектима; Dussaubat и сар., 2012) као и смањеној експресији гена за трехалазу и глукозо-метанол-холин оксидоредуктазу (Aufaivre и сар., 2014). Ове промене у експресији гена су потврђене у протеомичким истраживањима где су четири протеина укључена у енергетски метаболизам била мање присутна у средњем цреву пчела инфицираних *N. ceranae* у поређењу са неинфицираним (Vidau и сар., 2014). Слично, гасна хроматографија-масена спектрометрија доказала је смањење угљених хидрата и аминокиселина (као што су фруктоза, Л-пролин, сорбитол и глицерол) значајних за различите биохемијске процесе. (Aliferis и сар., 2012). Промене метаболизма угљених хидрата изазване *N. ceranae* инфекцијом доводе до појаве нутритивног и енергетског стреса (Mayack и Naug, 2010; Aliferis и сар., 2012; Vidau и сар., 2014). Енергетски стрес је такође описан код инфицираних пчела излетница које су биле гладније од неинфицираних пчела (Mayack и Naug, 2009) и конзумирале више шећера (Alaux и сар., 2010; Martín-Hernández и сар., 2011; Vidau и сар., 2011). Инфициране излетнице нису у могућности да ове веће количине шећера искористе за себе, већ тај вишак утреше патогени за завршетак свог

животног циклуса (Martín-Hernández и сар., 2018). Такође, пчеле које су прошле кроз енергетски стрес имале су већи морталитет током паше (Mayack и Naug, 2013). Дакле, механизми којима се контролише коришћење резерви енергије бивају нарушени и јавља се поремећај хомеостазе угљених хидрата у хемолимфи (Aliferis и сар., 2012). Већи захтеви пчела за шећером и његова већа конзумација представљају одговор домаћина на инфекцију микроспоридијама и директно су повезани са чињеницом да су микроспоридије као енергетски паразити директно зависне од енергије коју производе пчеле (Martín-Hernández и сар., 2018). Истраживања Vidau и сар. (2014) показала су да лезије које *N. ceranae* прави у цреву пчела током пролиферације могу умањити дигестивни капацитет пчела и довести до појаве неких од знакова гладовања пчела, као што је смањење количине протеина у хипофарингеалним секретима пчела неговатељица. Међутим, треба рећи да већа потрошња шећера није увек забележена у оваквим истраживањима (Aufrauvre и сар., 2012, 2014), што Martín-Hernández и сар. (2018) образлажу тиме да неки други, непознати фактори могу имати утицај на овај параметар. Код пчела инфицираних врстом *N. ceranae*, поред поремећаја у метаболизму угљених хидрата, Li и сар. (2018) су забележили убрзани губитак масти, показујући да и масти могу бити искоришћене као „гориво“ за потребе повећаних метаболичких захтева насталих услед наведе инфекције. Све ове промене у метаболизму доводе и до промена у понашању приликом исхране инфицираних пчела и њиховом сазревању, односно трансформацији у пчеле излетнице (Mayack и Naug, 2009). Инхибиција синтезе масних киселина, а такође и гладовање, могу довести до тога да пчеле постану излетнице пре времена (Schulz и сар., 1998; Toth и сар., 2005). Осим тога, пчеле које су доживеле енергетски стрес показале су најпре промене у својим активностима које обављају у кошници, а забележене су и промене у односу (заступљености) кућних пчела и излетница у друштву (Mayack и Naug, 2013).

Пчеле инфициране паразитом *N. ceranae* показале су и слабији капацитет летења, највероватније због мањег нивоа трехалозе (Mayack и Naug, 2010). Међутим, могуће је да су овакви поремећаји у понашању настали због саме инфекције као последица промена у регулацији високо конзервативних неуро-хормонских путева (као што је октопамински пут), као последица саме инфекције микроспоридијом *N. ceranae* и њеном самом патогеношћу, а не индиректно, услед енергетског стреса (Mayack и сар., 2015).

2. 3. 2. Оксидативни стрес и друге промене у виталним функцијама пчела

Други битни метаболички путеви важни за физиологију пчела могу такође бити поремећени инфекцијом са *N. ceranae*. На пример, у литертаури је описано да оксидативни стрес може бити последица повећане експресије гена значајних за синтезу антиоксидативних ензима и повећане активности глутатион-С-трансферазе (Dussaubat и сар., 2012; Vidau и сар., 2011), иако на присуство овог ензима за детоксификацију може утицати исхрана (Di Pasquale и сар., 2013). Овакав оксидативни одговор на инфекцију (описан како у транскриптомским, тако и у протеомским анализама) и веће енергетске потребе пчела инфицираних са *N. ceranae* доводе до негативног утицаја на развој инфицираних пчела који може изазвати и смањење њиховог животног века (Vidau и сар., 2014). McDonnell и сар. (2013) и Aufaivre и сар. (2014) у својим истраживањима наводе да стрес који се јавља код пчела инфицираних са *N. ceranae* може бити последица промена транскрипционог профила у мозгу и промене у угљоводоничном профилу кутикуле пчела које су сличне онима које изазива пчелињи крпељ *Varroa destructor* (McDonnell и сар., 2013).

Са друге стране, доказано је да *N. ceranae* инфекција спречава апоптозу епителних ћелија средњег црева пчела (Higes и сар., 2013; Martín-

Hernández и сар., 2017) како би се избегао урођени одговор домаћина на инфекцију. Такође су као пратеће реакције на инфекцију забележени и могућност инхибиције гена укључених у процес ћелијске сигнализација (*cell signalling*) и самообнављање ћелија црева (Dussaubat и сар., 2012; Huang и сар., 2016) као и повећање експресије гена значајних за инхибицију апоптозе (тзв. IAP гена - *inhibitors of apoptosis protein genes*). Како је доказано да нозема може мењати ове процесе у ћелијским културама (Del Águila и сар., 2006), управо ово може бити механизам који паразит користи за побољшање свог развоја. Заиста, доказане су разлике у експресији гена за IAP-2 (*inhibitor of apoptosis protein-2*) код *Nosema*-толерантних и *Nosema*-осетљивих пчела (Kurze и сар., 2015).

Познато је да се приликом паразитске инфекције у организму пчела поред развијања имуног одговора продукују непотпуно редуковани кисеоникови производи (*Reactive Oxygen Species* – ROS) као одговор на инфекцију (Frietas и сар. 2007; Dubovski и сар. 2008; Alaix и сар. 2011). Повећана продукција ROS може довести до оштећења ћелија и ткива, и због тога, како би одржале редокс баланс, пчеле активирају комплексан систем одбране продукујући антиоксидативне ензиме: супероксид дизмутазу – SOD, каталазу – CAT и глутатион С-трансферазу – GST. Имајући на уму да ниво антиоксидативне одбране подлеже значајним променама код организама изложеним паразитској инфекцији, одређивање активности антиоксидативних ензима служи као користан биохемијски маркер нивоа оксидативног стреса, као битног чиниоца у преживљавању појединачних пчела и јачању укупног социјалног имунитета пчелиње заједнице (Alaix и сар., 2010б; Nikolic и сар., 2015; Orcic и сар., 2017).

2. 3. 3. Утицај на имуни одговор пчела

Добро је познато да микроспоридије модификују имуни одговор својих домаћина. На пример, *Nosema bombycis* доводи до промене у експресији 34 од 70 имуно гена свилене бубе *Bombyx mori* (ревијално приказано у Szumoski и Troemel, 2015). Ови налази су од значаја с обзиром да се последњих неколико година спроводе истраживања о томе како инфекција ендопаразитом *N. ceranae* може утицати на имунитет пчела, како на индивидуалном, тако и на нивоу друштва (социјалном). Међутим, иако већина изведених истраживања доказују ефекат на индивидуални имунитет пчела, постоје и другачији, контроверзни резултати. У вези са тим, једно од првих истраживања на Европској медоносној пчели (*A. mellifera*) инфицираној са *N. ceranae*, показало је смањење експресије неких гена значајних за имунитет, као што су: абецин, хименоптецин, глукозо дехидрогеназа и вителогенин, показујући да инфекција паразитом *N. ceranae* супримира имуне механизме одбране медоносних пчела (Antúnez и сар., 2009). Каснија истраживања су такође доказала да *N. ceranae* изазива имуносупресију домаћина, односно смањење експресије гена за: дефензин, абецин, апидецин (Chaïmanee и сар., 2012), хименоптецин (Chaïmanee и сар., 2012; Aufauvre и сар., 2014), *serine protease 40*, каталаза (Aufauvre и сар., 2014). Ова смањења у експресији гена била су повезана са повишеном експресијом неких других гена значајних за имунитет, као што су: ROS и *glutathione peroxidase like 2*. Друго истраживање такође показује смањење имуних пептида (Badaoui и сар., 2017). У својим истраживањима Schwarz и Evans (2013) доказали су да инфекција *N. ceranae* изазива комплексан имунолошки одговор пчела који се мењао како је инфекција одмицала. У овом истраживању ингестија спора *N. ceranae* довела је до брзог појачавања *Toll* и *Imd* сигнализације и повећање експресије *cellular recognition molecule Dscam* и антимикуробног пептида дефензин 2 (*defensin 2*). Штавише, инфекција је изазвала разнолик и повећан имуни одговор кроз експресију гена за абецин, апидецин, хименоптецин и дефензин углавном седам дана након инфекције. У

другом истраживању Alaux и сар., (2010a) установили су да ни број хемоцита ни активност фенолоксидазе (phenoloxidase - PO) нису били значајно поремећени инфекцијом са *N. ceranae*, иако је дужина живота *Nosema*-инфицираних пчела у истраживањима Di Pasquale и сар., (2013) била повезана са активношћу фенолоксидазе. Са друге стране када је поређен имуни одговор линија трутова које су селекционисане као *Nosema*-резистентне и неселекционисане линије трутова, уочена је повишене експресије гена код инфицираних група у односу на неинфициране контроле и то од првог до петог дана након инфекције код обе линије, али је експресија гена значајних за имунитет била слабија код неселекционисаних линија трутова (Huang и сар., 2012).

Многи фактори могу имати утицај на имунолошки одговор, међу њима неки истраживачи издвајају: различите дозе инфекције, односно концентрација спора *N. ceranae* у инокулуму којим се пчеле у експерименту заражавају (што је доста варијало међу појединим истраживањима), трајање тестова (колико дана се након инфицирања прате пчеле), ткива у којима је експресија гена мерена (целе пчеле, абдомени пчела, средња црева и тд.), затим старост пчела које се уводе у експеримент али и старост пчела у тренутку инфицирања (ревијално приказано у Martín-Hernández и сар., 2018). У складу са овим, познато је да је број хемоцита знатно нижи код свих каста у друштву у раном адултном добу, као и да је активност PO специфична за пол и касте (Schmid и сар., 2008). Затим, имуни одговор матица инфицираних са *N. ceranae* разликовао се у зависности од њихове старости, а пре свега у погледу експресије гена за апидецин и вителогенин (Chaimanee и сар., 2014). Такође, кроз општу активност глутатион С трансферазе, алкалне фосфатазе и PO доказано је да квалитет и диверзитет полена који се користи у исхрани пчела има утицај на њихов имунитет (Di Pasquale и сар., 2013). Међутим, мало се зна о протективној улози имуних пептида након инфекције микроспоридијама, такође, када је реч о другим молекулима значајним за

имунитет пчела али и неке друге физиолошке функције, забележене су промене у вителогенину код пчела инфицираних са *N. ceranae*. Вителогенин има неколико улога код пчела радилица: учествује у синтези матичног млеча (Amdam и сар., 2003), јача имунитет, отпорност на стрес и дуговечност (Amdam и сар., 2004), и такође је доказано да учествује у развоју понашања, заједно са јувенилним хормоном (Robinson и Vargo, 1997; Nelson и сар., 2007). Одрасле пчеле радилице које су у ларвеном стадијуму инфициране спорама *N. ceranae* имале су значајно виши титар вителогенина и нижи титар укупних протеина хемолимфе, у односу на неинфициране контроле (BenVau и сар., 2017). Шта више, истраживања Antúnez и сар., (2013) показала су да је експресија вителогенина била повишена код пчела из друштава која су имала ниже нивое *N. ceranae* у односу на пчеле из друштава великим нивоом инфекције. Ова разлика је објашњена разликама у отпорности међу друштвима на *N. ceranae* инфекцију (Antúnez и сар., 2013). Такође, према резултатима Dussaubat и сар., (2010) *N. ceranae* мења и метаболизам етил олеата, примарног феромона који утиче на сазревање у понашању радилица, као што је спречавање преласка са послова унутар гнезда, које обављају пчеле неговатељице до излетничких послова које обављају старије пчеле (Leoncini и сар., 2004). Управо ови налази поклапају се са чињеницом да пчеле инфициране са *N. ceranae* постају излетнице пре времена. Све скупа, ове промене испољавају ефекат микроспоридија на имунитет, како индивидуалних пчела, тако и на нивоу пчелињег друштва и доводе до тога да друштва постају подложнија другим болестима и/или пестицидима (Martín-Hernández и сар. 2018).

2. 3. 4. Третман и исхрана друштава инфицираних са *N. ceranae*

За третман друштава инфицираних ноземом раније је препоручиван антибиотик фумагилин, али данас се он регуларно користи само у неким земљама, нпр. у Канади (Williams и сар., 2008; Fries 2010). Док се у земљама Европске Уније не препоручује (осим пар земаља где је његова употреба дозвољена због великих проблема које је изазвала *N. ceranae*). Наиме, примена фумагилина може представљати проблем за саме пчеле, квалитет пчелињих производа али и здравље комзумента, с обзиром на чињеницу да може оставити резидуе, због своје хидросолубилности, пре свега у меду али и другим производима пчела (Stanimirović и сар., 2007а, 2007б, Stevanović и сар., 2008).

Неколико природних супстанци показало је значајну ефикасност у борби са инфекцијом: тимол (Yücel и Dođarođlu 2005; Maistrello и сар., 2008; Costa и сар., 2010), ресвератрол (Maistrello и сар., 2008), метаболит бактерија surfaktin S2, циклични липопептид кога производи *B. subtilis* C4 (Porrini и сар., 2010) и етанолни екстракт ловора *Laurus nobilis* (Porrini и сар., 2011). Међутим, постоји читав низ различитих суплемената који се користе у пчеларству, за јачање имунитета пчела и кондиције пчелињих друштава а чији ефекат није довољно научно испитан. Такви суплементи су најчешће синтетске мешавине витамина, минерала и аминокиселина (на нашем тржишту препарат Beewell AminoPlus), или препарати на бази природних екстраката из биљака (тимол, и на нашем тржишту популаран препарат Medenko forte). Из тих разлога испитују се различите формулације додатака у исхрани, чија примена смањује могућност појаве резидуа, а који могу представљати адекватну замену за фумагилин.

Додавање суплемената у исхрани пчела је често у случајевима недовољне количине природне хране у кошници. Нажалост, последњих деценија смо сведоци великих промена и губитака појединих природних станишта, што неизбежно води смањењу како количине тако и разноврсности медоносне флоре (Goulson и сар., 2015), и последично природне паше (полена и

нектара), што је изазвало потребу за употребом адекватних додатака (суплемената) у исхрани (Stanimirović и сар., 2019) чиме се може смањити губитак друштва, јер се ублажава стрес изазван недостатком протеина (DeGrandi-Hoffman и сар., 2010). Најчешћи суплементи су на бази мешавина аминокиселина, пептида, витамина, минерала и полисахарида.

Бројна научна истраживања доказала су повољан утицај природних протеина из полена на физиолошке процесе, одгој легла, раст популације одраслих пчела и производњу матичног млеча (Crailsheim и сар., 1992; Mattila и Otis, 2006; DeGrandi-Hoffman и сар., 2008; 2010;). Ови природни протеини су од есенцијалног значаја за одржавање добре кондиције друштва кроз позитиван утицај на здравствени статус пчелињих друштва, имуни одговор пчела, отпорност на патогене и само преживљавање пчела (Alaux и сар., 2010; DeGrandi-Hoffman и сар., 2010; DeGrandi-Hoffman и сар., 2016; Di Pasquale и сар., 2013; Basualdo и сар., 2014), дуговечност радилица (Li и сар., 2014) и репродуктивни потенцијал трутова (Czekońska и сар., 2015). Природна храна богата протеинима коју пчеле праве од полена (пчелињи хлеб - перга), посебно полифлорна, представља најбољи природни извор протеина и витамина за пчеле (Brodtschneider и Crailsheim, 2010; Di Pasquale и сар., 2013; Basualdo и сар., 2014), као и плодишни мед у коме се такође налази одређена количина полена. Међутим, када овакве хране нема у довољној мери, може се искористити суплементарна прихрана друштва, кроз коју пчеле добијају какав-такав извор протеина, неопходан за нормално функционисање и преживљавање пчела.

Када је реч о вештачким протеинским суплементима (додаци у исхрани пчела са високим садржајем неполенских протеина), њихови ефекти на пчеле варирају и зависе од састава и / или формулације препарата. Само неколико истраживања бавило се овом проблематиком али резултати варирају, не само у односу на врсту суплемента, већ и у односу на дизајн

експеримента, начин прихране и здравствени статус пчела (да ли су имале инфекцију неким патогеном па онда тестирани суплементи или су праћени параметри код здравих пчела).

Оваква истраживања углавном су спроведена на територији Америке где је и сама употреба суплемената најчешћа. Три различите комерцијалне неполенске прихране тестиране су у једном од оваквих истраживања и показале су боље, сличне или лошије ефекте од поленских погача, у смислу подстицања одгоја легла и/или растра популације одраслих пчела (DeGrandi-Hoffman и сар., 2008). Протеинско-витаминска суплементација у истраживањима Рајuelо и сар. (2008) није довела до значајних разлика у развоју легла и друштва.

Међу три протеинска суплемента *FeedBee*® (суплемент који није базиран на соји), *BeePro*® (суплемент базиран на соји) и *TLS Bee Food* тестирана у поређењу са поленом, само *Feed-Bee*® је показао исте ефекте као полен, на: одгој легла, раст друштва и производњу меда, док је ефекат друга два суплемента био слабији у односу на полен (Saffari и сар., 2010) Такође, нема конзистентности у резултатима истраживања у којима је титар протеина у хемолимфи пчела узгајаних у кавезном експерименту, коришћен као параматар ефикасности протеинске исхране: De Jong и сар. (2009) доказали су да су протеински суплементи *FeedBee*® и *BeePro*® ефикаснији од природног полена; Morais и сар. (2013) у својим истраживањима нису доказали разлике у праћеним параметрима код пчела које су добијале вештачку храну богату протеинима у поређењу са пергом; DeGrandi-Hoffman и сар. (2016) такође у својим истраживањима нису доказали разлику у додатку суплемената *BeePro*® и *MegaBee*® у односу на полен уљане репице (*Brassica rapa*), док су Basualdo и сар. (2014) доказали значајно виши титар протеина у хемолимфи пчела, као и боље

преживљавање пчела храњених пергом у односу на пчеле храњене заменама.

Неконзистентност резултата је такође присутна и код испитивања ефекта протеинске исхране на ниво патогена код пчела. У истраживању Basualdo и сар (2014) веће присуство *N. ceranae* али и преживљавање је забележено код пчела које су храњене са пчелињом пергом у односу на пчеле храњене уз додатак вештачког протеинског суплемента *Virgen*®. Насупрот томе DeGrandi-Hoffman и сар. (2016) су у својим истраживањима имали већи ниво патогена (ноземе и пчелињих вируса), као и веће губитке матица и друштава у групама пчела које су храњене са додатком суплемената, посебно код група храњених са *BeePro*®. Истраживања Сirković и сар., (2018) показала су да су инапаратне вирусне инфекције присутне у друштвима и њихова преваленција не зависи у великој мери од јачине друштва.

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ РАДА

Циљ овог истраживња био је испитивање утицаја фумагилина и додатака у исхрани (тимол, Beewell AminoPlus, Medenko forte и екстракт гљиве *Agaricus blazei*) на експресију гена знаћајних за имунитет, уз праћење параметара оксидативног стреса и преживљавања пчела инфицираних микроспоридијом *N. ceranae*.

За остваривање овога циља постављени су следећи задаци:

1. Дизајн експеримента за лабораторијско гајење, заражавање и третман пчела.
2. Праћење и поређење преживљавања здравих, ноземом инфицираних и третираних пчела, ради утврђивања ефекта препарата на преживљавање пчела.
3. Испитивање и поређење нивоа експресије гена значајних за имунитет код здравих, ноземом инфицираних и третираних пчела ради утврђивања имуносупресивних/протективних ефеката препарата.
4. Испитивање и поређење параметара оксидативног стреса код здравих, ноземом инфицираних и третираних пчела ради утврђивање ефекта препарата на параметре оксидативног стреса.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4. 1. Материјал

Пчеле из здравих и јаких друштава са пчелињака Катедре за биологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду коришћене су за лабораторијски узгој и третмане током експеримента. Сва друштва која су коришћена за експеримент била су без инфекције ноземом, што је потврђено методологијом описаном од стране Stevanovic и сар. (2011) и Glavinic и сар. (2013) и била су без икаквих симптома који би упућивали на присуство вирусних болести пчела (DeGrandi-Hoffman и Chen 2015). Инфестација пчелињим крпељом *V. destructor* је одржавана на ниском нивоу у складу са добром пчеларском праксом, а друштва нису имала знакове било којих других болести, што је било обезбеђено свакодневним мониторингом пчелињака од стране лиценцираног ветеринара.

- Препарати чији ефекти су испитивани:
 - Антибиотик фумагилин у форми дициклохексиламина (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; CAS 101-83-7). Раствор за исхрану пчела направљен је у концентрацији од 26.4 mg/l, (Van den Heever 2014).
 - Тимол (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, CAS 89-83-8); Раствор за исхрану пчела је припремљен је у концентрацији од 0.1 mg/g односно 0,1 g/kg сирупа (Costa и сар., 2010).
 - Препарат „Beewell AminoPlus“ (решење 526-105, ProvetGenom, Анкара, Турска) који представља мешавину витамина, минерала, и аминокиселина (табела 1). Раствор за исхрану пчела је припремљен у складу са упутством произвођача: 1ml препарата на 1l шећерног сирупа.

Табела 1: Састав препарата Beewell AminoPlus

Compound	Qty. 1000 mg	Compound	Qty. 1000 mg	Compound	Qty. 1000 mg	Compound	Qty.
Tryptophan	2	Proline	15	Valine	5.5	Vitamin B12	1 mg,
Hydroxyproline	15	Alanine	15	Isoleucine	5.4	Vitamin B6	200 mg,
Glutamic Acid	15	Arginine	15	Threonine	3	Vitamin B2	800 mg,
Asparagine	7	Histidine	1	DLMethionine	2.5	Vitamin B1	200 mg,
Phenylalanine	1.5	Glycine	30	L-Lysine	10	Vitamin E	280 mg
Hydroxylysine	1.2	Serine	5	Vitamin K3	1.5	Vitamin D3	270.000 i.u
Tyrosine	0.6	Leucine	6	Vitamin C	3	Vitamin A	1.800.000 i.u
Ca-D-Pantothenate	1.2	Niacin	2.4				

- Дијететски суплемент, мешавина течних биљних екстраката за пчеле „Medenko forte“ који садржи: стандардизован течни екстракт (1:2) листа жалфије 10%, стандардизован течни екстракт (1:2) коре храста 10%, тинктура (1:2) хербе пелена 10% (Решење бр. 323-07-2337/14-05 Matex, Шабац, Србија). Раствор са исхрану пчела је направљен према упутству произвођача: 100ml /900ml сирупа.
- Водени екстракт гљиве *Agaricus blazei* (sin. *A. brasiliensis*) која је јестива гљива пореклом из Бразила где је популарно позната као „Sun Mushroom“ („Cogumelo do Sol“ на португалском) а „Himematsutake“ у Јапану. Коришћен је сој M7700 (*Mycelia bvba*, Nevele, Belgium) добијен по процедури Wei и Van Griensven (2008) и Stevanovic и сар. (2018).

4. 2. Методе

4. 2. 1. Излегање пчела и формирање група

Из јаких и здравих друштава узимани су рамови са затвореним пчелињим леглом (старије затворено легло - непосредно пред излегање пчела). Рамови су у веома кратком временском преиоду (што је било омогућено локацијом пчелињака који је у непосредној близини лабораторије) транспортовани до Лабораторије за генетику животиња Катедре за биологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, где је извођен наставак експеримента и све даље анализе.

Рамови са затвореним леглом су постављани у посебно направљене врећице од мрежасте тканине (слика 3), како би пчеле након излегања остале на самом раму и како се не би мешале са пчелама из других рамова.



Слика 3: Рамови са затвореним леглом постављени у врећице од мрежица
а онда у чист корпус кошнице

Са рамова су уклоњени делови саћа у којима је било меда, како евентуално коришћење овог меда за исхрану новоизлежених пчела не би имало утицај на даљи експеримент. Рамови су у поменутиим мрежицама, у вечерњим часовима, стављани у чисте дезинфиковане корпусе кишница (Слика 3) а онда у инкубатор направљен посебно за сврху узгоја пчела (Слика 4).

Рамови су остављани преко ноћи како би се излегао што већи број пчела и пчеле што мање стресирале. Следећег јутра новоизлежене пчеле су смештане у кавезе посебно дизајниране за потребе овог експеримента (Glavinic и сар., 2017) (Слика 5).



Слика 4: Инкубатор који константно одржава задате вредности температуре и влаге, са убаченим леглом (рамови у корпусу кошнице) и пчелама у експерименталним кавезима.



Слика 5: Модификација лабораторијског кавеза: Пластична тегла са малим рупама направљеним за вентилацију и пластичном решетком за судоперу, која је фиксирана у поклопац омогућавајући пчелима да узму храну из мале петријеве шоље постављене испод.

Свака експериментална група, (неинфициране – негативна контрола, пчеле инфициране спорама *N. ceranae* – позитивна контрола, пчеле храњене уз додатак тестирног препарата – третман контрола и третиране групе – пчеле инфициране спорама *N. ceranae* и третиране препаратима) формиране су са по 80 пчела радилица [по 5 реплика за анализе експресије гена, 10 за бројање спора *N. ceranae*, 5 за анализе оксидативног стреса за сва три момента узорковања (6., 9. и 15. дана, што је 60 пчела) као и додатних 20 пчела за праћење mortalитета] и за сваки од тестираних препарата (табеле 2., 3., 4., 5., и 6.) у складу са методом Williams и сар.,

(2013) препорученом од стране *International Honeybee Research Association* (COLOSS). Пчеле су гајене у инкубатору који је константно одржавао температуру од 34 ± 1 и влажност од 66 ± 1 наредних 15 дана, у складу са динамиком узорковања (табеле 2., 3., 4., 5., и 6). Пчеле су храњене *ad libitum* са шећерним сирупом (односа 50-50%), уз додатак испитиваних препарата одређеним групама.

Табела 2: Експериментални дизајн - групе пчела, периоди апликовања фумагалина, моменти заражавања и узорковања пчела.

ГРУПА	Дан почетка третирања фумагалином (дан након излегања)	Заражавање спорама <i>N. ceranae</i> (дан након излегања)	Дан узорковања (дан након излегања)		
NI	-	-	6.	9.	15.
I	-	3.	6.	9.	15.
F	1.	-	6.	9.	15.
I-F1	1.	3.	6.	9.	15.
I-F3	3.	3.	6.	9.	15.
I-F6	6.	3.	-	9.	15.

Табела 3: Експериментални дизајн - групе пчела, периоди апликовања тимола, моменти заражавања и узорковања пчела

ГРУПА	Дан почетка третирања препаратом Веелл (дан након излегања)	Заражавање спорама <i>N. ceranae</i> (дан након излегања)	Дан узорковања (дан након излегања)		
			6.	9.	15.
NI	-	-	6.	9.	15.
I	-	3.	6.	9.	15.
BW	1.	-	6.	9.	15.
I-BW1	1.	3.	6.	9.	15.
I-BW3	3.	3.	6.	9.	15.
I-BW6	6.	3.	-	9.	15.

ГРУПА	Дан почетка третирања тимолом (дан након излегања)	Заражавање спорама <i>N. ceranae</i> (дан након излегања)	Дан узорковања (дан након излегања)		
			6.	9.	15.
NI	-	-	6.	9.	15.
I	-	3.	6.	9.	15.
T	1.	-	6.	9.	15.
I-T1	1.	3.	6.	9.	15.
I-T3	3.	3.	6.	9.	15.

I-T6	6.	3.	-	9.	15.
------	----	----	---	----	-----

ГРУПА	Дан почетка третирања препаратом Medenko forte (дан након излегања)	Заражавање спорама <i>N. ceranae</i> (дан након излегања)	Дан узорковања (дан након излегања)		
			6.	9.	15.
NI	-	-	6.	9.	15.
I	-	3.	6.	9.	15.
MF	1.	-	6.	9.	15.
I-MF1	1.	3.	6.	9.	15.

Табела 4: Експериментални дизајн - групе пчела, периоди апликовања препарата Beewell AminoPlus, моменти заражавања и узорковања пчела.

I-MF3	3.	3.	6.	9.	15.
I-MF6	6.	3.	-	9.	15.

Табела 5: Експериментални дизајн - групе пчела, периоди апликовања препарата Medenko forte, моменти заражавања и узорковања пчела.

Табела 6: Експериментални дизајн - групе пчела, периоди апликовања екстракта гљиве *Agaricus blazei*, моменти заражавања и узорковања пчела.

ГРУПА	Дан почетка третирања са <i>Agaricus blazei</i> (дан након излегања)	Заражавање спорама <i>N. ceranae</i> (дан након излегања)	Дан узорковања (дан након излегања)		
			6.	9.	15.
NI	-	-	6.	9.	15.
I	-	3.	6.	9.	15.
AB	1.	-	6.	9.	15.
I-AB1	1.	3.	6.	9.	15.
I-AB3	3.	3.	6.	9.	15.
I-AB6	6.	3.	-	9.	15.

4. 2. 2. Прављење инокулума и вештачко заражавање пчела

Раствор спора је направљен мацерирањем абдомена пчела инфицираних *N. ceranae*, у дестилованој води. Присуство *N. ceranae* одсуство *N. apis* је потврђено путем PCR методе описане од стране Martín-Hernández и сар. (2007). Број спора је утврђен методом описаном од стране Cantwell (1970),

видети поглавље „Бројање спора *Nosema*“. Свеж инокулум са минимум 99% виабилности спора (тестирано са 4% trypan blue раствором) припремљен је мешањем спора са 50% раствором сахарозе до добијања финалног раствора који је имао концентрацију од 1×10^6 спора/ml. Пчеле из одговарајућих група (група које је према дизајну експеримента било неопходно заразити спорама *N. ceranae*) заражене су раствором спора (инокулумом) 3. дана након излегања пчела у складу са процедуром Fries и сар. (2013)

4. 2. 3. Узорковање пчела

Из сваке групе 6., 9. и 15. дана након излегања извршено је узорковање пчела. Приликом узорковања из сваке групе је узето по 5 пчела (реплике) за анализе експресије гена и 5 пчела за анализе параметара оксидативног стреса и 10 за анализе броја спора ноземе. Пчеле су из заједничких кавеза вађене појединачно помоћу ентомолошких пинцета насумичним бирањем, затим су краткотрајно стављане у замрзивач ради брзог анестезирања и потом даље процесуиране. Угинуле пчеле, слабе пчеле, пчеле улепљене у сируп којим су храњене или пчеле са било којом променом у изгледу и понашању искључиване су из експеримента и нису коришћене као узорак.

4. 2. 4. Утврђивање нивоа експресије гена

4. 2. 4. 1. Екстракција РНК

Појединачне пчеле узорковане из кавеза коришћене су у даљем поступку за екстракцију молекула рибонуклеинске киселине (РНК). Екстракција је рађена коришћењем комерцијалног сета *Quick-RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, USA)* и у складу са упутством произвођача. Протокол се састојао из следћих корака:

- У стерилну епрувете од 1,5 ml убацивана је по једна пчела, преливана са 600 μ l Lysis Buffer-а и добро измацерирана стерилним пластичним штапићем за мацерирање (pellet pestle). Потом је мацерат инкубиран на собној температури (20-30°C) на вортекс апарату у трајању од 5 минута.
- Лизат је пречишћен центрифуговањем на 13000 rpm у трајању од 1 минут.
- Супернатант је пребациван у *Spin-Awaytm Filter* колоницу претходно постављену у сабирну епруветицу, центрифугован 1 минут на 13000 rpm.
- У епруветицу са филтратом који је добијен центрифуговањем (исцедак) додат је 1 волумен (исто толика колочина) етанола а онда мешавина добро измешана на вортексу.
- Миксат из претходног корака је затим пребачениксат у *Zymo-Sprintm ШСГ Column* колоницу претходно постављену у сабирну епруветицу и центрифугован 30 секунди на 13000 rpm.
- Ради отклањања заосталих молекула ДНК у колоницу је додаван претходно припремљен *Dnase I reaction mix*, затим је колоница икубирана 15 минута на собној температури (20-30 °C) а затим центрифугована 30 секунди на 13000 rpm.

- У неколико наредних корака је додавањем одређених пуфера (*RNA Prep Buffer* и *RNA Wash Buffer*) и центрифуговањем колоница на 13000 rpm након додавања сваког пуфера узорак пречишћен.
- Колоница је затим пребачена у нову, стерилну и правилно обележену епрувету од 1,5 ml. У колоницу је додато 50 µl воде за елуцију (*Dnase/Rnase-Free Water*) и узорци су центрифуговани 30 секунди на 13000 rpm. Епруветице са РНК изолатом чуване су на - 70°C или одмах коришћене за реверзну транскрипцију.

4. 2. 4. 2. Реверзна транскрипција РНК

Метода реверзне транскрипције којом је од изоловане РНК синтетисана комплементарна ДНК (кДНК) вршена је према упутству произвођача сета који је коришћен [*RevertAid Reverse Transcriptase*, Thermo Scientific].

Реакциона смеша укупног волумена од 20 µl се састојала из:

- 1 µg РНК
- 5 µM насумични хексамери као прајмери (Thermo Scientific)
- 1 x RT пуфера (Thermo Scientific)
- 20 U Ribo-Lock RNase inhibitor (Thermo Scientific)
- 1 mM dNTP (Thermo Scientific)
- 200 U RevertAid reverzne transkriptaze (Thermo Scientific)

Реакциона смеша припремана је на следећи начин: РНК и прајмери су у запремини од 11 µl инкубирани 5 мин на 70°C, а затим пребацивани на лед. Док су узорци стајали на леду, у сваки је додато по 9 µl смеше која се састојала из RT пуфера Ribo-Lock RNase inhibitor, dNTP и RevertAid реверзне транскриптазе. Финална смеша је инкубирана 10 мин на 25°C, а

затим 1 сат на 42°C. Реакција је заустављена инкубирањем 10 мин на 70°C. Узорак кДНК концентрације 50 ng/ μ l је до даље употребе чуван на -20°C.

4. 2. 4. 3. Провера квалитета кДНК

Квалитет синтетисане кДНК је проверен умножавањем региона гена *Beta actin* који је конститутивно експримиран. На овај начин је индиректно потврђиван интегритет изоловане РНК која је коришћена за синтезу кДНК, као и ефикасност реверзне транскрипције. За умножавање су коришћени прајмери чије су секвенце приказане у табели 7.

Реакција запремине 25 μ l састојала се од:

- 100 ng кДНК
- 10 x PCR pufer (*KAPA Biosystems*)
- 2,5 mM MgCl₂ (*KAPA Biosystems*)
- 0.2 μ M dNTP (*KAPA Biosystems*)
- 0.5 μ M прајмера (узводни и низводни)
- 1 U *Taq* polimeraze (*KAPA Biosystems*)

Уколико је у PCR амплификацији умножен фрагмент дужине од 120 базних парова (bp), сматрало се да је кДНК одговарајућег квалитета за анализу експресије методом qRT-PCR.

4. 2. 4. 4. qReal-Time PCR анализа експресије гена значајних за

имунитет пчела.

За мерење нивоа експресије гена у узорцима коришћена је метода qRT-PCR са компаративном ddCt анализом (Livak и сар., 2001). За нормализацију синтетисане кДНК у узорцима је коришћена ендогена контрола *Beta actin*, а као калибратор је одабрана медијана нормализованих вредности за експресију гена пчела из негативне контролне групе.

Формула по којој је израчуната релативна вредност количине експресије циљног гена је:

$$Q = 2^{-ddCt}, \text{ где је } ddCt = dCt \text{ узорка} - dCt \text{ калибратора} = \\ (Ct \text{ циљног гена} - Ct \text{ ендогене контроле}) - (Ct \text{ циљног гена калибратора} \\ - Ct \text{ ендогене контроле калибратора})$$

Сви експерименти су рађени у дупликату. Уколико су се Ct вредности (циклус у којем интензитет флуоресценције прелази задати праг интензитета) за исти узорак значајно разликовале, експеримент је понављан у дупликату.

Нивои експресије гена праћени су употребом *Sybr-Green* технологије (протокол по упутству *KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, KAPA Biosystems*). Нуклеотидне секвенце прајмера наведене су у табели 7.

Табела 7. Прајмери коришћени за Real time PCR квантификацију

Назив прајмера	Секвенца 5' - 3'	Референца
----------------	------------------	-----------

Abaecin-F	CAGCATTCGCATACGTACCA	Evans (2006)
Abaecin-R	GACCAGGAAACGTTGGAAAC	
Beta actin-F	TTGTATGCCAACACTGTCCTTT	Simone и сар.
Beta actin-R	TGGCGCGATGATCTTAATTT	(2009)
ApidNT-F	TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG	Simone и сар.
ApidNT-R	GTAGGTCGAGTAGGCGGATCT	(2009)
Defensin-F	TGCGCTGCTAACTGTCTCAG	Evans (2006)
Defensin-R	AATGGCACTTAACCGAAACG	
Hymenopt-F	CTCTTCTGTGCCGTTGCATA	Evans (2006)
Hymenopt-R	GCGTCTCCTGTCATTCCATT	
VgMC-F	AGTTCCGACCGACGACGA	Simone и сар.
VgMC-R	TCCCTCCCACGGAGTCC	(2009)

Реакциона смеша укупног запремина 20 μ l састојала се од следећих компоненти у финалним концентрацијама:

- 20 ng кДНК
- 1 x *Kapa Syber Fast Universal qPCR Master Mix*
- Прајмери (200 nM узводног и низводног прајмера)

Температурни профил реакције коришћене за амплификацију био је:

1. 3 мин / 95°C
2. 45 циклуса:
 - 20 с / 95°C
 - 1 мин / 60°C
 - 30 с / 72°C

Нивои експресије наведених гена мерени су на апарату „Rotor-Gene Q 5plex“ (Qiagen, Valencia, CA)

4. 2. 5. Мерење параметара оксидативног стреса

За мерење параметара оксидативног стреса, направљени су 10% (w/v) хомогенати (мацерати) целих пчела у складу са методом описаном од стране Nikolic и сар. (2015). Целе пчеле су хомогенизоване у Tris-HCl пуферу (pH 7,4) у течном азоту помоћу авана и тучка. Груби хомогенати су центрифугирани 10 мин на 10 000 g (4°C) у центрифуги са хлађењем (High-Speed Micro Centrifuge, GZ1730R GYROZEN) и супернатанти су замрзнути на -20°C до даљих анализа. Све анализе су рађене у техничким дупликатима или трипликатима. Специфична активност ензима изражена је у јединицама активности по милиграму протеина (U/mg протеина), а концентрација малондиалдехида у nmol/mg протеина.

4. 2. 5. 1. Одређивање концентрације протеина

У припремљеним мацератима пчела (10% w/v) одређивани су протеини методом описаном у Nikolic (2017) и Buha (2015), а према Bradford (1976), која се заснива на праћењу промене апсорпционог максимума киселог раствора Komazi brilliant Blue G-250 (Брадфорд реагенс) са 465 nm на 595 nm након везивања протеина (Bradford, 1976). До промене боје долази услед хидрофобних и јонских интеракција које стабилизују анјонску форму ове боје доводећи до видљиве промене боје и промене апсорпционог максимума.

У епрувету је сипано 10 μ l узорка (мацерата 10% w/v), а затим додавано 2,5 ml Брадфорд реагенса и мешано на вортексу. Узорци су потом инкубирани 5 минута на собној температури, а затим је мерена апсорбанција на 595 nm на спектрофотометру (UV/VIS Spectrophotometer BK-S390 BIOBASE) у односу на слепу пробу (физиолошки раствор). За конструисање регресионе једначине коришћени су мерни стандардни раствори концентрација: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 и 1,5 g/l и сваки од

припремљених раствора је одмерен у количини од 10 μ l те је по додатку 2,5 ml припремљеног Брадфордовога реагенса измерена апсорбанција (A) мерних стандардних раствора. Концентрација протеина се израчунава из регресионе једначине:

$$y = 0,051 x + 0,356 (r^2 = 0,9966)$$

где је x - концентрација протеина (g/l мацерата), а y - апсорбанца (A).

4. 2. 5. 2. Одређивање активности глутатион С-трансферазе

Активност глутатион С-трансферазе (GST) је одређена са 1-хлоро-2,4-динитробензеном (CDNB) као супстратом (Hagib и сар., 1974). Метода се заснива на формирању комплекса CDNB са глутатионом, а реакцију каталише глутатион С-трансфераза. Брзина формирања комплекса се прати спектрофотометријски на 340 nm.

У епрувету је сипано 1 ml dH₂O, 300 μ l фосфатног пуфера (0.5 M, pH 6.5) 150 μ l Глутатиона (GSH) (20 mM) и 50 μ l CDNB и 25 μ l узорка, смеша је затим вортексована. У наредна 3 минута апсорбанција је читава на 340 nm сваких 30 секунди на 25°C.

Активност GST је израчунавана помоћу моларног екстинкционог коефицијента за CDNB (који износи 9.6) а изражава се интернационалним јединицама на mg протеина. Специфична јединица активности је дефинисана као број nM GSH оксидованих у минути, а израчунава се преко следеће једначине:

$$\text{Активност (U/mg прот.)} = \frac{(\Delta A_{us} - \Delta A_{sp}) * 1000}{9.6 * C_{pr} * V_{uz}/V_{rs}}$$

где је: ΔA_{uz} - промена апсорбанце у минути за узорак, ΔA_{sp} - промена апсорбанце у минути за слепу пробу, C_{pr} - концентрација протеина

mg/ml, V_{uz} - запремина узорка, V_{rs} - запремина реакционе смеше, 9.6 - моларни екстинциони коефицијент за CDNB на 340 nm.

Добијени резултати за активност SOD се изражавају у U/mg протеина.

4. 2. 5. 3. Одређивање активности укупне супероксид-дисмутазе

Активност супероксид-дисмутазе (SOD) у мацерату пчела (10% w/v) је одређивана кинетичком методом описаном у Nikolić (2017) и Buha (2015), а према Misra i Fridovich (1972), која се заснива на способности SOD да инхибира спонтану аутооксидацију адреналина у базној средини на pH=10,2. Реакциона смеша за одређивање активности укупне SOD је садржала 100 μ l узорка (као контрола је коришћен раствор карбонатног пуфера), 1,8 ml карбонатног пуфера pH=10,2 (базна компонента - Na_2CO_3 и кисела компонента - NaHCO_3) и 100 μ l адреналина (10 mmol/l раствор адреналина у 20 mmol/l HCl).

Реакција почиње додавањем адреналина у реакциону смешу. По додатку адреналина и мешања на вортексу смеша се инкубира на 25°C, током 3 минута. У наредна 3 минута апсорбанција се читава на 480 nm сваког минута на спектрофотометру (UV/VIS Spectrophotometer BK-S390 BIOBASE). Активност SOD се изражава у интернационалним јединицама (U) које се добијају мерењем апсорбанције насталог црвеног производа оксидације адреналина на 480 nm, без присуства ензима (контрола) и у присуству ензима (анализа). Релативна јединица активности SOD је дефинисана као она активност која доводи до 50% инхибиције аутооксидације адреналина под одређеним условима. Изабрана је она концентрација адреналина која ће у контроли дати промену апсорбанције у минути од 0,025 (полази се од концентрације адреналина од 10 mmol/L, а затим се он разблажује све док се не постигне $\mu\text{A}/\text{min}$ од 0,025). Изабрана је промена апсорбанције у минути од 0,025, јер је утврђено да SOD тада

постиже највиши проценат инхибиције аутооксидације адреналина (Vuha 2016).

Активност SOD у релативним јединицама се израчунава преко следеће пропорције:

$$0,0125 : 1U = [0,025 - (qA \text{ analyze}/\text{min})] : X$$

Добијени резултати за активност SOD се изражавају у U/mg протеина.

4. 2. 5. 4. Одређивање активности каталазе

Мерење каталазе (CAT) одређена је методом по Aebi (1984). Метода се заснива на спектрофотометријском праћењу разградње H₂O₂ на 240 nm. Активност CAT се прати као пад апсорбанце на датој таласној дужини.

Најпре је подешена апсорбанца слепе пробе између 0.525 и 0.550 на таласној дужини од 240 nm. У кивету је сипано 3 mL подешеног раствора H₂O₂ у Trisu и 30μl мацерата и а онда праћена промена апсорбанце на 240 nm сваких 30 секунди у току 3 минута на температури од 25 °C.

Активност каталазе је израчунавана преко следеће једначине:

$$\text{Aktivnost (U/mg prot.)} = \frac{(\Delta A_{\text{uz}} - \Delta A_{\text{sp}}) * 1000}{43.6 * C_{\text{pr}} * V_{\text{uz}}/V_{\text{rs}}}$$

где је: ΔA_{uz} - промена апсорбанце у минути за узорак, ΔA_{sp} - промена апсорбанце у минути за слепу пробу, C_{pr} - концентрација протеина mg/ml, V_{uz} - запремина узорка, V_{rs} - запремина реакционе смеше, 43.6 - моларни екстинциони коефицијент за водоник пероксид на 240 nm.

Добијени резултати за активност SOD се изражавају у U/mg протеина.

4. 2. 5. 5. Одређивање концентрације малондиалдехида

Ниво малондиалдехида (MDA) је одређиван методом заснованом на принципу да малондиалдехид, специфичан производ липидне пероксидације реагује са тиобарбитурном киселином (ТВА) и образује тиобарбитурну реагујућу супстанцу (ТВАРС). Спектрофотометријски метод се заснива на апсорпционом максимуму комплекса МДАи осталих ТВАРС са ТВА (тиобарбитурна киселина) реагенсом на 535 nm (Nikolic (2015) у складу са Girotti и сар, (1991).

У епрувету је одмеравано 0,3 ml мацерата (10% w/v) и 0,6 ml ТВА реагенса, ова мешавина је загревана 15 минута на 90 °C (Termomixer comfort, Eppendorf). Након хлађења у кадици са ледом у трајању од 5 минута, епрувете су центрифугиране на 3000 обртаја током 10 минута (Centrifuge „Hettich Zentrifugen Mikro 20“ Hettich Lab Technology). Супернатант је потом пребациван у 1,5 ml епрувете и центрифугиран 10 минута на 1000 rcf на 4°C.

Апсорбанција супернатанта је мерена на таласној дужини 535 nm спектрофотометру (UV/VIS Spectrophotometer ВК-S390 BIOBASE), а концентрација МДА је рачуната према следећој формули:

$$\text{Koncentracija} = \frac{(\Delta A_{uz} - \Delta A_{sp}) * V_{rs} * 10}{1.56 * V_{uz} * C_{pr}}$$

Где је: ΔA_{sp} - средња вредност апсорбанције слепе пробе, ΔA_{uz} - средња вредност апсорбанције узорка, V_{rs} - запремина реакционе смеше [ml], V_{uz} - запремина узорка [ml].

Добијени резултати за МДА се изражавају $\mu\text{M}/\text{mg}$ протеина хомогената.

4. 2. 6. Праћење морталитета пчела

Током читавог експеримента свакодневно су бележена угинућа пчела, како у контролним тако и у третманским групама и из кавеза су одстрањиване угинуле пчеле.

4. 2. 7. Бројање спора *Nosema*

Квантификација степена инфекције паразитима рода *Nosema* која се изражава бројем спора по пчели, обављана је према процедури коју препоручује ОИЕ (2013), по којој су абдомени 10 старијих пчела радилица мацерирани су са 5 ml воде уз помоћ авана и тучка. Када је ткиво потпуно хомогенизовано, суспензија је филтрирана кроз двослојни муслин (памучни, лабаво ткани материјал). Са додатних 5 ml воде исперани су тучак и аван и садржај такође профилтриран. Добијени филтрат је затим центрифугован 6 мин. на брзини од 800 g. Супернатант је одливан, а у епрувете је поново наливана вода до нивоа од 10 ml а затим је добијени садржај хомогенизован. Узорак добијеног хомогенисаног раствора посматран је на хемоцитометру под увећањем од 400 пута. Коришћен је Neubauer-improved хемоцитометар, метод бројања који је иницијално описао и Cantwell (1970) и по коме се споре броје у 5 несуседних квадрата од којих сваки обухвата 16 малих квадрата (0.00025 μ l по малом квадрату, односно у $5 \times 16 = 80$ малих квадрата), а једна пронађена спора еквивалент је броју од 50000 спора по пчели (Paxton и сар., 2007)

4. 2. 8. Статистичка анализа

Информације о резултатима истраживања дате су преко основних статистичких показатеља. Од показатеља централне тенденције коришћене су аритметичка средина и медијана. Варијабилитет података квантификован је преко интервала варијације, интерквартилне разлике, стандардне девијације, стандардне грешке аритметичке средине и коефицијента варијације.

Избор метода за статистичку анализу извршен је у складу са постављеним хипотезама и карактеристикама података. С обзиром на величине узорака, коефицијент варијације је коришћен као апроксимативни критеријум, за проверу претпоставке о дистрибуираности података по моделу нормалне расподеле, на којој се заснива параметријска статистика. Анализирани узорци су независни и исте величине.

Подаци о експресији гена у експерименталним групама нису били хомогени, па је за проверу хипотеза о једнакости медијана три и више група, као и у три момента жртвовања коришћен Kruskal-Wallis-ов тест, а Mann-Whitney U тест је коришћен за утврђивање значајности разлике два просека. Због велике разлике у вредностима нивоа иРНК у анализираним групама графички приказ односа између њих дат је преко полулогаритамског дијаграма.

У узорцима пчела у којима су детектоване споре микроспоридија из рода *Nosema*, њихов број је био хетероген и зато је поређење узорака извршено на основу резултата Kruskal-Wallis-овог теста и Mann-Whitney U теста.

Вредности за параметре оксидативног стреса су биле хомогене у оквиру узорака. Дискриминациона анализа је коришћена за истовремено поређење свих параметара оксидативног стреса међу различитим експерименталним групама у току истог дана жртвовања и у истој групи при различитим данима узорковања пчела. С обзиром да за све групе третираних пчела није изведен исти број жртвовања није се могао

користити двофакторски модел анализе варијансе за појединачне параметре оксидативног стреса. Зато, посебно за сваки параметар оксидативног стреса однос три и више аритметичких средина тестиран је једнофакторском анализом варијансе, а затим однос средина два узорка тестиран је Tukey-евим тестом.

У раду је коришћен и статистички метод анализа преживљавања. Динамика преживљавања у групама пчела приказана је Kaplan-Meier-овом функцијом преживљавања. Разлика у динамици преживљавања у свим групама третираним истим препаратом анализирана је на основу χ^2 статистике, а између две групе на основу Log-Rank теста.

Сви закључци су донети у односу на два стандардна нивоа значајности 0,05 и 0,01.

За статистичку анализу експерименталних резултата коришћен је пакет STATISTICA v. 12 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

5. РЕЗУЛТАТИ

5. 1. Преживљавање пчела у контролним групама

Анализом броја преживелих пчела између контролних група NI и I (графици 1-5) помоћу Long Rank теста утврђено је да је у контролној инфицираној групи I морталитет био статистички веома значајно већи ($p = 0,008$) у односу на групу NI

5. 1. 1. Преживљавање пчела третираних фумагагином

Посматрајући све групе третиране фумагагином и контролне групе истовремено (график 1), χ^2 тестом је утврђено да није било статистички значајних разлика ($\chi = 9,754$; $p = 0,083$) у броју преживелих пчела.

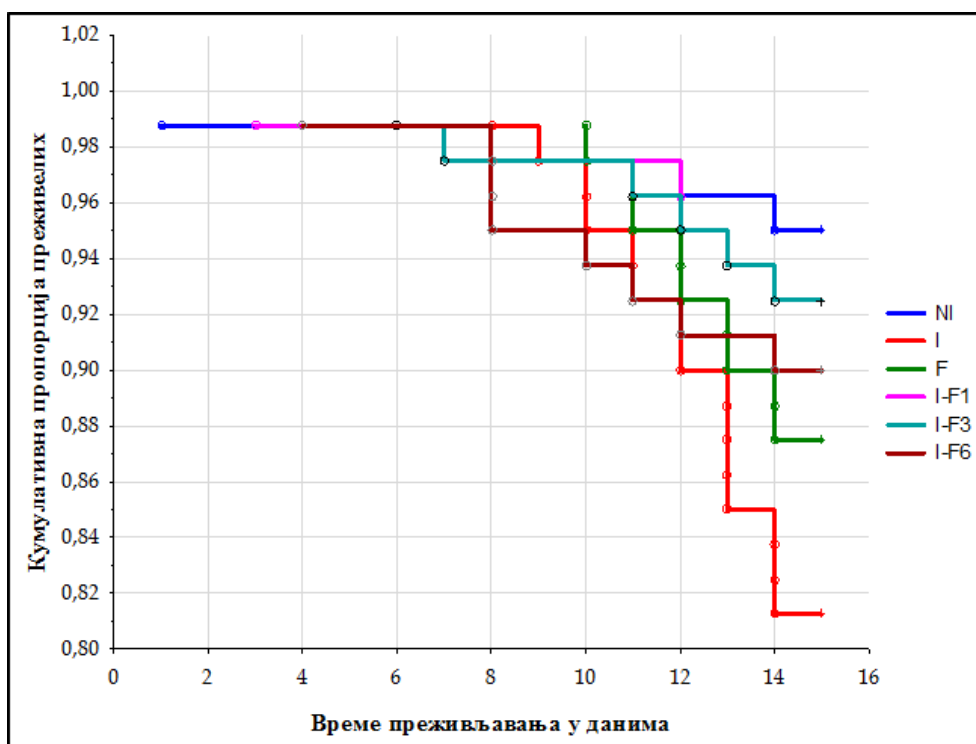


График 1: Криве преживљавања пчела из контролних група и група третираних фумагагином

Међутим, анализом броја преживелих пчела између две групе помоћу Long Rank теста утврђено је да је у групи I био статистички значајно већи морталитет у односу на групе I-F1 ($p = 0,038$) и I-F3 ($p = 0,039$), док у односу на групу F ($p = 0,275$) и I-F6 ($p = 0,137$) није било статистички значајних разлика. Такође није било статистички значајних разлика у преживљавању како између незаражене контролне групе NI и група третираних фумагилином: F ($p = 0,100$), I-F1 ($p = 0,525$), I-F3 ($p = 0,521$) и I-F6 ($p = 0,235$), тако ни између група третираних фумагилином међусобно: F/I-F1 ($p = 0,300$), F/I-F3 ($p = 0,304$), F/I-F6 ($p = 0,667$), I-F1/I-F3 ($p = 0,996$), I-F1/I-F6 ($p = 0,563$) и I-F3/I-F6 ($p = 0,569$).

5. 1. 2. Преживљавање пчела третираних тимолом

Анализирајући све групе третиране тимолом и контролне групе истовремено (график 2), χ^2 тестом утврђено је да међу било статистички значајних разлика ($\chi = 6,979$; $p = 0,222$) у броју преживелих пчела. Поређењем две групе помоћу Long Rank теста утврђено је одсуство статистички значајних разлика у броју уинулих пчела између групе I и сваке групе третиране тимолом: T ($p = 0,214$), I-T1 ($p = 0,219$), I-T3 ($p = 0,126$) и I-T6 ($p = 0,320$), као и између незаражене контролне групе NI и група третираних тимолом: T ($p = 0,150$), I-T1 ($p = 0,148$), I-T3 ($p = 0,237$) и I-T6 ($p = 0,095$), односно између група третираних тимолом међусобно: T/I-T1 ($p = 0,985$), T/I-T3 ($p = 0,780$), T/I-T6 ($p = 0,809$), I-T1/I-T3 ($p = 0,770$), I-T1/I-T6 ($p = 0,831$) и I-T3/I-T6 ($p = 0,602$).

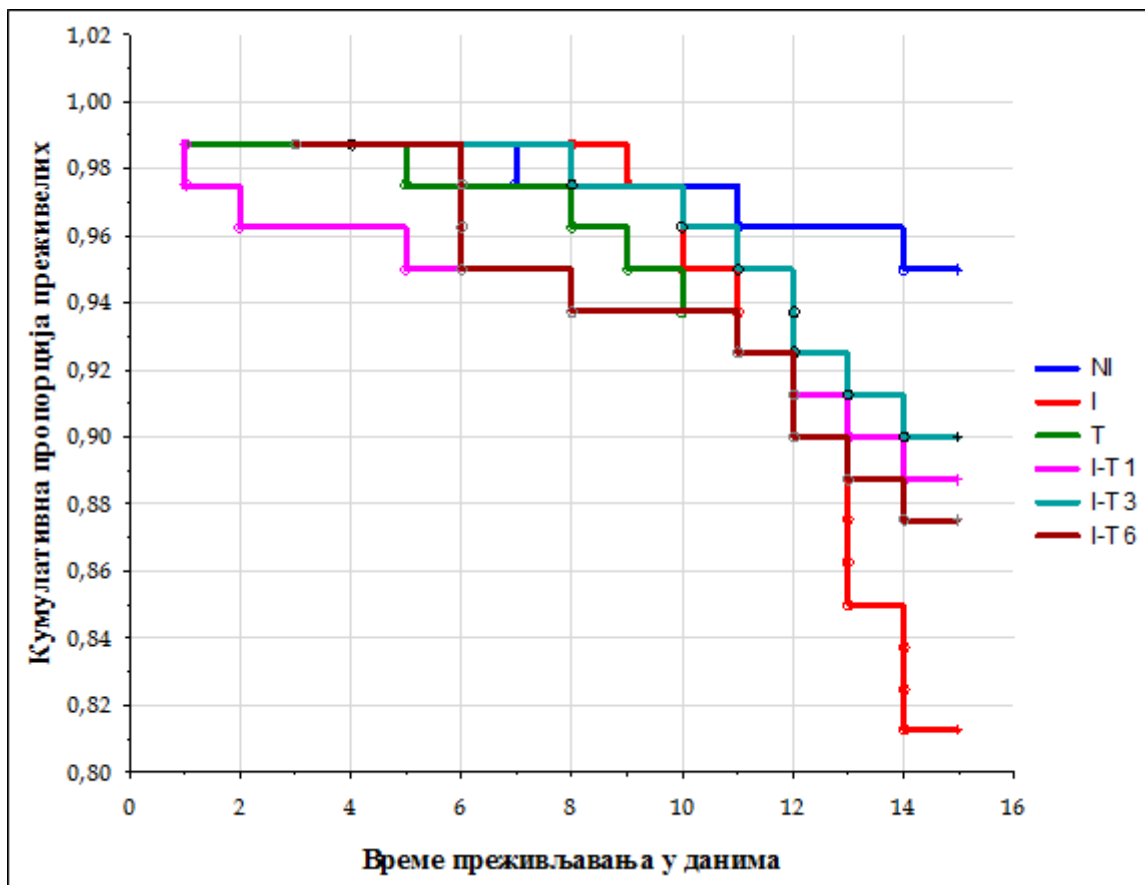


График 2: Криве преживљавања пчела из контролних група и група третираних тимоломом

5. 1. 3. Преживљавање пчела храњених уз додатак препарата Beewell AminoPlus

Анализирајући све групе храњене уз додатак препарата Beewell AminoPlus и контролне групе истовремено (график 3), χ^2 тестом утврђено је да су међу њима постојале статистички веома значајне разлике ($\chi = 16,258$; $p = 0,006$) у броју преживелих пчела. Поређењем две групе помоћу Long Rank теста утврђено је да је било статистички значајних или веома значајних разлика у броју уинулих пчела између групе I и сваке групе храњене уз додатак препарата: BW ($p = 0,008$), I-BW1 ($p = 0,016$), I-BW3 ($p = 0,007$) и I-BW6 ($p = 0,017$). Није се статистички значајно разликовало преживљавање како између незаражене контролне групе NI и група третираних

препаратом Beewell AminoPlus: BW ($p = 0,996$), I-BW1 ($p = 0,746$), I-BW3 ($p = 0,991$) и I-BW6 ($p = 0,745$), тако ни између група третираних тим препаратом међусобно: BW/I-BW1 ($p = 0,748$), BW/I-BW3 ($p = 0,991$), BW/I-BW6 ($p = 0,754$), I-BW1/I-BW3 ($p = 0,738$), I-BW1/I-BW6 ($p = 0,990$) и I-BW3/I-BW6 ($p = 0,733$).

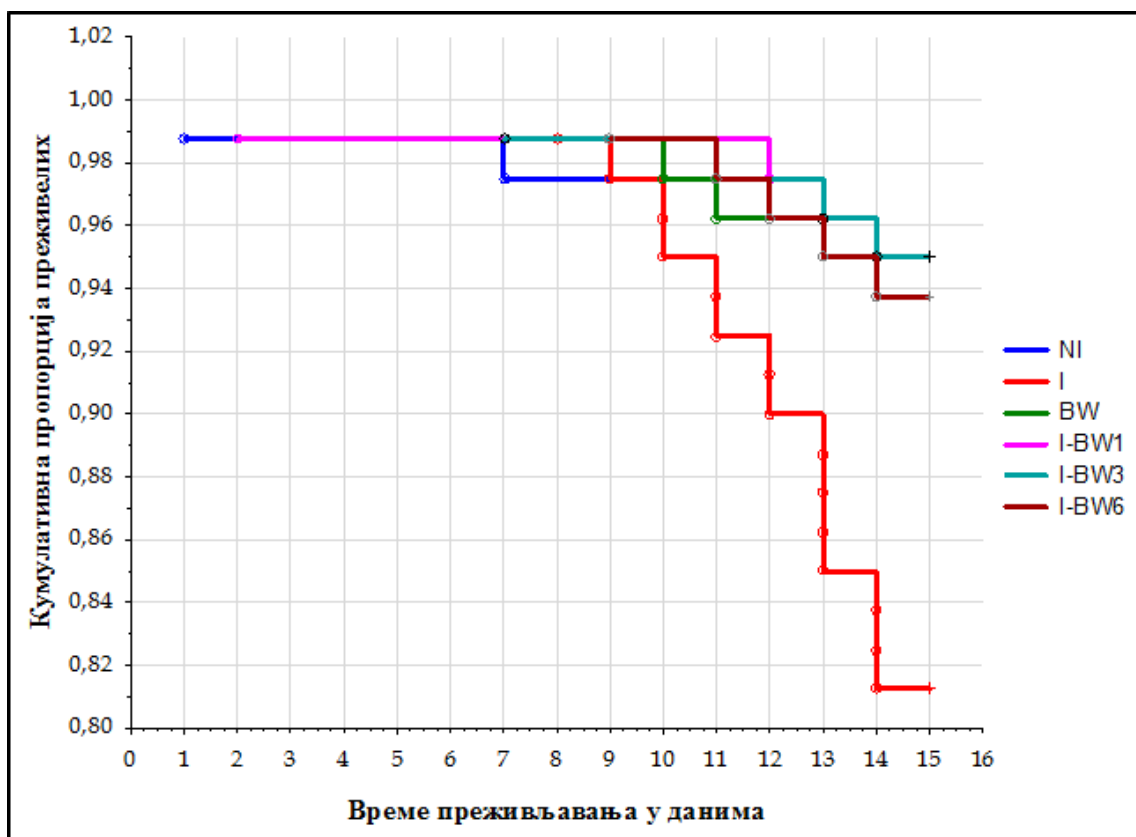


График 3: Криве преживљавања пчела из контролних група и група храњених уз додатак препарата Beewell AminoPlus

5. 1. 4. Преживљавање пчела храњених уз додатак препарата Medenko forte

Анализирајући све групе храњене уз додатак препарата Medenko forte и контролне групе истовремено (график 4), χ^2 тестом утврђено је да су међу њима постојале статистички значајне разлике ($\chi = 13,663$; $p = 0,018$) у броју преживелих пчела.

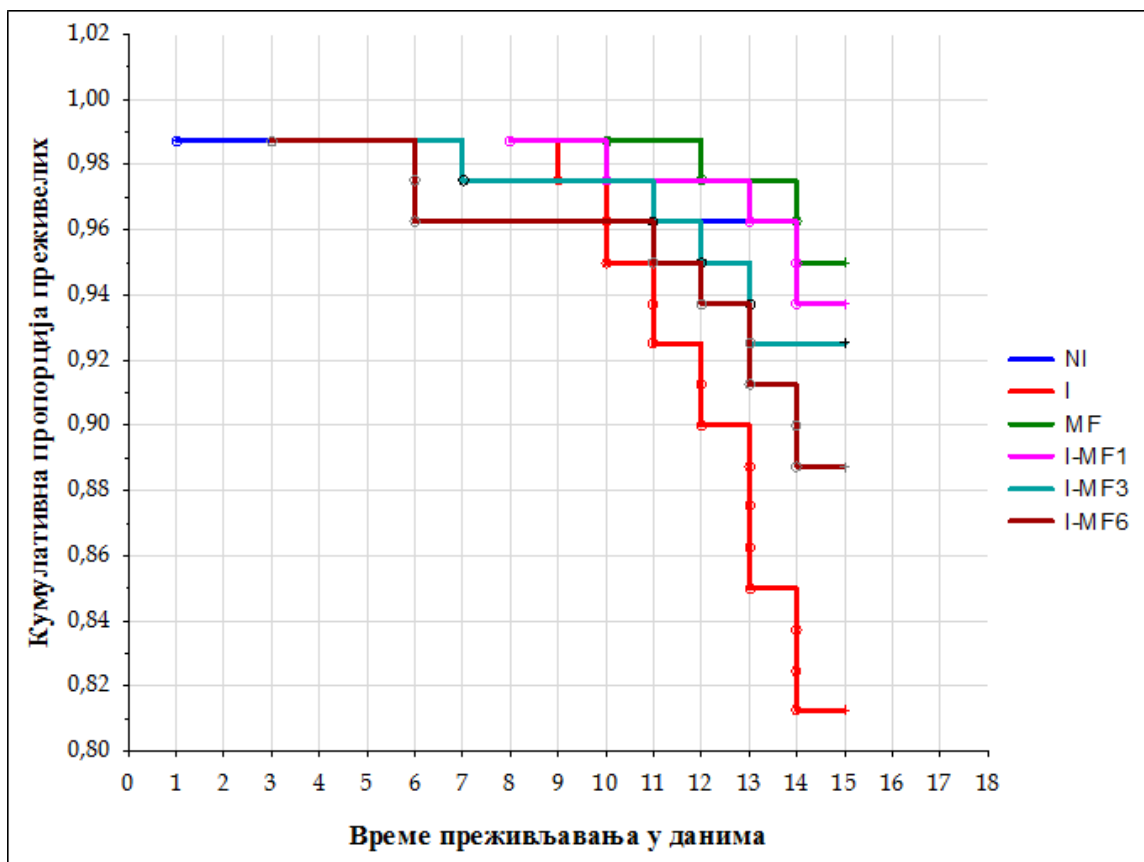


График 4: Криве преживљавања пчела из контролних група и група храњених уз додатак препарата Medenko forte

Поређењем две групе помоћу Long Rank теста утврђено је да је било статистички значајних или веома значајних разлика у броју уинулих пчела између групе I у и сваке од група храњених уз додатак препарата: MF ($p = 0,007$), I-MF1 ($p = 0,017$) и I-MF3 ($p = 0,039$), док између групе I и

групе I-MF6 није било статистички значајних разлика ($p = 0,194$). Није било статистички значајних разлика у преживљавању пчела између незаражене контролне групе NI и група третираних препаратом Medenko forte: MF ($p = 0,984$), I-MF1 ($p = 0,746$) и I-MF3 ($p = 0,521$) и I-MF6 ($p = 0,153$), али ни између група третираних овим препаратом међусобно: MF/I-MF1 ($p = 0,726$), MF/I-MF3 ($p = 0,500$), MF/I-MF6 ($p = 0,143$), I-MF1/I-MF3 ($p = 0,737$), I-MF1/I-MF6 ($p = 0,256$) и I-MF3/I-MF6 ($p = 0,424$).

5. 1. 5. Преживљавање пчела храњених уз додатак екстракта гљиве *Agaricus blazei*

Анализирајући све групе храњене уз додатак екстракта гљиве *A. blazei* и контролне групе истовремено (график 5), χ^2 тестом је утврђено да је била статистички веома значајна разлика ($\chi = 16,276$; $p = 0,006$) у преживљавању. Анализом појединачних односа две групе помоћу Long Rank теста утврђено је да је било статистички значајних или веома значајних разлика у броју уинулих пчела између групе I и група храњених уз додатак препарата: AB ($p = 0,003$), I-AB1 ($p = 0,037$) и I-AB3 ($p = 0,007$) док између групе I и групе I-AB6 није било статистички значајне разлике ($p = 0,120$). Број преживелих пчела није се статистички значајно разликовао између незаражене контролне групе NI и сваке од група храњених уз додатак екстракта гљиве *A. blazei*: AB ($p = 0,687$), I-AB1 ($p = 0,527$), I-AB3 ($p = 0,982$) и I-AB6 ($p = 0,240$), али ни између група којима је додаван екстракт међусобно: AB/I-AB1 ($p = 0,296$), AB/I-AB3 ($p = 0,701$), AB/I-AB6 ($p = 0,115$), I-AB1/I-AB3 ($p = 0,499$), I-AB1/I-AB6 ($p = 0,577$) и I-AB3/I-AB6 ($p = 0,222$).

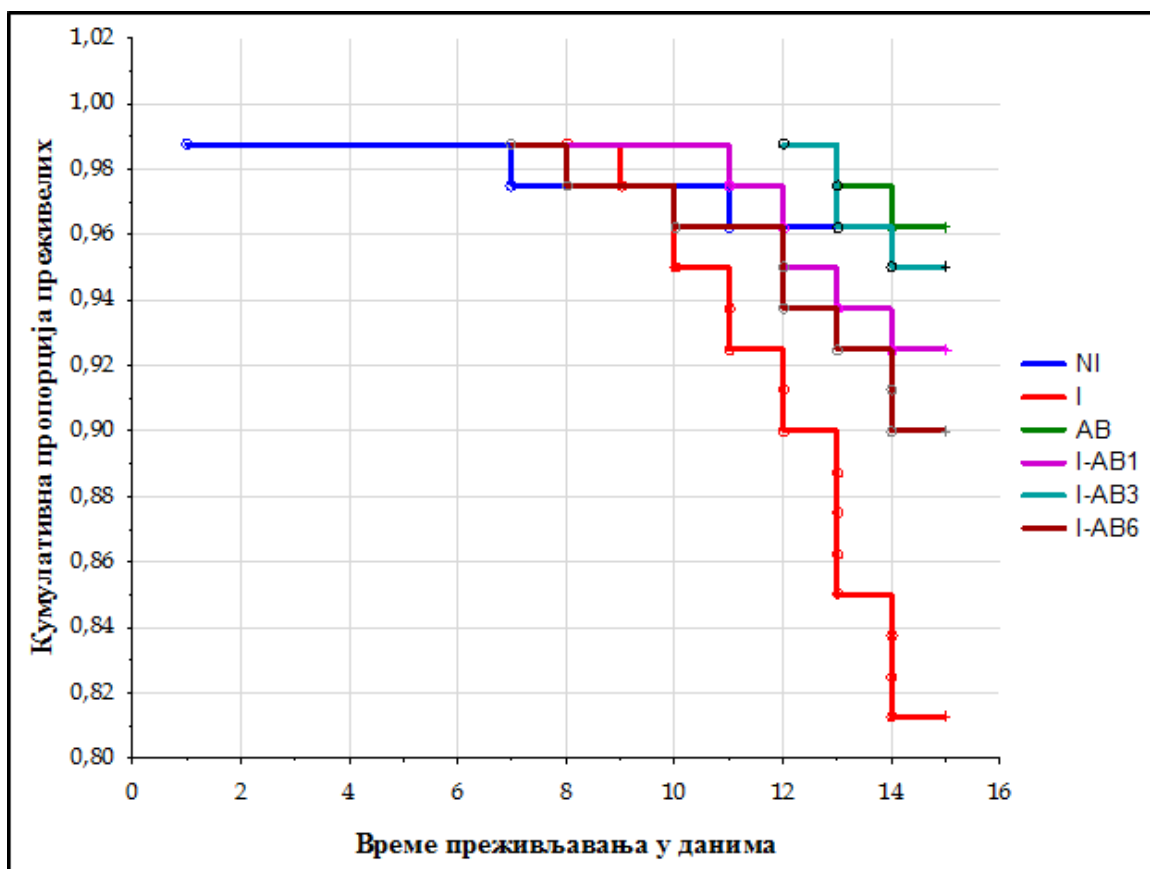


График 5: Криве преживљавања пчела из контролних група и група храњених уз додатак екстракта гљиве *A. blazei*

5. 2. Број спора код пчела инфицираних са *N. ceranae*

5. 2. 1. Број спора код пчела инфицираних са *N. ceranae* и третираних фумагагилином

Микроскопским прегледом пчела на присуство спора микроспоридија из рода *Nosema* у контролним групама и групама које су храњене уз додатак фумагагилина, није утврђено присуство спора ни у једном узорку пчела које су жртвоване 6. дана. Такође, узорци пчела из неинфицираних група (NI и F) били су негативни на присуство спора овог ендопаразита. Споре су детектоване у свим осталим прикупуљеним узорцима. Помоћу Kruskal-Wallis теста (график 6) утврђено је да је постојала статистички веома значајна разлика у броју спора између свих позитивних узорка пчела које су жртвоване 9. дана ($H = 26,658$; $p < 0,001$).

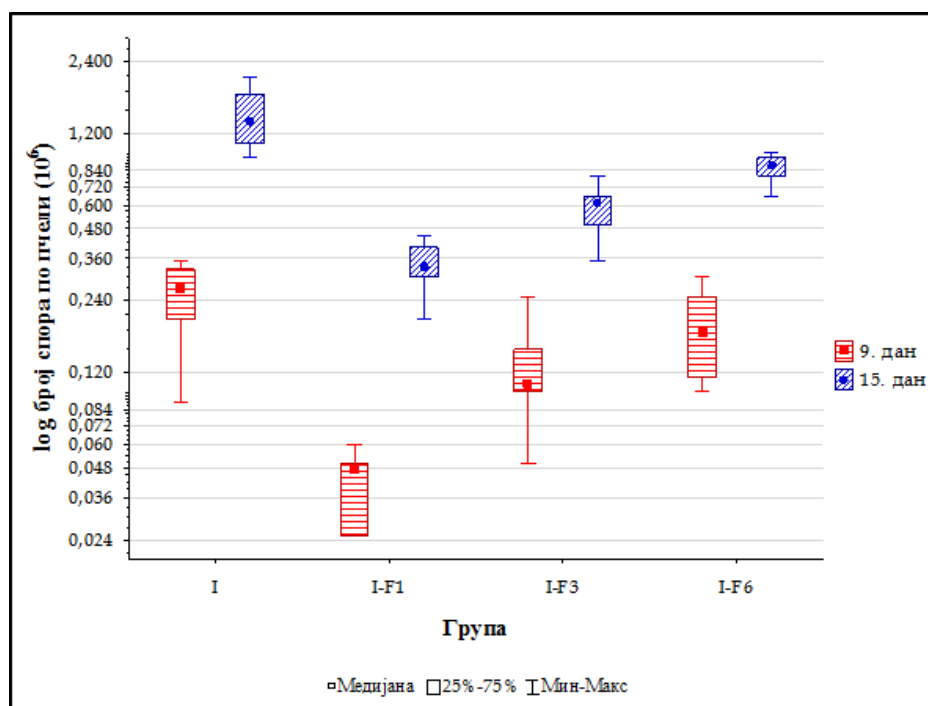


График 6: Количина спора ноземе 9. и 15. дана, у контролној групи (I) и групама које су поред инфекције спорама *N. ceranae* храњене уз додатак фумагагилина

Највећи број спора у том тренутку био је у групи I, а Mann-Whitney U тест је показао да је тај број био статистички веома значајно већи у односу на групе: I-F1 ($z = 3,765$; $p < 0,001$) и I-F3 ($z = 2,627$; $p = 0,009$) док у односу на групу I-F6 није било статистички значајне разлике ($z = 1,711$; $p = 0,087$). Најмањи број спора био је у групи I-F1 где је, осим у односу на групу I, био статистички веома значајно нижи и у односу на групе I-F3 ($z = 3,562$; $p < 0,001$) и I-F6 ($z = 3,766$; $p < 0,001$). Број спора узете у узорцима прикушљеним 15. дана статистички се веома значајно разликовао ($H = 34,702$; $p < 0,001$) према резултатима Kruskal-Wallis теста. Поређењем броја спора између две групе помоћу Mann-Whitney U теста утврђен је статистички веома значајно већи број спора у групи I у односу на све остале групе I-F1 ($z = 3,746$; $p < 0,001$), I-F3 ($z = 3,764$; $p < 0,001$) и I-F6 ($z = 3,454$; $p = 0,001$). После групе I, највећи број спора детектован је у групи I-F6, где је био статистички веома значајно већи у односу на групе I-F1 ($z = 3,747$; $p < 0,001$) и I-F3 ($z = 3,412$; $p = 0,001$), осим тога био је статистички веома значајно већи и у групи I-MF3 у односу на групу I-F1 ($z = 3,369$; $p = 0,001$).

5. 2. 2. Број спора код пчела инфицираних са *N. ceranae* и третираних

ТИМОЛОМ

Микроскопским прегледом пчела, на присуство спора микроспоридија из рода *Nosema* у контролним групама и групама које су храњене уз додатак тимола, споре нису детектоване ни уједном узорку пчела жртвованих 6. дана. Такође, узорци пчела из неинфицираних група (NI и T) били су негативни на присуство спора овог ендопаразита. Споре су детектоване у свим осталим прикушљеним узорцима (график 7). Анализом броја спора детектованих у пчелама жртвованим 9. дана помоћу Kruskal-Wallis теста утврђено је да није постојала статистички значајна разлика у броју спора између свих позитивних узорака ($H = 6,205$; $p = 1,102$).

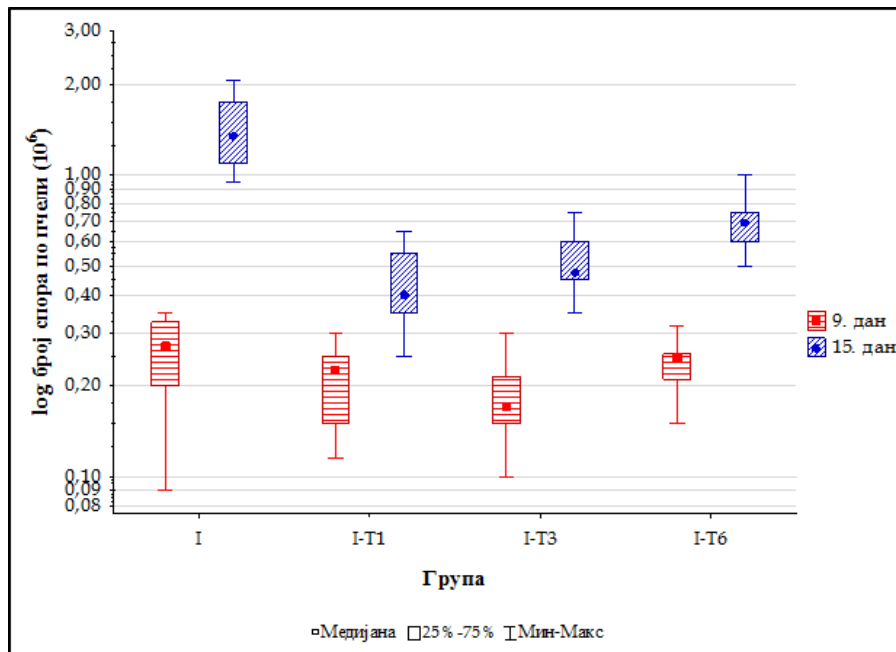


График 7: Количина спора ноземе 9. и 15. дана, у контролној групи (I) и групама које су поред инфекције спорама *N. ceranae* храњене уз додатак тимола

Међутим, према резултатима Mann-Whitney U теста, број спора у том тренутку био у статистички значајно већи у групи групи I-T6 у односу на групу I-T3 ($z = 2,205$; $p = 0,027$), док у другим поређењима група није било статистички значајне разлика ($p > 0,050$). Насупрот томе, број спора ноземе у узорцима прикупљеним 15. дана статистички се веома значајно разликовао ($H = 29,545$; $p < 0,001$) према резултатима Kruskal-Wallis теста. Поређењем две групе помоћу Mann-Whitney U теста утврђен је статистички веома значајно већи број спора у групи I у односу на све остале групе I-T1 ($z = 3,752$; $p < 0,001$), I-T3 ($z = 3,753$; $p < 0,001$) и I-T6 ($z = 3,597$; $p < 0,001$). После групе I, највећи број спора детектован је у групи I-T6 који је био статистички веома значајно већи у односу на групе I-T1 ($z = 3,263$; $p = 0,001$) и I-T3 ($z = 2,817$; $p = 0,005$).

5. 2. 3. Број спора код пчела инфицираних са *N. ceranae* и храњених уз додатак препарата **Beewell AminoPlus**

Микроскопским прегледом пчела, споре микроспоридија из рода *Nosema* нису детектоване ни у једном узорку пчела жртвованих 6. дана. Такође, узорци пчела из неинфицираних група (NI и BW) били су негативни на присуство спора овог ендопаразита. Споре су детектоване у свим осталим прикупљеним узорцима (график 8). Анализом броја спора детектованих у пчелама жртвованим 9. дана помоћу Kruskal-Wallis теста утврђено је да је постојала статистички веома значајна разлика у броју спора између свих позитивних узорака ($N = 18,968$; $p < 0,001$).

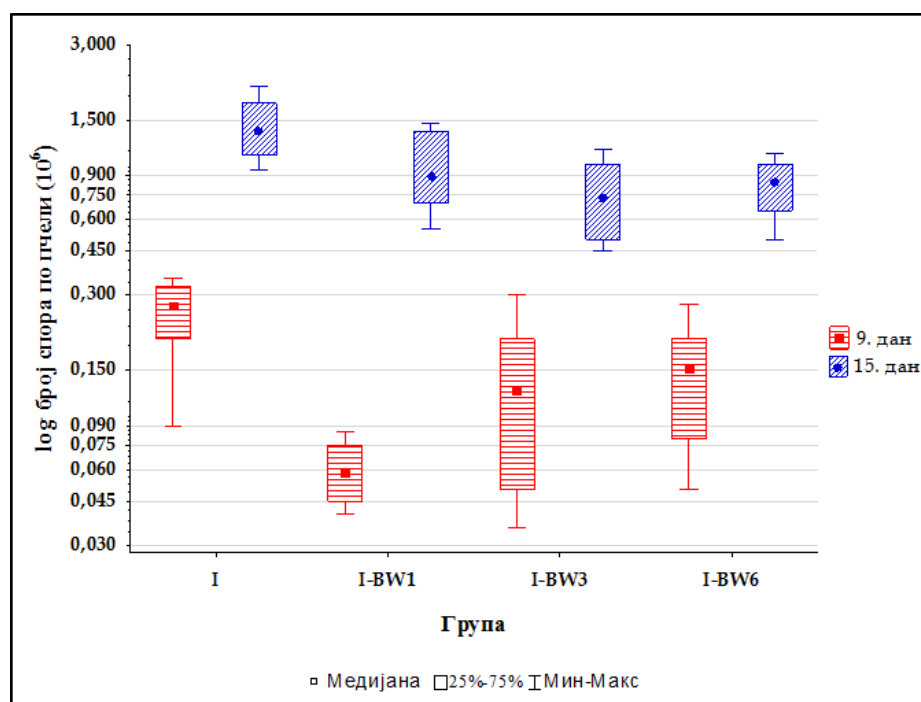


График 8: Количина спора ноземе 9. и 15. дана, у контролној групи (I) и групама које су поред инфекције спорама *N. ceranae* храњене уз додатак препарата **Beewell AminoPlus**

Највећи број спора у том тренутку био је у групи I и то, према резултатима Mann-Whitney U теста, статистички значајно или веома значајно већи у односу на све остале групе: I-BW1 ($z = 3,749$; $p < 0,001$), I-BW3 ($z = 2,510$; $p = 0,012$) и I-BW6 ($z = 3,278$; $p = 0,023$). Између група које су поред инфекције ноземом у неком тренутку у исхрани добијале препарат Beewell AminoPlus једино је у групи I-BW6 био статистички веома значајно већи број спора у односу на групу I-BW1 ($z = 2,881$; $p = 0,004$), док у са осталим групама међусобно није било статистички значајних разлика ($p > 0,050$). Број спора ноземе у узорцима прикупљеним 15. дана статистички се веома значајно разликовао ($H = 15,421$; $p = 0,0015$) према резултатима Kruskal-Wallis теста. Поређењем броја спора између појединачних група помоћу Mann-Whitney U теста утврђен је статистички значајно или веома значајно већи број спора у групи I у односу на све остале групе I-BW1 ($z = 2,197$; $p = 0,028$), I-BW3 ($z = 3,257$; $p = 0,001$) и I-BW6 ($z = 3,218$; $p = 0,001$), док се међу осталим групама није статистички значајно разликовао ($p > 0,050$).

5. 2. 4. Број спора код пчела инфицираних са *N. ceranae* и храњених уз додатак препарата Medenko forte

Микроскопским прегледом пчела, споре микроспоридија из рода *Nosema* нису детектоване ни у једном узорку пчела жртвованих 6. дана. Такође, узорци пчела из неинфицираних група (NI и MF) били су негативни на присуство спора овог ендопаразита. Споре су детектоване у свим осталим прикупљеним узорцима (график 9). Анализом броја спора детектованих у пчелама жртвованим 9. дана помоћу Kruskal-Wallis теста утврђена је статистички веома значајна разлика у броју спора између свих позитивних узорака ($H = 18,397$; $p < 0,001$). Највећи број спора у том тренутку био је у групи I и то, према резултатима Mann-Whitney U теста, статистички веома значајно већи у односу на све остале групе: I-MF1 ($z = 3,215$; $p = 0,001$), I-

MF3 ($z = 2,652$; $p = 0,008$) и I-MF6 ($z = 3,526$; $p < 0,001$). Између група које су поред инфекције ноземом у неком тренутку у исхрани добијале препарат Medenکو forte није постојала статистички значајна разлика, како између групе I-MF1 и осталих: I-MF3 ($z = 0,757$; $p = 0,449$) и I-MF6 ($z = 1,407$; $p = 0,159$), тако и између група I-MF3 и I-MF6 ($z = 1,789$; $p = 0,074$).

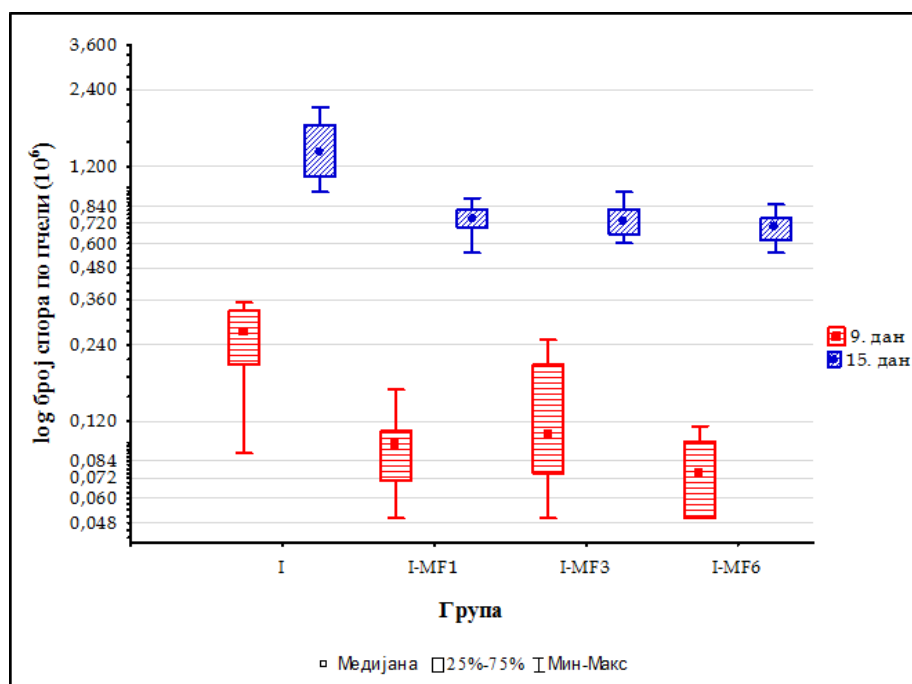


График 9: Количина спора ноземе 9. и 15. дана, у контролној групи (I) и групама које су поред инфекције спорама *N. ceranae* храњене уз додатак препарата Medenکو forte

Број спора ноземе у узорцима прикупљеним 15. дана статистички се веома значајно разликовао ($H = 22,822$; $p < 0,001$) према резултатима Kruskal-Wallis теста. Поређењем броја спора између две групе помоћу Mann-Whitney U теста утврђен је статистички веома значајно већи број спора у групи I у односу на све остале групе I-MF1 ($z = 3,746$; $p < 0,001$), I-MF3 ($z = 3,710$; $p < 0,001$) и I-MF6 ($z = 3,746$; $p < 0,001$), док се број спора није разликовао између групе I-MF1 и групе I-MF3 ($z = 0,114$; $p = 0,910$) односно

групе I-MF6 ($z = 1,098$; $p = 0,272$), али ни између групе I-MF3 и групе I-MF6 ($z = 1,064$; $p = 0,288$).

5. 2. 5. Број спора код пчела инфицираних са *N. ceranae* и храњених уз додатак екстракта гљиве *Agaricus blazei*

Микроскопским прегледом нису детектоване споре ноземе ни у једном узорку пчела жртвованих 6. дана. Такође, узорци пчела из неинфицираних група (NI и AB) били су негативни на присуство спора овог ендопаразита. Споре су детектоване у свим осталим прикупљеним узорцима (график 10). Анализом броја спора детектованих у пчелама жртвованим 9. дана помоћу Kruskal-Wallis теста утврђено је да је постојала статистички веома значајна разлика у броју спора између свих позитивних узорака ($H = 26,851$; $p < 0,001$). Највећи број спора у том тренутку био у групи I и то, према резултатима Mann-Whitney U теста, статистички веома значајно већи у односу на групе: I-AB1 ($z = 3,602$; $p < 0,001$) и I-AB3 ($z = 3,033$; $p < 0,001$). Међу групама које су поред инфекције ноземом у исхрани добијале екстракт гљиве *A. blazei* највећи број спора био је у групи I-AB6 и тај број је био статистички веома значајно већи у односу на групе I-AB1 ($z = 3,686$; $p < 0,001$) и I-AB3 ($z = 2,741$; $p = 0,006$). Такође статистички веома значајно већи број спора био је у групи I-AB3 у односу на I-AB1 ($z = 2,879$; $p = 0,004$).

Број спора ноземе у узорцима прикупљеним 15. дана статистички се веома значајно разликовао ($H = 27,304$; $p < 0,001$) према резултатима Kruskal-Wallis теста. Поређењем броја спора између две групе помоћу Mann-Whitney U теста утврђен је статистички веома значајно већи број спора у групи I у односу на све остале групе [I-AB1 ($z = 3,750$; $p < 0,001$), I-AB3 ($z = 3,714$; $p < 0,001$) и I-AB6 ($z = 2,805$; $p = 0,005$)]. Осим тога број спора је био статистички веома значајно мањи у групи I-AB1 у односу на групе I-AB3 ($z = 2,935$; $p = 0,003$) и I-AB6 ($z = 3,072$; $p = 0,002$).

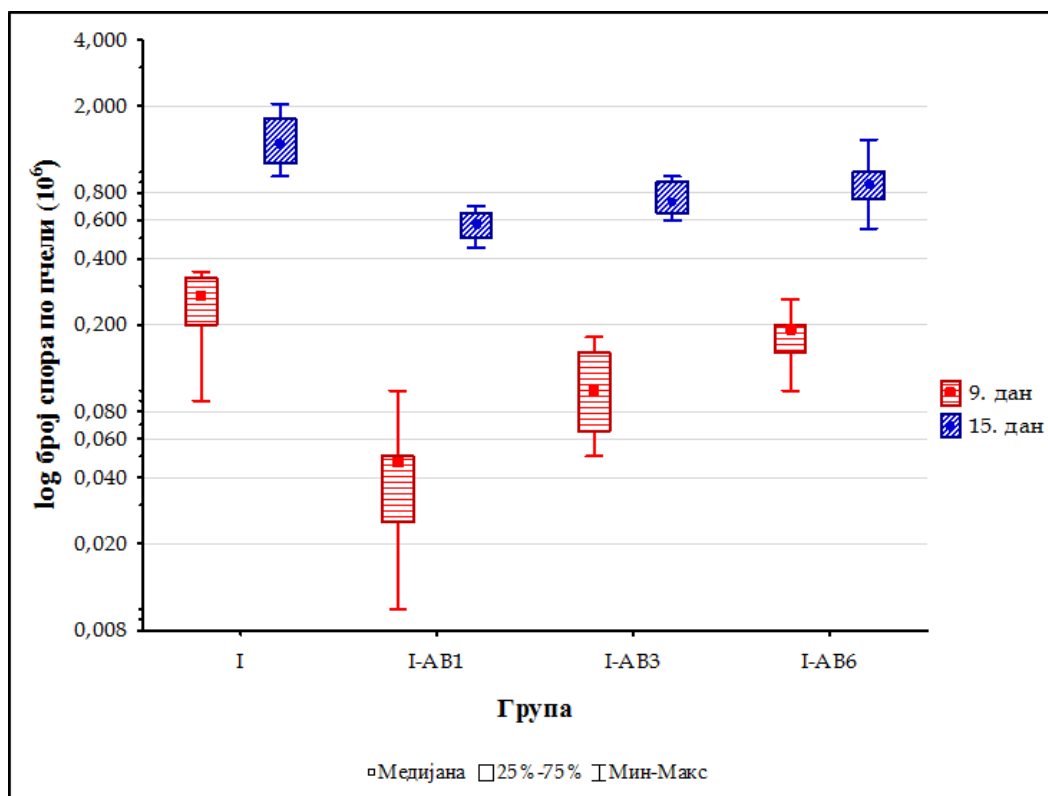


График 10: Количина спора ноземе 9. и 15. дана, у контролној групи (I) и групама које су поред инфекције спорама *N. ceranae* храњене уз додаток екстракта гљиве *A. blazei*

5. 3. Параметри оксидативног стреса

5. 3. 1. Поређење параметара оксидативног стреса код пчела храњених уз додатак фумагилина

Резултати дискриминационе анализе показали су да је разлика међу анализираним групама посматрајући сва четири параметра била статистички веома значајна (табела 8). Посматрајући истовремено сва четири параметра у између појединачних група, утврђене су статистички веома значајне разлике у свим поређењима (табела 8). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела жртвованих 6 дана након излегања статистички веома значајна разлика била у сваком посматраном параметру (табела 8). Резултати Tukey-евог теста којим је анализиран однос између две групе показали су да су активности CAT и GST биле статистички веома значајно више у групи I-F1 у односу на све остале групе али и статистички значајно или веома значајно ниже у групи F у односу на остале групе (табела 8, графици 11 и 12); активност SOD била је статистички веома значајно нижа у групама NI и F у односу на све остале групе (табела 8, график 13); концентрација MDA била је статистички веома значајно нижа у групама NI и I у односу на на групе I-F3 и I-F6 (табела 8, график 14).

Табела 8. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних група пчела узоркованих 6. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				DA ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	≈ 1,000	0,254	< 0,001	0,910	102,951	< 0,001	
NI/F	0,024	< 0,001	< 0,001	0,047	47,346	< 0,001	
NI/I-F1	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	247,651	< 0,001	
NI/I-F3	0,268	< 0,001	< 0,001	< 0,001	62,844	< 0,001	
I/F	0,022	< 0,001	< 0,001	0,171	157,602	< 0,001	
I/I-F1	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,002	339,522	< 0,001	
I/I-F3	0,289	0,002	< 0,001	< 0,001	63,825	< 0,001	
F/I-F1	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,058	495,559	< 0,001	
F/I-F3	0,001	< 0,001	< 0,001	0,006	174,883	< 0,001	
I-F1/I-F3	0,001	< 0,001	≈ 1,000	0,571	125,566	< 0,001	
ANOVA	F	41,431	238,268	190,696	24,436	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
DA ¹	F	67,328				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Дискриминационом анализом је утврђено да су међу анализираним групама пчела жртвованим 9. дана, посматрајући сва четири параметра истовремено разлике била статистички веома значајне (табела 9). Посматрајући истовремено сва четири параметра између две групе разлика је била статистички веома значајна у свим поређењима (табела 9). На основу анализе варијансе код узорака пчела жртвованих 9. дана сви посматрани параметри су се статистички веома значајна разликовали (табела 9).

Резултати Tukey-евог теста којим је анализиран однос између две групе показали су да су активности CAT, GST и SOD биле статистички значајно или веома значајно ниже у групи F у односу на све остале групе; активност SOD била је статистички веома значајно нижа и у групи NI у односу на остале групе (табела 9, графици 11., 12. и 13); концентрација MDA била је

статистички веома значајно виша у групи I-F1 у односу на све остале групе (табела 9, график 14).

Табела 9. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних група пчела узоркованих 9. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				DA ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	0,016	0,444	< 0,001	0,339	119,448	< 0,001	
NI/F	0,031	< 0,001	< 0,001	0,011	36,050	< 0,001	
NI/I-F1	0,107	0,923	< 0,001	< 0,001	196,516	< 0,001	
NI/I-F3	< 0,001	< 0,001	< 0,001	≈ 1,000	423,033	< 0,001	
NI/I-F6	0,001	< 0,001	< 0,001	0,998	68,705	< 0,001	
I/F	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,330	256,065	< 0,001	
I/I-F1	0,853	0,113	0,002	< 0,001	47,485	< 0,001	
I/I-F3	0,028	< 0,001	< 0,001	0,309	99,681	< 0,001	
I/I-F6	0,259	< 0,001	< 0,001	0,183	30,135	< 0,001	
F/I-F1	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	301,348	< 0,001	
F/I-F3	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,0098	672,390	< 0,001	
F/I-F6	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,005	198,730	< 0,001	
I-F1/I-F3	0,004	< 0,001	< 0,001	< 0,001	161,015	< 0,001	
I-F1/I-F6	0,042	< 0,001	< 0,001	< 0,001	115,158	< 0,001	
I-F3/I-F6	0,732	0,996	< 0,001	0,999	174,372	< 0,001	
ANOVA	F	35,173	77,271	668,122	83,144	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
DA ¹	F	57,904				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Резултати дискриминационе анализе показали су да је разлика међу анализираним групама пчела узоркованим 15. дана, посматрајући сва четири параметра истовремено била статистички веома значајна (табела 10). Посматрајући истовремено сва четири параметра између две групе разлика је била статистички веома значајна у свим поређењима (табела 10). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела

жртвованих 15. дана статистички веома значајна разлика била у свим посматраним параметрима (табела 10). Активности САТ према резултатима Tukey-евог теста је била статистички значајно или веома значајно виша у групама I-F3 и I-F6 у односу на остале групе (табела 10, график 11); активност GST била је статистички веома значајно виша у групи I-F6 у односу на све остале групе, али и статистички веома значајно нижа у у групама F и I-F1 у односу на остале групе (табела 10, график 12); активност SOD била је статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе, али и статистички веома значајно нижа у групама NI и F у односу на све остале групе (табела 10 график 13); концентрацији MDA била је статистички значајно или веома значајно виша у групи I-F1 у односу на F, I-F3 и I-F6 (табела 10, график 14).

Табела 10. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних пчела узоркованих 15. дана

Групе	р - нивои значајности разлика				DA ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	0,147	0,005	< 0,001	0,950	777,822	< 0,001	
NI/F	0,045	< 0,001	< 0,001	0,901	14,593	0,001	
NI/I-F1	0,116	< 0,001	< 0,001	0,109	536,234	< 0,001	
NI/I-F3	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,946	305,154	< 0,001	
NI/I-F6	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,611	297,043	< 0,001	
I/F	0,975	< 0,001	< 0,001	0,455	887,433	< 0,001	
I/I-F1	≈ 1,000	< 0,001	< 0,001	0,383	57,611	< 0,001	
I/I-F3	0,011	0,197	< 0,001	0,538	137,852	< 0,001	
I/I-F6	0,001	< 0,001	< 0,001	0,210	278,754	< 0,001	
F/I-F1	0,991	0,999	< 0,001	0,020	594,025	< 0,001	
F/I-F3	0,038	< 0,001	< 0,001	≈ 1,000	388,166	< 0,001	
F/I-F6	0,002	< 0,001	< 0,001	0,991	400,335	< 0,001	
I-F1/I-F3	0,014	< 0,001	0,012	0,026	107,696	< 0,001	
I-F1/I-F6	0,001	< 0,001	0,003	0,008	275,751	< 0,001	
I-F3/I-F6	0,472	< 0,001	0,966	0,974	39,514	< 0,001	
Све групе	ANOVA	F	20,388	187,594	556,331	5,374	< 0,001
		p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,008	

¹Дискриминациона анализа

Дискриминациона анализа показала је статистички значајну или веома значајну разлику између различитих дана жртвовања за све параметре посматране истовремено у контролној неинфицираној (NI) и инфицираној (I) групи (табела 11). Такође, по свим параметрима посматраним истовремено два жртвовања међусобно су се статистички значајно или врло значајно разликовала у ове две групе (табела 11). Однос просечних вредности појединачних параметара (нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрацији MDA) између различитих дана жртвовања (6, 9. и 15) није показао правилност у ове две групе појединачно (табела 11, графици 11., 12., 13. и 14).

Табела 11. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA у различитим данима жртвовања по групама

Групе	Поређење	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
		CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI	6/9. дан	0,144	0,001	0,009	0,064	12,017	0,034	
	6/15. дан	0,001	0,009	0,001	0,431	30,443	0,009	
	9/15. дан	< 0,001	0,016	0,154	0,340	28,341	0,010	
	ANOVA	F	51,772	37,908	24,059	4,118	-	-
		p	< 0,001	< 0,001	0,001	0,075	-	-
	ДА	F	20,634				-	-
p		< 0,001				-	-	
I	6/9. дан	0,123	0,002	0,209	0,345	59,928	0,003	
	6/15. дан	0,725	0,003	< 0,001	0,705	360,434	< 0,001	
	9/15. дан	0,046	0,929	< 0,001	0,770	180,467	0,001	
	ANOVA	F	5,337	24,372	138,404	1,166	-	-
		p	0,047	0,001	< 0,001	0,373	-	-
	ДА ¹	F	98,840				-	-
p		< 0,001				-	-	

Дискриминациона анализа показала је статистички значајну или веома значајну разлику између различитих дана жртвовања за све параметре посматране истовремено (табела 12). Такође, по свим параметрима посматраним истовремено, два жртвовања међусобно су се статистички значајно или врло значајно разликовала у свим групама осим односа 9. и 15. дана у групи F (табела 12). Однос просечних вредности појединачних параметара (нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрацији MDA) између различитих дана жртвовања (6, 9. и 15) није показао правилност у групама појединачно (табела 12, графици 11., 12., 13. и 14).

Табела 12. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA у различитим данима жртвовања по групама

Групе	Поређење	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
		CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
F	6/9. дан	0,024	0,003	0,015	0,033	37,378	0,007	
	6/15. дан	0,006	0,032	0,001	0,002	54,719	0,004	
	9/15. дан	0,434	0,106	0,065	0,067	4,356	0,128	
	ANOVA	F	13,584	17,575	24,772	19,611	-	-
		p	0,006	0,003	0,001	0,002	-	-
	ДА	F	13,731				-	-
p		0,003				-	-	
I-F1	6/9. дан	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,037	2013,762	< 0,001	
	6/15. дан	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,002	6114,164	< 0,001	
	9/15. дан	< 0,001	< 0,001	0,901	< 0,001	1126,978	< 0,001	
	ANOVA	F	427,599	600,080	72,186	51,091	-	-
		p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
	ДА ¹	F	288,21				-	-
p		< 0,001				-	-	
I-F3	6/9. дан	0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	1420,540	< 0,001	
	6/15. дан	0,990	0,063	< 0,001	< 0,001	337,286	< 0,001	
	9/15. дан	0,001	0,004	< 0,001	0,474	414,323	< 0,001	
	ANOVA	F	48,269	35,642	697,808	300,666	-	-
		p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
	ДА	F	194,85				-	-
p		< 0,001				-	-	
I-F6	9/15. дан ²	0,194	0,007	< 0,001	0,957	136,90	0,064	

¹ Резултати дискриминационе анализе

² Резултати t-теста

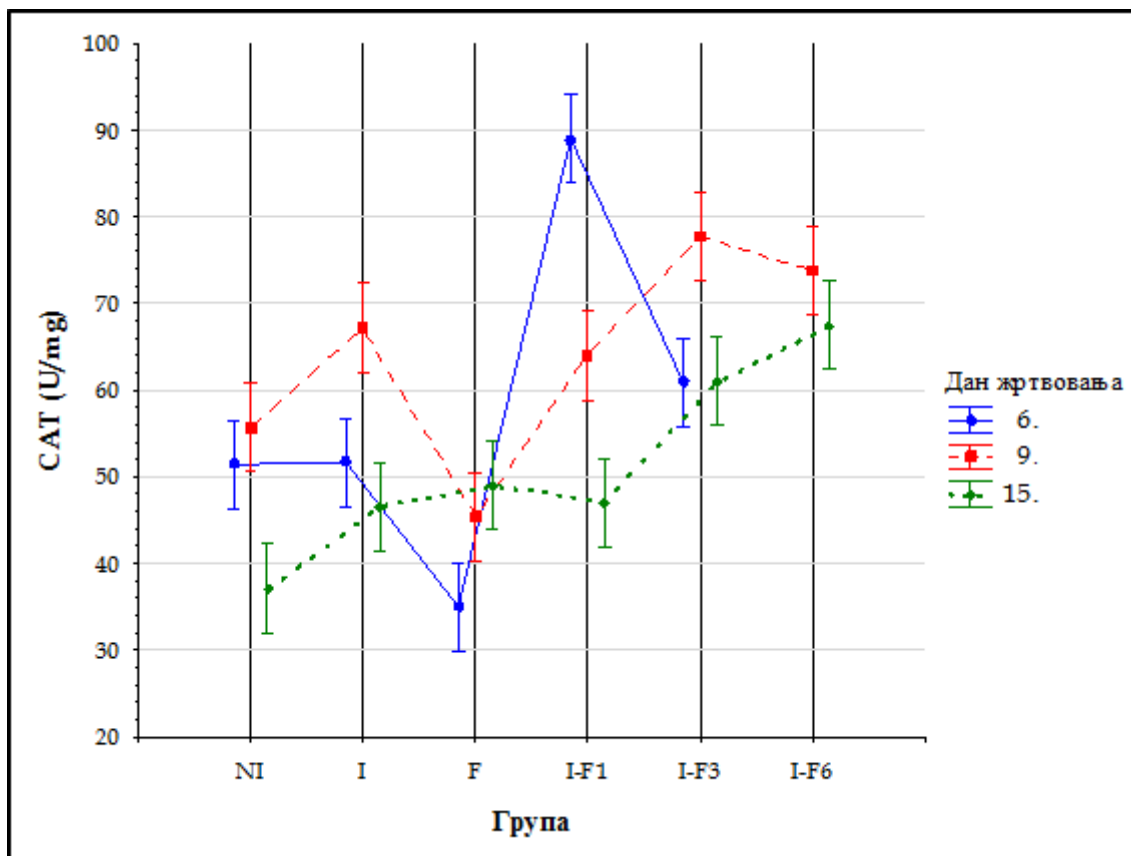


График 11: Нивои активности САТ у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

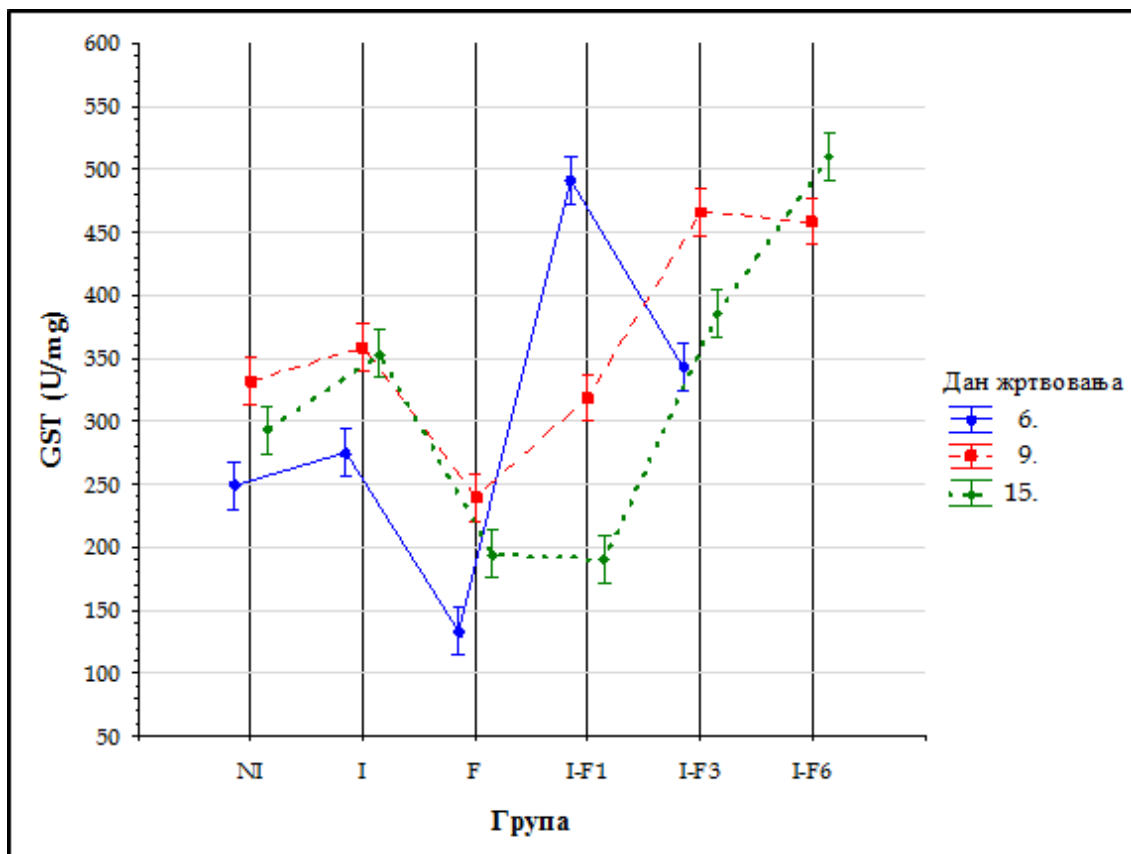


График 12: Нивои активности GST у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

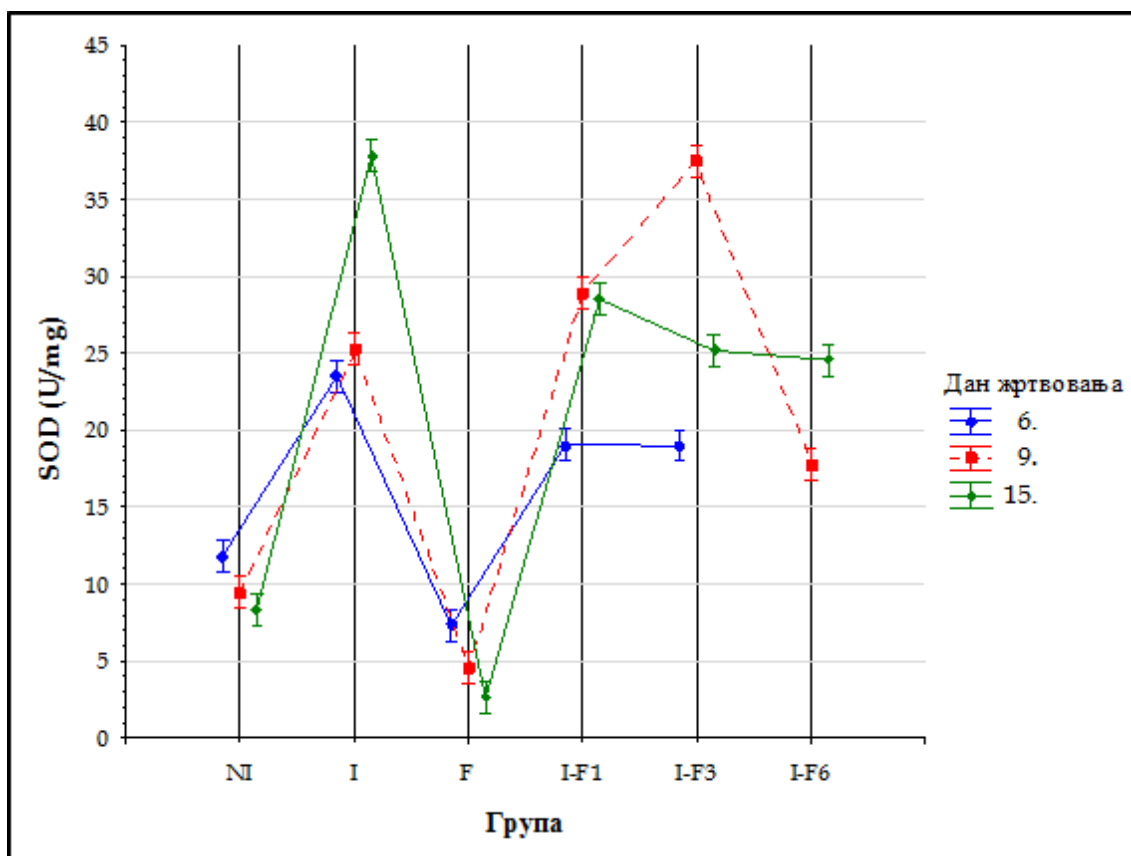


График 13: Нивои активности SOD у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

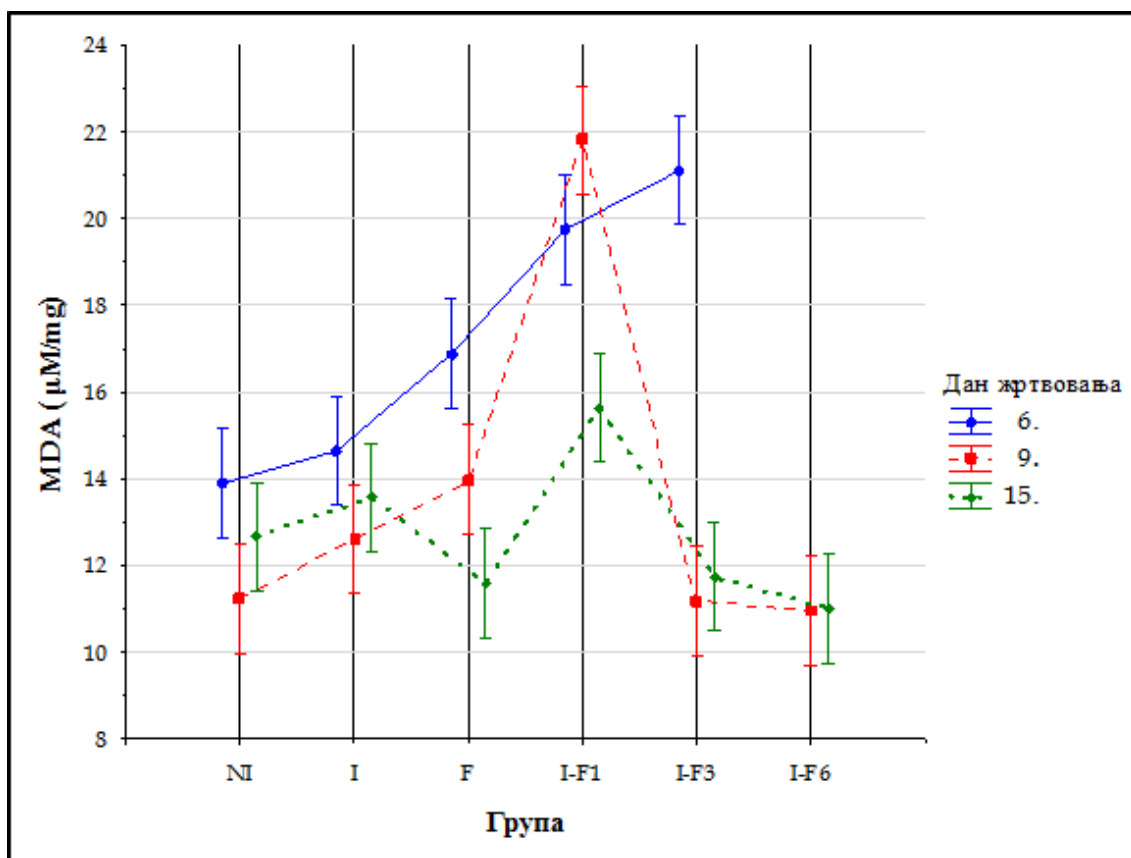


График 14: Концентрација MDA у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

5. 3. 2. Поређење параметара оксидативног стреса код пчела храњених уз додатак тимола

Резултати дискриминационе анализе показали су да је разлика међу анализираним групама посматрајући сва четири параметра била статистички веома значајна (табела 13). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била статистички веома значајна у свим односима (табела 13). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела жртвованих 6 дана након излегања статистички веома значајна разлика била у сваком посматраном параметру (табела 13). Резултати Tukey-евог теста којим је анализиран однос између две групе показали су да је активности CAT била статистички веома значајно нижа у групи T у односу на све остале групе (табела 13, график 15); активност GST била статистички веома значајно виша у групи I-T3 у односу на све остале групе али и статистички веома значајно нижа у групи T у односу на остале групе (табела 13, график 16); активност SOD била је статистички веома значајно нижа у групи T у односу на све остале групе али и статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе (табела 13, график 17); концентрација MDA била је статистички значајно или веома значајно виша у групи T у односу на групе NI, I-T1 и I-T3 (табела 1 график 18).

Табела 13. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних пчела узоркованих 6. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	≈ 1,000	0,088	< 0,001	0,929	64,384	< 0,001	
NI/T	0,007	< 0,001	0,001	0,022	195,709	< 0,001	
NI/I-T1	0,756	0,034	< 0,001	0,728	27,852	< 0,001	
NI/I-T3	0,192	< 0,001	< 0,001	0,789	233,700	< 0,001	
I/T	0,006	< 0,001	< 0,001	0,076	319,856	< 0,001	
I/I-T1	0,780	0,971	< 0,001	0,318	20,310	0,001	
I/I-T3	0,205	< 0,001	< 0,001	0,369	229,337	< 0,001	
T/I-T1	0,001	< 0,001	< 0,001	0,004	331,438	< 0,001	
T/I-T3	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,004	854,418	< 0,001	
I-T1/I-T3	0,747	< 0,001	≈ 1,000	≈ 1,000	143,767	< 0,001	
ANOVA	F	14,116	229,703	150,459	8,493	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,003	-	-
ДА ¹	F	47,887				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Разлика међу анализираним групама пчела жртвованим 9. дана, посматрајући сва четири параметра истовремено према резултати дискриминационе анализе била је статистички веома значајна (табела 14). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била је статистички веома значајна у свим односима (табела 1). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорка пчела жртвованих 9. дана статистички веома значајна разлика била у свим посматраним параметрима (табела 14). Резултати Tukey-евог теста којим је анализиран однос између две групе показали су да је активност CAT (график 15) била статистички значајно или веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе; активност GST (график 16) била је статистички веома значајно виша у групама I и NI у односу на све остале групе, али и статистички веома значајно нижа у групама T и I-T1 у односу на све остале групе; активност SOD била је статистички веома значајно нижа у групи T у односу на све остале групе, али и статистички веома

значајно виша у групама I, I-T1 и I-T3 у односу на остале групе (табела 14, график 17); концентрација MDA била је статистички веома значајно виша у групама T и I у односу на групе I-T1, I-T3 и I-T6, али и у групи T у односу на групу NI (табела 14, график 18).

Табела 14. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између пчела узоркованих 9. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	0,009	0,220	< 0,001	0,294	58,935	< 0,001	
NI/T	< 0,001	< 0,001	0,004	0,003	48,599	< 0,001	
NI/I-T1	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	50,020	< 0,001	
NI/I-T3	0,971	0,002	< 0,001	0,330	24,857	< 0,001	
NI/I-T6	0,020	0,002	≈ 1,000	0,003	13,502	0,001	
I/T	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,109	187,613	< 0,001	
I/I-T1	< 0,001	< 0,001	0,901	< 0,001	87,584	< 0,001	
I/I-T3	0,003	< 0,001	0,098	0,009	27,583	< 0,001	
I/I-T6	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	101,289	< 0,001	
T/I-T1	0,031	0,994	< 0,001	< 0,001	89,641	< 0,001	
T/I-T3	< 0,001	0,004	< 0,001	< 0,001	97,483	< 0,001	
T/I-T6	0,060	0,003	0,003	< 0,001	36,753	< 0,001	
I-T1/I-T3	< 0,001	0,008	0,018	0,042	23,526	< 0,001	
I-T1/I-T6	< 0,001	0,008	< 0,001	0,996	29,077	< 0,001	
I-T3/I-T6	0,072	≈ 1,000	< 0,001	0,094	31,667	< 0,001	
ANOVA	F	59,008	53,334	100,927	35,297	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
ДА ¹	F	44,725				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Резултати дискриминационе анализе показали су да је разлика међу анализираним групама пчела узоркованим 15. дана, посматрајући сва четири параметра истовремено била статистички веома значајна (табела 15). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била статистички значајна или веома значајна у свим односима (табела 15). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела жртвованих 15. дана статистички значајна или веома

значајна разлика била у свим посматраним параметрима (табела 15). Активности САТ према резултатима Tukey-евог теста је била статистички значајно нижа у групи I-T1 у односу на групе I и I-T6 (табела 1, график 15); активност GST била је статистички веома значајно нижа у групама T и I-T1 у односу на све остале групе, али и статистички веома значајно нижа у групи T у односу на I-T1, док је у групи I била статистички веома значајно виша у односу на групе NI, I-T1 и I-T6 (табела 15, график 16); активност SOD била је статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе, али и статистички значајно или веома значајно нижа у групама NI и T у односу на све остале групе (табела 15, график 17); концентрацији MDA била је статистички веома значајно нижа у групи I-T1 у односу на групе NI, I и T (табела 15, график 18).

Табела 15. Резултати поређења просечних нивоа активности САТ, GST, SOD и концентрацији MDA између пчела узоркованих 15. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (САТ, GST, SOD и MDA)		
	САТ	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	0,211	< 0,001	< 0,001	0,941	154,175	< 0,001	
NI/T	0,564	< 0,001	0,116	0,992	22,118	0,001	
NI/I-T1	0,666	0,020	0,018	0,001	59,925	< 0,001	
NI/I-T3	0,673	0,001	< 0,001	0,132	18,235	< 0,001	
NI/I-T6	0,169	0,559	< 0,001	0,172	12,431	0,001	
I/T	0,967	< 0,001	< 0,001	0,693	206,485	< 0,001	
I/I-T1	0,018	< 0,001	< 0,001	< 0,001	255,375	< 0,001	
I/I-T3	0,921	0,288	< 0,001	0,030	86,764	< 0,001	
I/I-T6	≈ 1,000	0,001	< 0,001	0,040	86,167	< 0,001	
T/I-T1	0,066	< 0,001	< 0,001	0,003	61,262	< 0,001	
T/I-T3	≈ 1,000	< 0,001	< 0,001	0,305	62,777	< 0,001	
T/I-T6	0,934	< 0,001	< 0,001	0,382	40,716	< 0,001	
I-T1/I-T3	0,090	< 0,001	0,019	0,128	69,073	< 0,001	
I-T1/I-T6	0,014	0,001	0,212	0,097	67,866	< 0,001	
I-T3/I-T6	0,868	0,014	0,686	≈ 1,000	3,690	0,048	
ANOVA	F	5,051	93,217	175,197	11,061	-	-
	p	0,010	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
ДА ¹	F	48,307				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Дискриминациона анализа показала је статистички значајну или веома значајну разлику између различитих дана жртвовања за све параметре посматране истовремено (табела 16). Такође, по свим параметрима посматраним истовремено два жртвовања међусобно су се значајно или врло значајно разликовала у свим групама осим односа 6/9. као и 9/15. дана у групи Т (табела 16). Однос просечних вредности појединачних параметара (нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрацији MDA) између различитих дана жртвовања (6, 9. и 15) није показао правилност у групама појединачно (табела 16, графици 15., 16., 17. и 18).

Табела 16. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA у различитим данима жртвовања по групама

Групе	Поређење	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
		CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
Т	6/9. дан	0,165	0,001	0,093	0,036	10,911	0,039	
	6/15. дан	0,024	0,001	0,473	0,003	8,512	0,055	
	9/15. дан	0,332	0,876	0,432	0,116	2,040	0,292	
	ANOVA	F	6,836	35,466	3,308	16,591	-	-
		p	0,028	< 0,001	0,108	0,004	-	-
	ДА	F	5,116				-	-
p		0,031				-	-	
I-T1	6/9. дан	0,001	< 0,001	0,005	< 0,001	28,136	0,010	
	6/15. дан	0,002	0,079	0,049	< 0,001	47,385	0,005	
	9/15. дан	0,605	0,002	0,001	0,448	14,306	0,027	
	ANOVA	F	32,194	43,732	34,829	71,661	-	-
		p	0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
	ДА ¹	F	23,209				-	-
p		< 0,001				-	-	
I-T3	6/9. дан	0,001	< 0,001	0,035	0,006	7490,877	< 0,001	
	6/15. дан	< 0,001	< 0,001	0,998	0,006	1303,013	< 0,001	
	9/15. дан	0,001	< 0,001	0,033	≈ 1,000	2697,706	< 0,001	
	ANOVA	F	101,252	652,948	7,696	16,396	-	-
		p	< 0,001	< 0,001	0,022	< 0,001	-	-
	ДА	F	794,36				-	-
p		< 0,001				-	-	
I-T6	9/15. дан ²	0,391	0,013	0,004	0,010	1729,291	0,018	

¹ Резултати дискриминационе анализе, ² Резултати t-теста

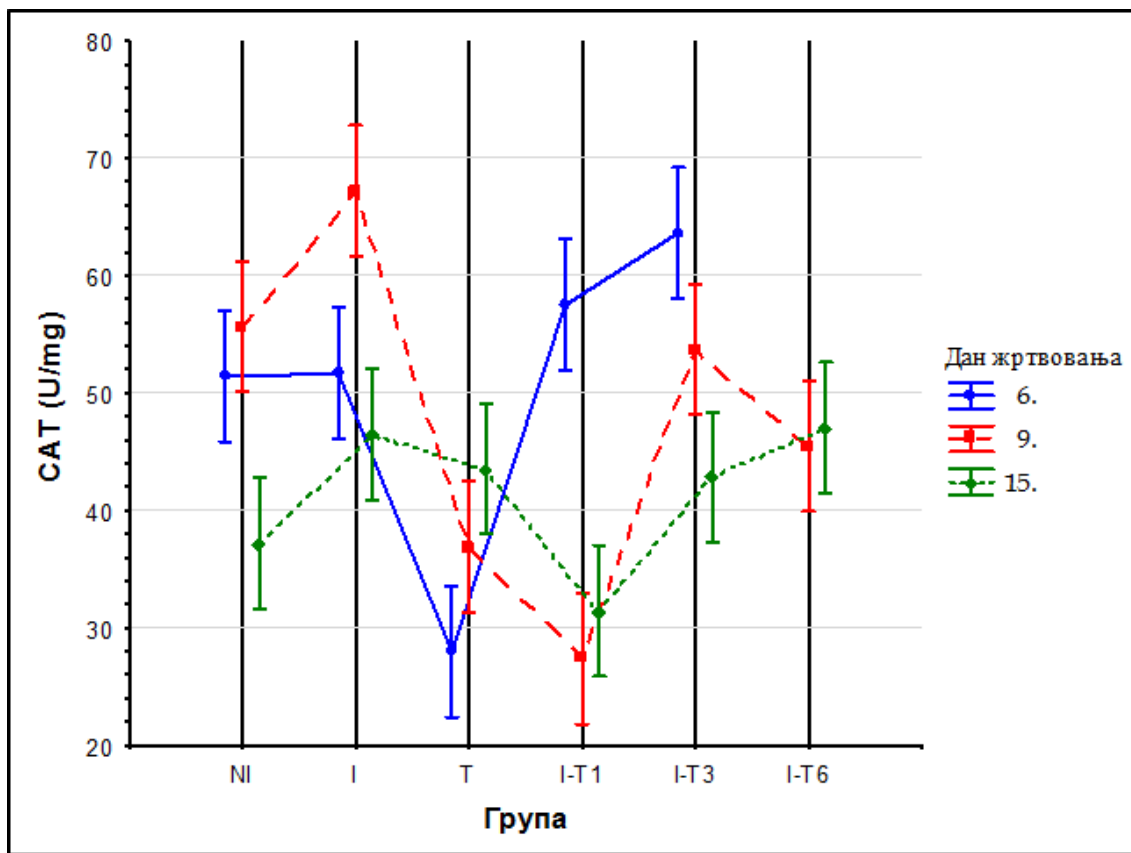


График 15: нивои активности САТ у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

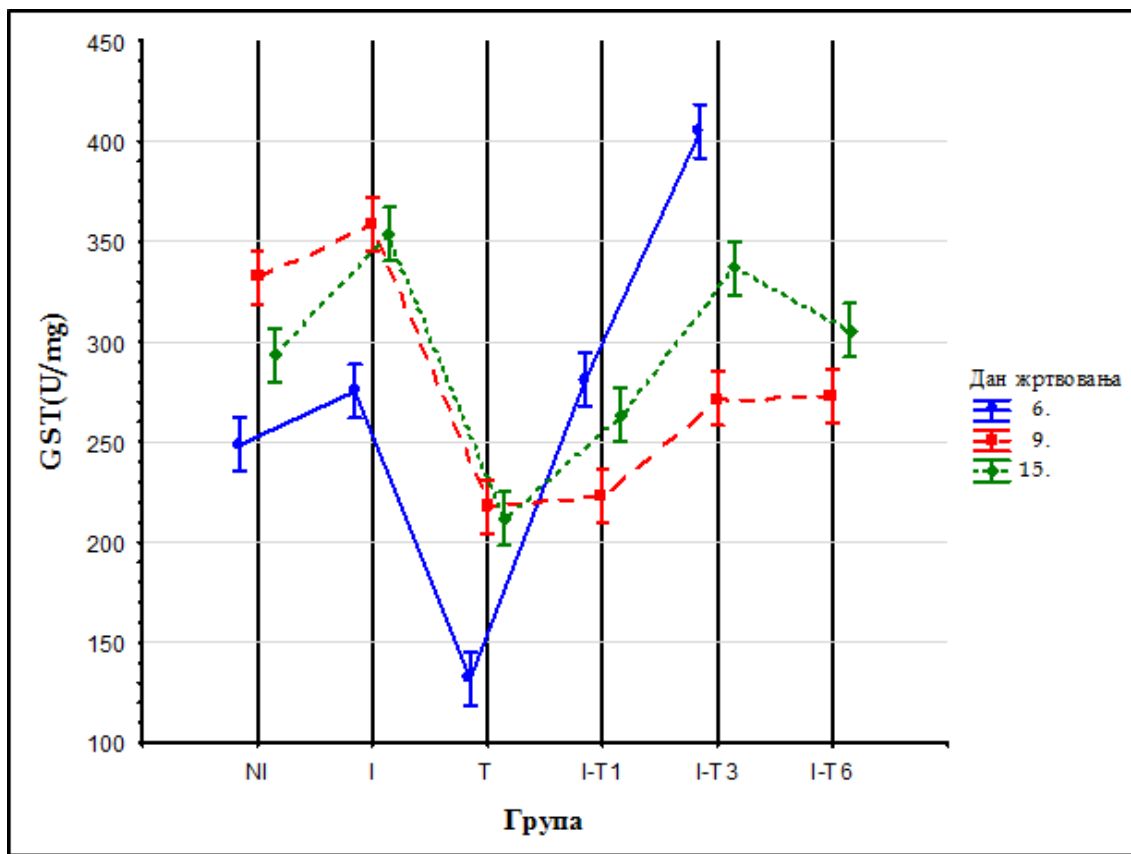


График 16: Нивои активности GST у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

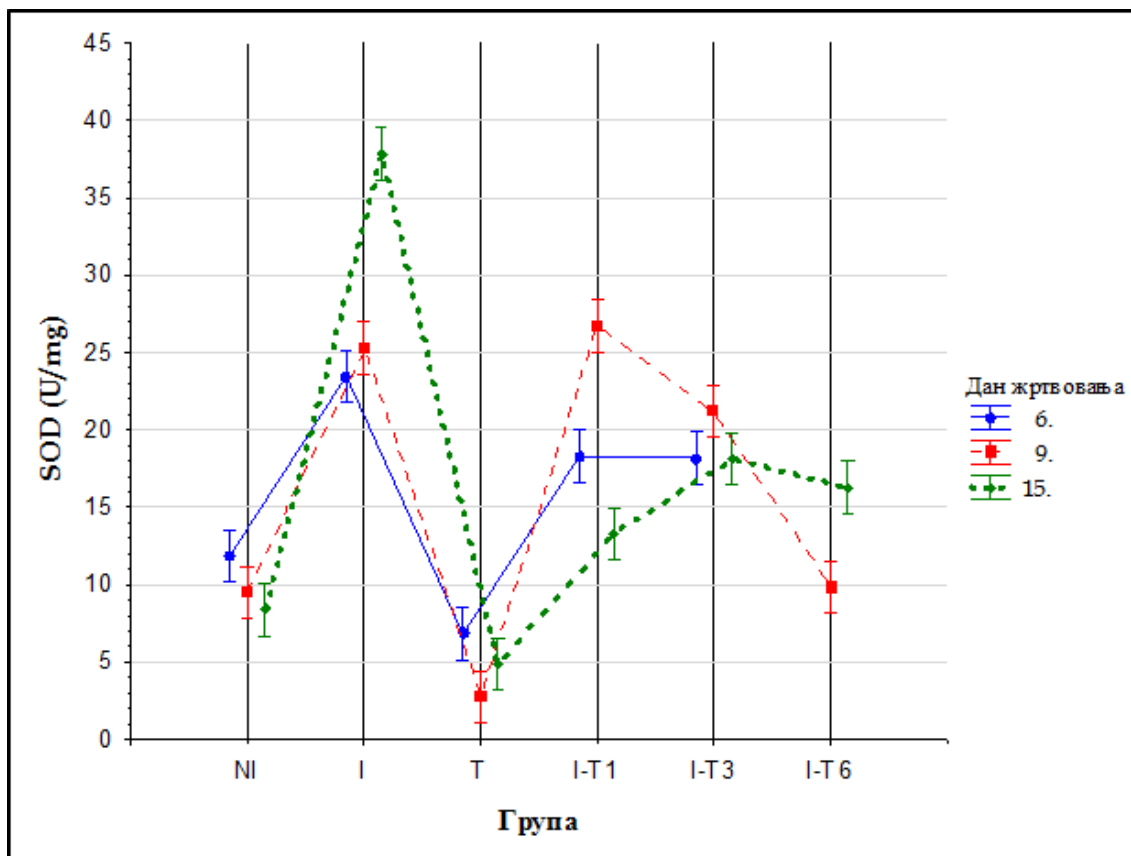


График 17: Нивои активности SOD у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

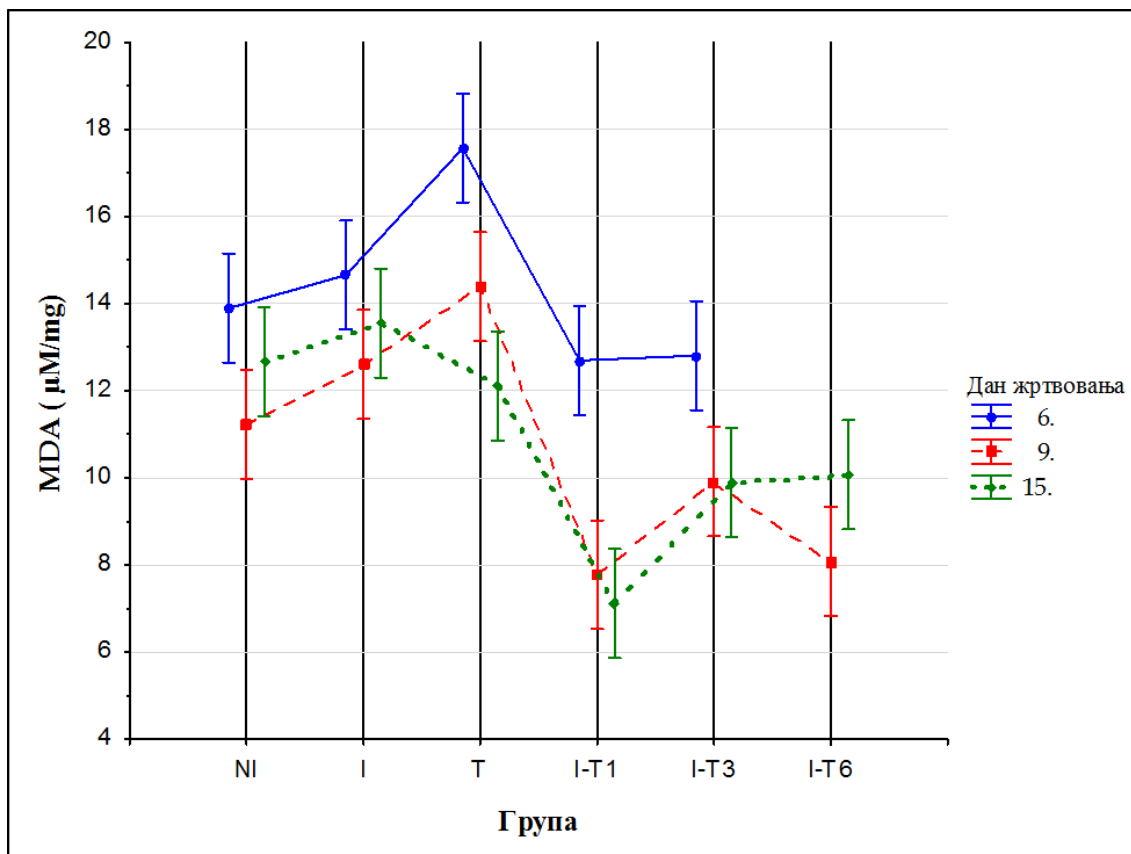


График 18: Концентрација MDA у различитим данима жртовања по свим експерименталним групама

5. 3. 3. Поређење параметара оксидативног стреса код пчела храњених уз додатак препарата Beewell AminoPlus

Резултати дискриминационе анализе показали су да је разлика међу анализираним групама посматрајући сва четири параметра била статистички веома значајна (табела 17). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била статистички веома значајна у свим односима (табела 17). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела жртвованих 6 дана након излегања статистички веома значајна разлика била у сваком посматраном параметру (табела 17). Резултати Tukey-евог теста којим је анализиран однос између две групе показали су да је активности CAT била статистички веома значајно виша у групама I-BW1 и I-BW3 у односу на групе I и NI (табела 17, график 19); активност GST била статистички веома значајно нижа у групи I-BW3 у односу групе I, NI и I-BW1 али и статистички веома значајно нижа у групи BW у односу на групе I и NI (табела 17, график 20); активност SOD била је статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе (табела 17, график 21); концентрација MDA била је статистички веома значајно виша у групи I-BW3 и I-BW6 у односу на остале групе (табела 17, график 22).

Табела 17. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних група пчела узоркованих 6. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	≈ 1,000	0,278	< 0,001	0,887	49,788	< 0,001	
NI/BW	0,105	0,032	0,057	0,186	14,456	0,002	
NI/I-BW1	0,002	0,995	0,215	< 0,001	32,917	< 0,001	
NI/I-BW3	0,002	< 0,001	0,004	< 0,001	68,402	< 0,001	
I/BW	0,097	0,002	< 0,001	0,578	84,958	< 0,001	
I/I-BW1	0,002	0,164	< 0,001	< 0,001	118,129	< 0,001	
I/I-BW3	0,002	< 0,001	0,001	< 0,001	151,215	< 0,001	
BW/I-BW1	0,113	0,058	0,002	< 0,001	24,464	< 0,001	
BW/I-BW3	0,153	0,028	0,408	< 0,001	32,932	< 0,001	
I-BW1/I-BW3	≈ 1,000	< 0,001	< 0,001	0,868	18,059	0,001	
ANOVA	F	15,105	26,782	57,853	45,429	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,003	-	-
ДА ¹	F	42,743				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Разлика међу анализираним групама пчела жртвованим 9. дана, посматрајући сва четири параметра истовремено према резултати дискриминационе анализе била је статистички веома значајна (табела 18). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика је била статистички значајна или веома значајна у свим односима (табела 18). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела жртвованих 9. дана статистички веома значајна разлика била у свим посматраним параметрима (табела 18). Резултати Tukey-евог теста којим је анализиран однос између две групе показали су да је активност CAT била статистички значајно или веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе (табела 18, график 19); активност GST

била је статистички значајно или веома значајно нижа у групама I-BW1, I-BW3 и I-BW6 у односу на остале групе (табела 18, График 20); активност SOD била је статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе али и статистички веома значајно нижа у групи BW у односу на групе I, I-BW3 и I-BW6 (табела 18, график 21); концентрација MDA била је статистички веома значајно нижа у групама I-BW1, I-BW3 и I-BW6 у односу на остале групе (табела 18, график 22).

Табела 18. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних група пчела узоркованих 9. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	0,047	0,378	< 0,001	0,147	40,193	< 0,001	
NI/BW	0,237	0,835	0,915	0,015	7,468	0,006	
NI/I-BW1	< 0,001	0,002	0,424	< 0,001	20,396	< 0,001	
NI/I-BW3	0,010	< 0,001	0,019	0,004	21,028	< 0,001	
NI/I-BW6	< 0,001	< 0,001	0,026	0,014	35,335	< 0,001	
I/BW	0,001	0,063	< 0,001	0,741	62,191	< 0,001	
I/I-BW1	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	86,367	< 0,001	
I/I-BW3	< 0,001	< 0,001	0,005	< 0,001	54,757	< 0,001	
I/I-BW6	< 0,001	< 0,001	0,004	< 0,001	86,552	< 0,001	
BW/I-BW1	0,010	0,017	0,102	< 0,001	30,658	< 0,001	
BW/I-BW3	0,417	< 0,001	0,004	< 0,001	34,778	< 0,001	
BW/I-BW6	0,001	< 0,001	0,005	< 0,001	38,875	< 0,001	
I-BW1/I-BW3	0,243	0,105	0,399	0,122	9,699	0,003	
I-BW1/I-BW6	0,739	< 0,001	0,492	0,032	12,356	0,001	
I-BW3/I-BW6	0,026	0,040	≈ 1,000	0,961	5,979	0,012	
ANOVA	F	36,604	54,631	23,999	43,469	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
ДА ¹	F	25,919				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Резултати дискриминационе анализе показали су да је разлика међу анализираним групама пчела узоркованим 15. дана, посматрајући сва четири параметра истовремено била статистички веома значајна (табела 19). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била статистички веома значајна у свим односима (табела 19). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела жртвованих 15. дана статистички веома значајна разлика била у свим посматраним параметрима (табела 19). Активности САТ према резултатима Tukey-евог теста је била статистички значајно виша у групи I-BW3 у односу на све остале групе (табела 19, график 19); активност GST била је статистички веома значајно нижа у групама BW и I-BW3 у односу на све остале групе (табела 19, график 20); активност SOD била је статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе али и статистички веома значајно нижа у групи BW у односу на групе I, I-BW3 и I-BW6 (табела 19, график 21); концентрацији MDA била је статистички значајно или веома значајно виша у групи I у односу на групе I-BW1, I-BW3 и I-BW6 (табела 19, график 22).

Табела 19. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних пчела узоркованих 15. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	0,205	0,014	< 0,001	0,944	95,317	< 0,001	
NI/BW	0,135	< 0,001	0,008	0,641	9,845	0.002	
NI/I-BW1	0,762	0,790	< 0,001	0,070	16,989	< 0,001	
NI/I-BW3	< 0,001	< 0,001	0,001	0,101	43,509	< 0,001	
NI/I-BW6	0,992	0,890	0,002	0,021	11,476	0.001	
I/BW	≈ 1,000	< 0,001	< 0,001	0,220	139,487	< 0,001	
I/I-BW1	0,854	0,118	< 0,001	0,016	41,148	< 0,001	
I/I-BW3	0,006	< 0,001	< 0,001	0,023	47,675	< 0,001	
I/I-BW6	0,086	0,003	< 0,001	0,005	83,272	< 0,001	
BW/I-BW1	0,716	< 0,001	< 0,001	0,611	37,446	< 0,001	
BW/I-BW3	0,001	0,586	< 0,001	0,737	45,641	< 0,001	
BW/I-BW6	0,054	0,002	< 0,001	0,255	20,192	< 0,001	
I-BW1/I-BW3	0,001	< 0,001	0,292	0,926	21,026	< 0,001	
I-BW1/I-BW6	0,451	0,253	0,187	0,975	8,230	0.004	
I-BW3/I-BW6	< 0,001	< 0,001	≈ 1,000	0,926	32,116	< 0,001	
ANOVA	F	15,021	44,416	104,716	7,171	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,003	-	-
ДА ¹	F	24,230				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Дискриминациона анализа показала је статистички значајну или веома значајну разлику између различитих дана жртвовања за све параметре посматране истовремено (табела 20). Такође, по свим параметрима посматраним истовремено два жртвовања међусобно су се статистички значајно или врло значајно разликовала у свим групама осим односа 6/9. у групи I-BW1 (табела 20). Однос просечних вредности појединачних параметара (нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрацији MDA) између различитих дана жртвовања (6, 9. и 15) није показао правилност у групама појединачно (табела 20, графици 19., 20., 21. и 22).

Табела 20. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA у различитим данима жртвовања по групама

Групе	Поређење	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
		CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
BW	6/9. дан	0,268	< 0,001	0,0097	0,081	172,762	0,001	
	6/15. дан	0,274	0,825	< 0,001	0,006	696,191	< 0,001	
	9/15. дан	≈ 1,000	< 0,001	0,011	0,136	1534,069	< 0,001	
	ANOVA	F	1,989	67,334	40,075	12,336	-	-
		p	0,217	< 0,001	< 0,001	0,007	-	-
	ДА	F	118,030				-	-
p		< 0,001				-	-	
I-BW1	6/9. дан	0,007	0,489	0,467	≈ 1,000	8,970	0,051	
	6/15. дан	< 0,001	0,013	0,009	0,001	143,557	0,001	
	9/15. дан	0,006	0,054	0,036	0,001	86,672	0,002	
	ANOVA	F	49,945	9,419	11,318	45,703	-	-
		p	< 0,001	0,014	0,009	< 0,001	-	-
	ДА ¹	F	19,037				-	-
p		0,001				-	-	
I-BW3	6/9. дан	< 0,001	0,013	0,988	0,035	15,521	0,024	
	6/15. дан	< 0,001	0,649	0,606	0,001	79,786	0,002	
	9/15. дан	< 0,001	0,037	0,525	0,005	31,643	0,009	
	ANOVA	F	236,269	9,900	0,774	37,330	-	-
		p	< 0,001	0,013	0,502	< 0,001	-	-
	ДА	F	18,333				-	-
p		0,001				-	-	
I-BW6	9/15. дан ²	0,061	0,002	0,193	0,069	444,48	0,036	

¹ Резултати дискриминационе анализе

² Резултати t-теста

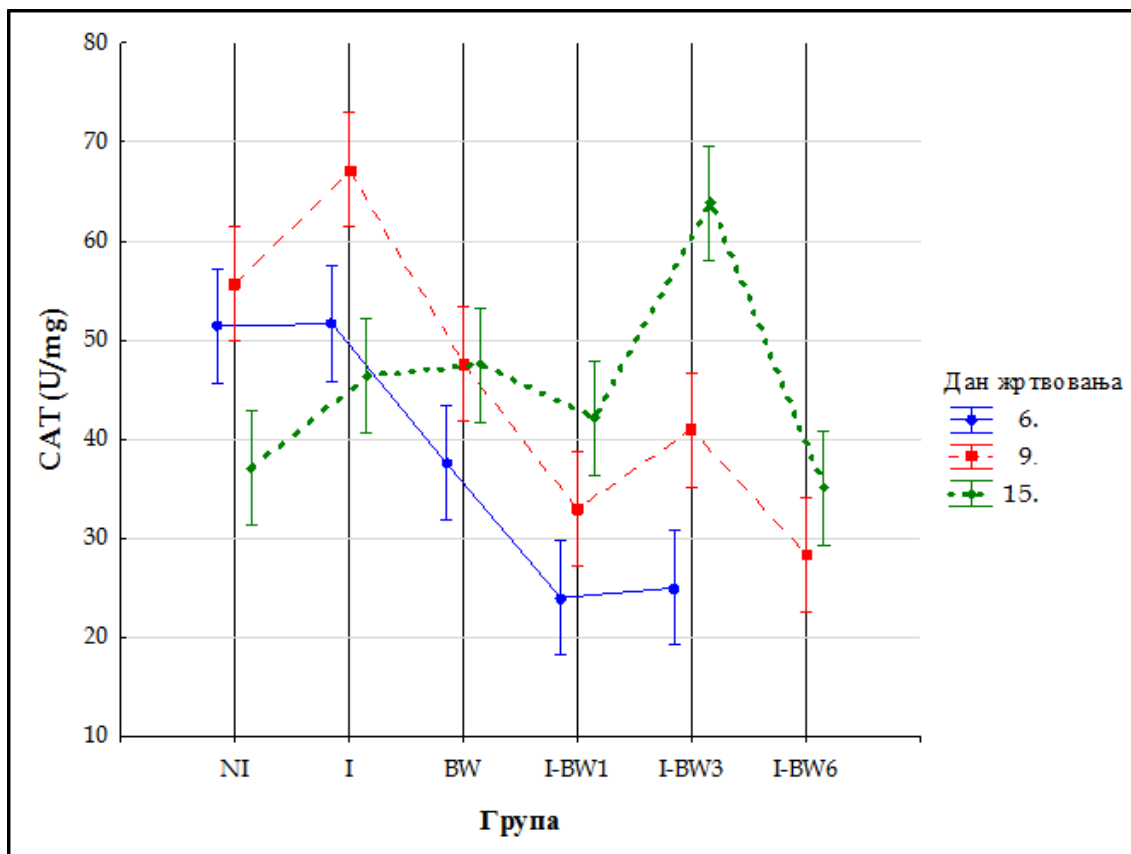


График 19: Нивои активности САТ у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

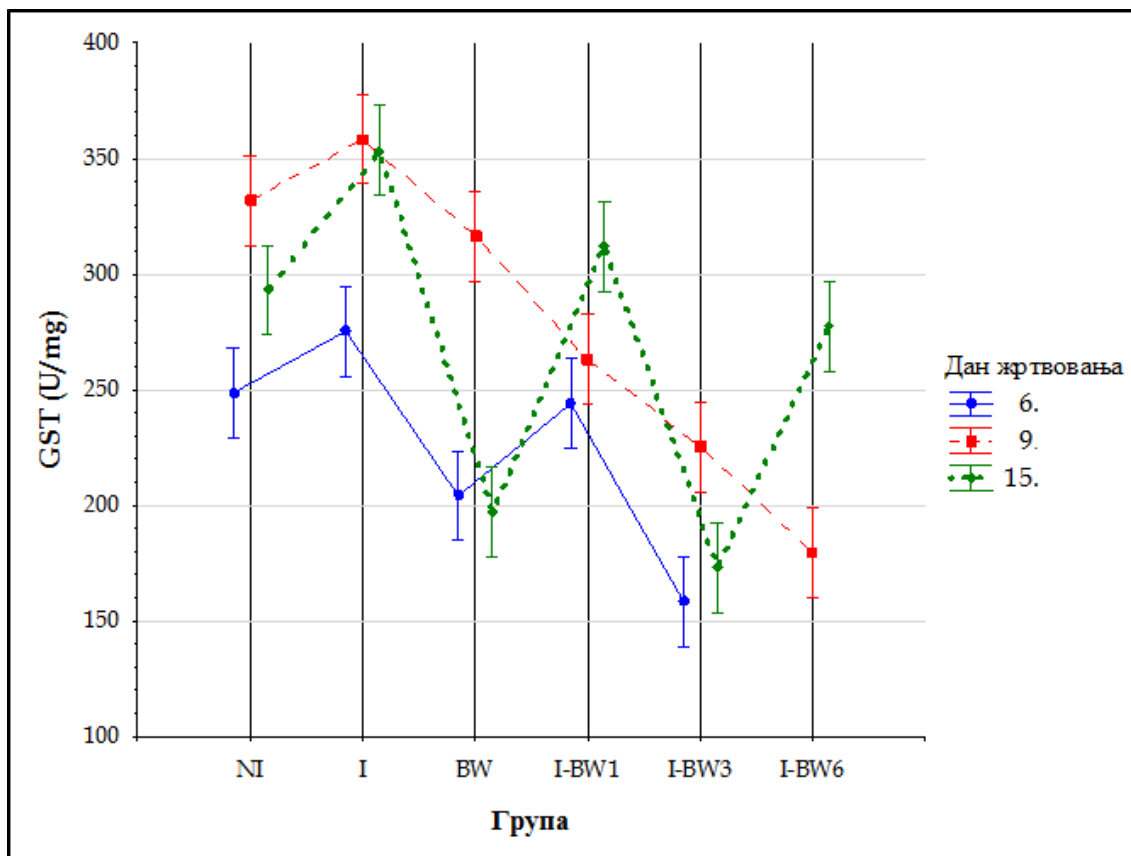


График 20: Нивои активности GST у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

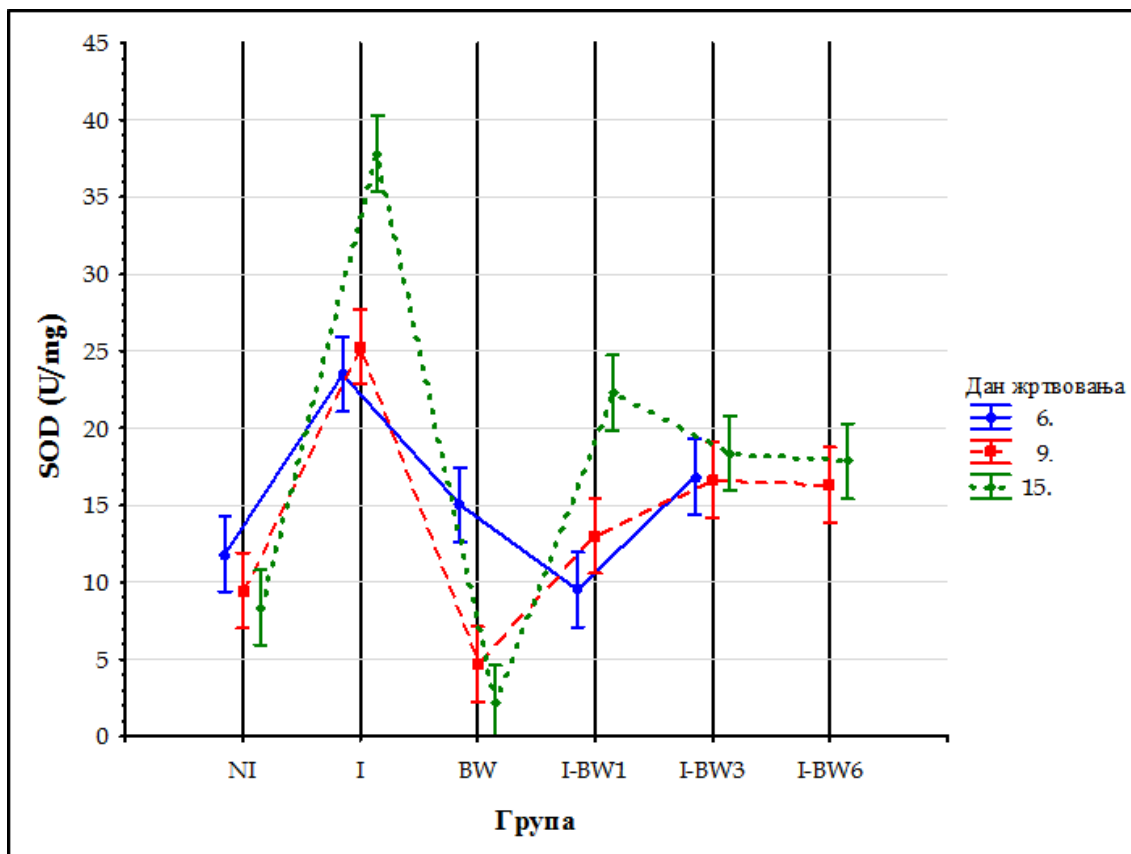


График 21: Нивои активности SOD у различитим данима жртовања по свим експерименталним групама

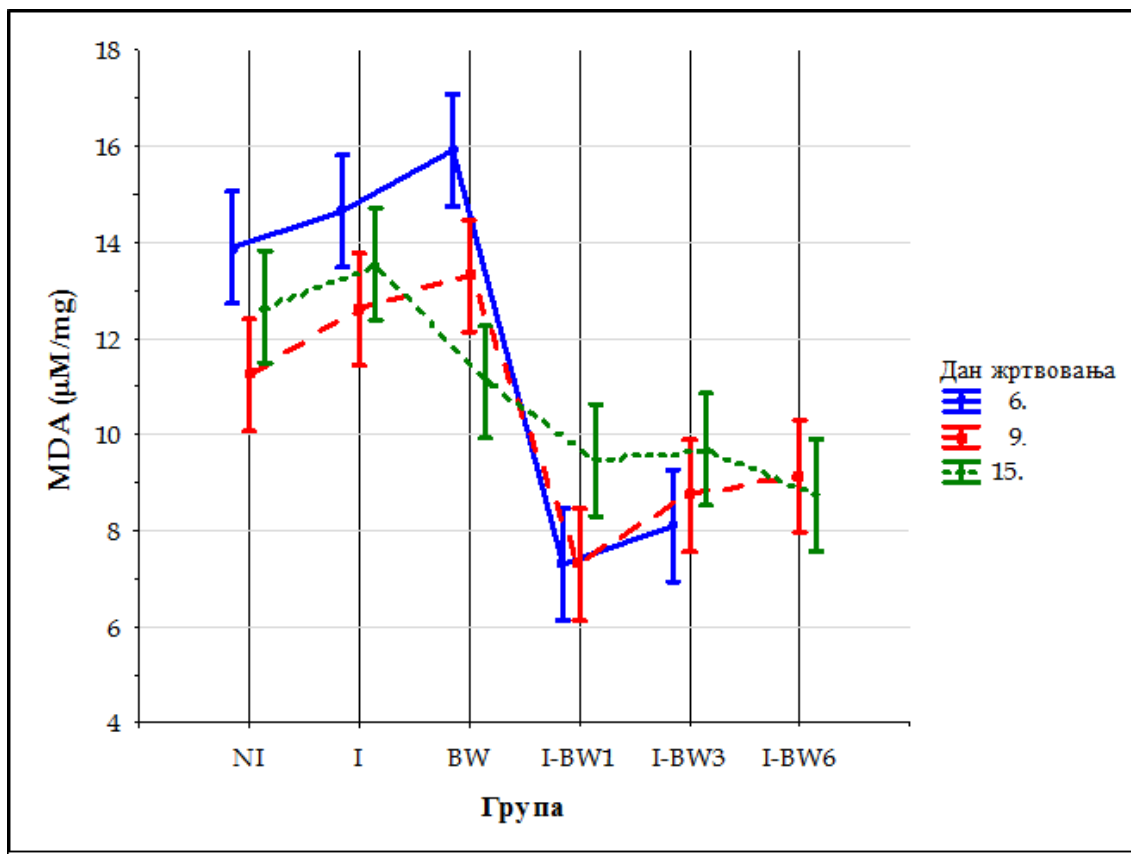


График 22: Концентрација MDA у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

5. 3. 4. Поређење параметара оксидативног стреса код пчела храњених уз додатак препарата Medenko forte

Резултати дискриминационе анализе показали су да је разлика међу анализираним групама посматрајући сва четири параметра била статистички веома значајна (табела 21). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била статистички веома значајна у свим односима осим у односу група NI и I-MF1 где је разлика била статистички значајна (табела 21). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела жртвованих 6 дана након излегања статистички веома значајна разлика била у сваком параметру: активности CAT, GST, SOD и концентрацији MDA (табела 21). Резултати Tukey-евог теста којим је анализиран однос између две групе показали су да је активности CAT била статистички веома значајно нижа у групи MF, а статистички значајно нижа у групи I-MF3 у односу на групе I и NI. (табела 21, график 23); активност GST била је статистички веома значајно нижа у групи MF у односу на групе I, NI и I-MF1 (табела 21, график 24); активност SOD била је статистички веома значајно нижа у групи MF у односу на све остале групе, али и статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе (табела 21, график 25); концентрацији MDA била је статистички веома значајно нижа у групи I-MF3 у односу на све остале групе (табела 21, график 26).

Табела 21. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних група пчела узоркованих 6. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	≈ 1,000	0,670	< 0,001	0,921	51,709	< 0,001	
NI/MF	0,007	< 0,000	0,001	0,379	22,519	< 0,001	
NI/I-MF1	0,129	0,223	≈ 1,000	0,010	4,969	0,032	
NI/I-MF3	0,020	0,020	0,169	0,002	22,596	< 0,001	
I/MF	0,006	< 0,001	< 0,000	0,813	104,189	< 0,001	
I/I-MF1	0,119	0,873	< 0,000	0,035	60,743	< 0,001	
I/I-MF3	0,018	0,003	< 0,000	0,001	59,066	< 0,001	
Mf/I-MF1	0,362	< 0,001	0,001	0,183	28,113	< 0,001	
Mf/I-MF3	0,947	0,075	< 0,001	< 0,001	20,959	0,001	
I-MF1/I-MF3	0,747	0,001	0,226	< 0,001	40,295	< 0,001	
ANOVA	F	9,380	29,964	106,670	26,663	-	-
	p	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
DA ¹	F	32,738				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Разлика међу анализираним групама пчела жртвованим 9. дана, посматрајући сва четири параметра истовремено према резултати дискриминационе анализе била је статистички веома значајна (табела 22). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била је статистички веома значајна у свим односима (табела 22). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорка пчела жртвованих 9. дана статистички веома значајна разлика била у сваком параметру: активности CAT, GST, SOD и концентрацији MDA (табела 22). Резултати Tukey-евог теста којим је анализиран однос између две групе показали су да је активности CAT била статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе, али и у групама NI и I-MF6 у односу на остале групе (табела 22, график 23); активност GST била је статистички веома значајно нижа у групи MF у односу на групе све остале групе осим

групе I-MF6, али и у групама I-MF3 и I-MF6 у односу на групу I (табела 22, график 24); активност SOD била је статистички веома значајно нижа у групи MF у односу на све остале групе, али и статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе (табела 22, график 25); концентрацији MDA била је статистички значајно нижа или веома значајно нижа у групама I-MF1 и I-MF3 у односу на групе I и MF (табела 22, график 26).

Табела 22. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних група пчела узоркованих 9. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	P	
NI/I	0,002	0,443	< 0,001	0,336	143,464	< 0,001	
NI/MF	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,027	35,003	< 0,001	
NI/I-MF1	< 0,001	0,969	0,991	0,341	21,861	< 0,001	
NI/I-MF3	0,007	0,023	< 0,001	0,419	54,723	< 0,001	
NI/I-MF6	≈ 1,000	< 0,001	< 0,001	0,984	45,174	< 0,001	
I/MF	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,617	260,240	< 0,001	
I/I-MF1	< 0,001	0,154	< 0,001	0,011	111,113	< 0,001	
I/I-MF3	< 0,001	0,001	< 0,001	0,015	42,518	< 0,001	
I/I-MF6	0,003	< 0,001	< 0,001	0,687	54,934	< 0,001	
MF/I-MF1	≈ 1,000	< 0,001	< 0,001	0,001	66,863	< 0,001	
MF/I-MF3	0,095	0,001	< 0,001	0,001	117,919	< 0,001	
MF/I-MF6	< 0,001	0,361	< 0,001	0,081	87,817	< 0,001	
I-MF1/I-MF3	0,109	0,082	< 0,001	≈ 1,000	22,163	< 0,001	
I-MF1/I-MF6	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,131	44,346	< 0,001	
I-MF3/I-MF6	0,006	0,028	0,782	0,169	16,447	< 0,001	
ANOVA	F	50,064	40,827	228,641	10,441	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
DA ¹	F	45,598				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Резултати дискриминационе анализе показали су да је разлика међу анализираним групама пчела узоркованим 15. дана, посматрајући сва четири параметра истовремено била статистички веома значајна (Табела 1). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била статистички веома значајна у свим односима (табела 23). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела жртвованих 15. дана статистички веома значајна разлика била у свим посматраним параметрима (табела 23). Активности САТ према резултатима Tukey-евог теста је била статистички веома значајно виша у групама I и I-MF1 у односу на групе MF и I-MF3 (табела 23, график 23); активност GST била је статистички веома значајно нижа у групи MF у односу на групе све остале групе, али и у групама I-MF3 и I-MF6 у односу на остале групе (табела 23, график 24); активност SOD била је статистички значајно или веома значајно нижа у групи MF у односу на све остале групе али и статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе (табела 23, график 25); концентрацији MDA била је статистички веома значајно нижа у групама I-MF3 и I-MF6 у односу на све остале групе (табела 23, график 26).

Табела 23. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних пчела узоркованих 15. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	0,240	< 0,001	< 0,001	0,934	412,358	< 0,001	
NI/MF	0,017	< 0,001	0,016	0,926	258,429	< 0,001	
NI/I-MF1	0,030	< 0,001	0,487	0,986	142,176	< 0,001	
NI/I-MF3	0,074	< 0,001	0,040	0,002	70,687	< 0,001	
NI/I-MF6	0,992	< 0,001	< 0,001	0,003	71,711	< 0,001	
I/MF	0,001	< 0,001	< 0,001	≈ 1,000	1156,029	< 0,001	
I/I-MF1	0,784	0,010	< 0,001	0,638	207,394	< 0,001	
I/I-MF3	0,002	< 0,001	< 0,001	< 0,001	614,394	< 0,001	
I/I-MF6	0,493	< 0,001	< 0,001	0,001	411,922	< 0,001	
Mf/I-MF1	< 0,001	< 0,001	0,001	0,623	783,456	< 0,001	
Mf/I-MF3	0,945	< 0,001	< 0,001	< 0,001	108,620	< 0,001	
Mf/I-MF6	0,007	< 0,001	< 0,001	0,001	205,594	< 0,001	
I-MF1/I-MF3	< 0,001	< 0,001	0,579	0,004	381,437	< 0,001	
I-MF1/I-MF6	0,076	< 0,001	< 0,001	0,008	313,554	< 0,001	
I-MF3/I-MF6	0,029	0,535	< 0,001	0,998	30,031	< 0,001	
ANOVA	F	18,011	432,74	313,940	17,459	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	-
DA ¹	F	111,66				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Дискриминациона анализа показала је статистички значајну или веома значајну разлику између различитих дана жртвовања за све параметре посматране истовремено (табела 24). Такође, по свим параметрима посматраним истовремено два жртвовања међусобно су се статистички значајно или врло значајно разликовала у свим групама осим односа 9. и 15. дана у групи MF (табела 24). Однос просечних вредности појединачних параметара (нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрацији MDA) између различитих дана жртвовања (6, 9. и 15) није показао правилност у групама појединачно (табела 24, графици 23., 24., 25. и 26).

Табела 24. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA у различитим данима жртвовања по групама

Групе	Поређење	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
		CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
MF	6/9. дан	0,163	0,005	0,022	0,146	17,310	0,021	
	6/15. дан	0,120	0,015	0,090	0,135	12,678	0,032	
	9/15. дан	0,0098	0,586	0,510	0,998	3,082	0,191	
	ANOVA	F	10,176	14,818	7,471	3,386	-	-
		p	0,012	0,005	0,024	0,104	-	-
	ДА	F	7,520				-	-
p		0,012				-	-	
I-MF1	6/9. дан	0,994	0,486	0,042	< 0,001	37,834	0,007	
	6/15. дан	0,001	0,026	0,064	< 0,001	25,744	0,012	
	9/15. дан	0,001	0,116	0,938	0,021	14,026	0,028	
	ANOVA	F	48,313	6,772	6,247	106,150	-	-
		p	< 0,001	0,029	0,034	< 0,001	-	-
	ДА ¹	F	22,044				-	-
p		< 0,001				-	-	
I-MF3	6/9. дан	0,022	< 0,001	0,049	0,052	2026,222	< 0,001	
	6/15. дан	0,060	< 0,001	0,122	0,036	664,565	< 0,001	
	9/15. дан	0,002	0,003	0,004	0,002	382,544	< 0,001	
	ANOVA	F	22,496	346,709	14,963	20,325	-	-
		p	0,002	< 0,001	0,005	0,002	-	-
	ДА	F	143,99				-	-
p		0,001				-	-	
I-MF6	9/15. дан ²	0,000	0,037	0,310	0,001	1310,2	0,021	

¹ Резултати дискриминационе анализе

² Резултати t-теста

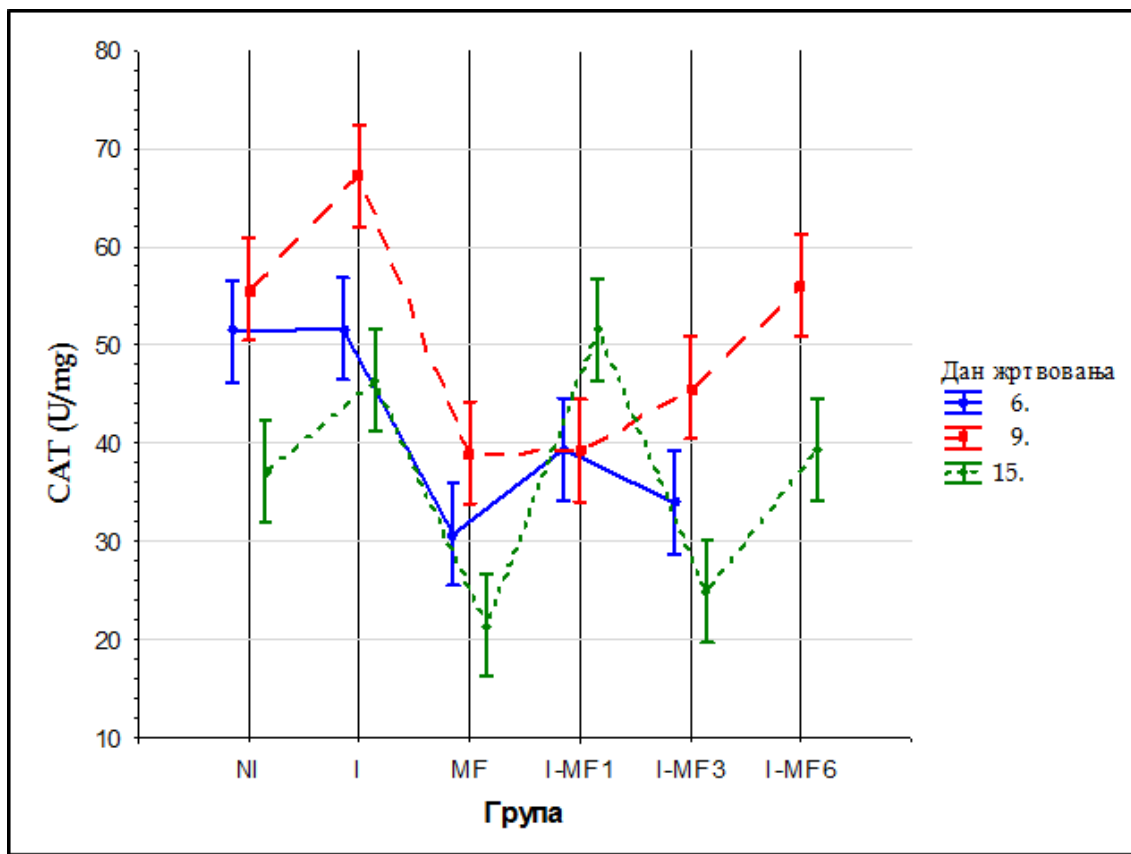


График 23: Нивои активности САТ у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

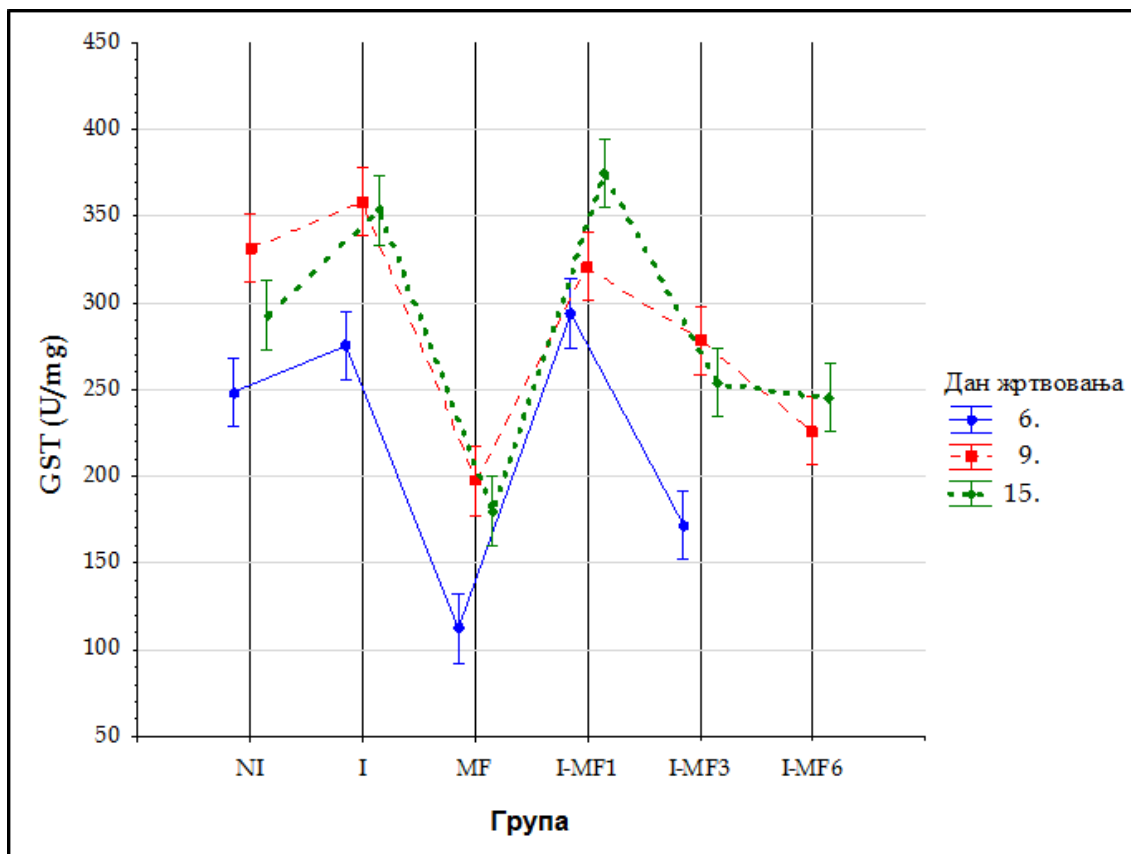


График 24: Нивои активности GST у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

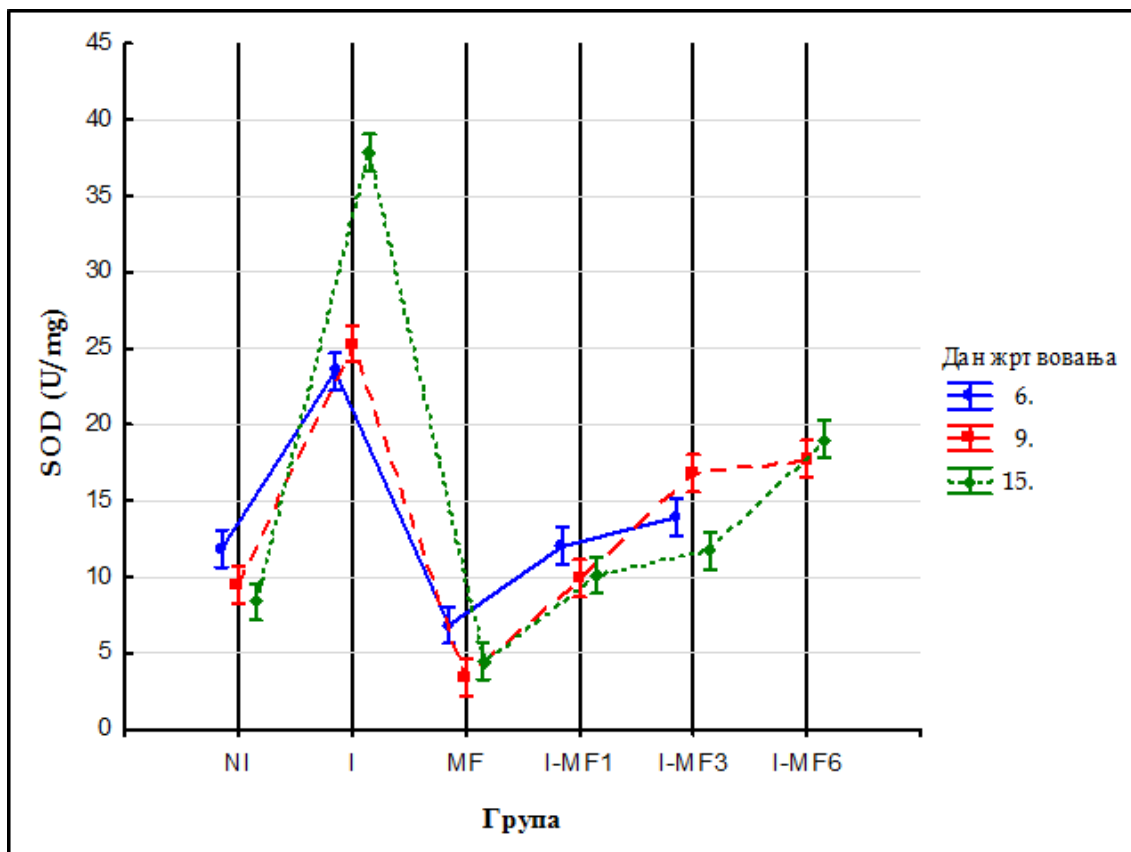


График 25: Нивои активности SOD у различитим данима жртовања по свим експерименталним групама

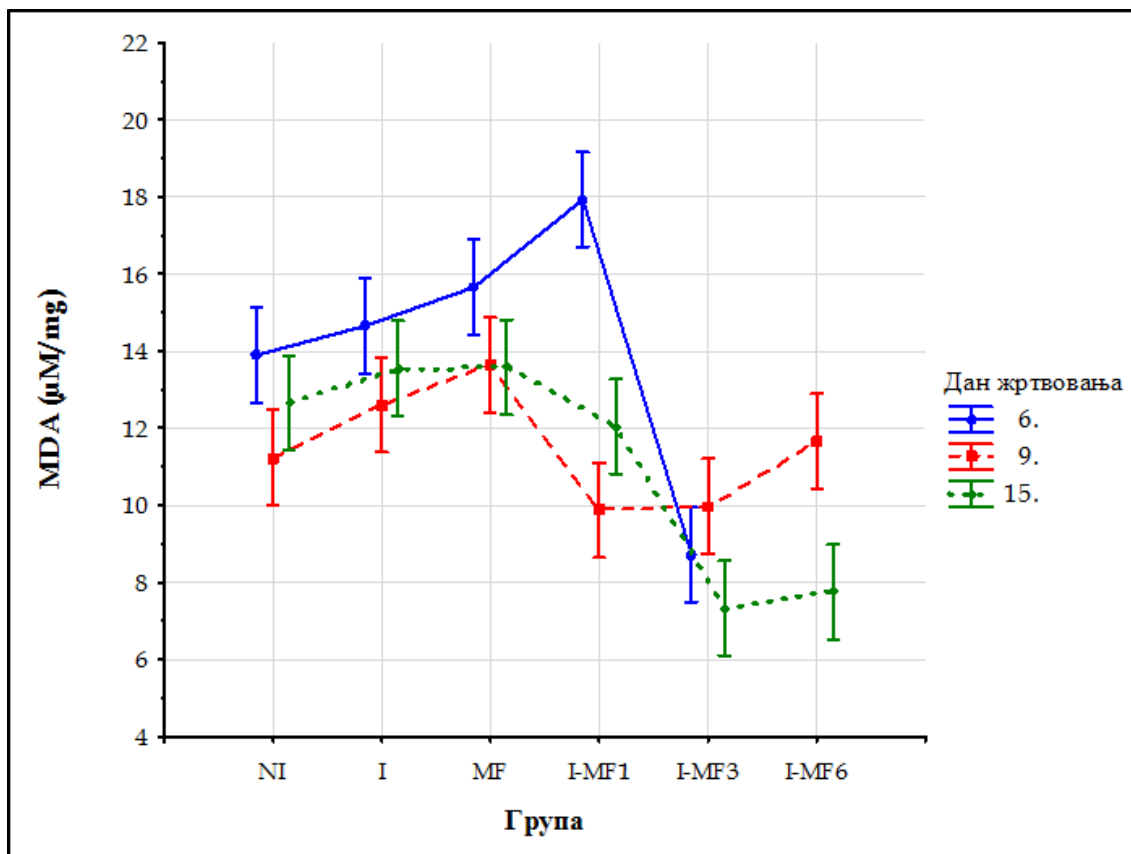


График 26: Концентрација MDA у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

5. 3. 5. Поређење параметара оксидативног стреса код пчела храњених уз додатак екстракта гљиве *Agaricus blazei*

Резултати дискриминационе анализе показали су да је разлика међу анализираним групама посматрајући сва четири параметра била статистички веома значајна (табела 25). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била статистички значајна или веома значајна у свим односима (табела 25). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорак пчела жртвованих 6 дана након излегања статистички веома значајна разлика била у сваком посматраном параметру (табела 25). Резултати Tukey-евог теста којим је анализиран однос између две групе показали су да је активности CAT била статистички значајно или веома значајно виша I-AB3 у односу на све остале групе, али и статистички значајно или веома значајно нижа у групи AB у односу на групе NI, I и I-AB3 (табела 25, график 27); активност GST била статистички веома значајно нижа у групи AB у односу на све остале групе (табела 25, график 28); активност SOD била је статистички веома значајно виша у групи I у односу на групе NI, I-AB1 и I-AB3 (табела 25, график 29); концентрација MDA била је статистички значајно или веома значајно нижа у групи I-AB1 у односу на све остале групе (табела 25, график 30).

Табела 25. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних група пчела узоркованих 6. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	≈ 1,000	0,150	0,004	0,907	8,344	0,008	
NI/AB	0,022	< 0,001	0,122	0,065	215,964	< 0,001	
NI/I-AB1	0,376	0,633	0,819	0,039	4,731	0,036	
NI/I-AB3	0,037	0,017	0,999	0,265	52,689	< 0,001	
I/AB	0,020	< 0,001	0,203	0,231	264,975	< 0,001	
I/I-AB1	0,350	0,775	0,001	0,010	19,200	0,001	
I/I-AB3	0,040	0,628	0,003	0,687	34,826	< 0,001	
AB/I-AB1	0,360	< 0,001	0,024	0,001	229,341	< 0,001	
AB/I-AB3	< 0,001	< 0,001	0,085	0,870	472,231	< 0,001	
I-AB1/I-AB3	0,002	0,149	0,916	0,002	62,681	< 0,001	
ANOVA	F	14,757	66,080	12,945	12,867	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	0,001	0,001	-	-
ДА ¹	F	30,287				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Разлика међу анализираним групама пчела жртвованим 9. дана, посматрајући сва четири параметра истовремено према резултати дискриминационе анализе била је статистички веома значајна (табела 26). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била статистички значајна или веома значајна у свим односима осим у односу група NI и I-AB3 (табела 26). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела жртвованих 9. дана статистички веома значајна разлика била у свим посматраним параметрима осим у концентрацији MDA (табела 26). Резултати Tukey-евог теста којим је анализиран однос између две групе показали су да је активност CAT била статистички веома значајно виша

у групи I у односу на све остале групе (табела 26, график 27); активност GST била је статистички веома значајно нижа у групи AB у односу на све остале групе (табела 26, график 28); активност SOD била је статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе, (табела 26, график 29); према резултатима овог теста међу посматраним групама није било статистички значајних разлика у концентрацији MDA (табела 26, график 30).

Табела 26. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних група пчела узоркованих 9. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	0,002	0,191	< 0,001	0,353	104,750	< 0,001	
NI/AB	0,001	< 0,001	0,899	0,083	29,195	< 0,001	
NI/I-AB1	< 0,001	0,033	0,052	0,904	23,655	< 0,001	
NI/I-AB3	0,884	0,107	0,984	0,852	2,290	0,139	
NI/I-AB6	0,143	0,314	0,008	0,385	4,328	0,032	
I/AB	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,922	157,790	< 0,001	
I/I-AB1	< 0,001	0,001	< 0,001	0,882	194,210	< 0,001	
I/I-AB3	0,008	0,999	< 0,001	0,928	105,565	< 0,001	
I/I-AB6	< 0,001	0,999	< 0,001	≈ 1,000	86,259	< 0,001	
AB/I-AB1	0,141	0,001	0,262	0,377	12,087	0,001	
AB/I-AB3	< 0,001	< 0,001	0,563	0,445	44,587	< 0,001	
AB/I-AB6	0,079	< 0,001	0,002	0,899	31,685	< 0,001	
I-AB1/I-AB3	< 0,001	< 0,001	0,017	≈ 1,000	33,573	< 0,001	
I-AB1/I-AB6	0,001	0,001	< 0,001	0,907	26,970	< 0,001	
I-AB3/I-AB6	0,024	0,976	0,025	0,946	5,626	0,015	
ANOVA	F	50,690	45,641	135,251	2,248	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,116	-	-
ДА ¹	F	24,572				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Резултати дискриминационе анализе показали су да је разлика међу анализираним групама пчела узоркованим 15. дана, посматрајући сва четири параметра истовремено била статистички веома значајна (табела 27). Посматрајући истовремено сва четири параметра у односу између две групе разлика била статистички веома значајна у свим односима (табела 27). Резултати анализе варијансе показали су да је код узорака пчела жртвованих 15. дана статистички веома значајна разлика била у свим посматраним параметрима осим у активности MDA (табела 27). Активности CAT према резултатима Tukey-евог теста је била статистички значајно нижа у групама AB и I-AB1 у односу на групе I, I-AB3 и I-AB6 (табела 27, график 27); активност GST била је статистички веома значајно нижа у групи AB у односу на све остале групе (табела 27, график 28); активност SOD била је статистички веома значајно виша у групи I у односу на све остале групе (табела 27, график 29); у концентрацији MDA међу посматраним групама није било статистички значајних разлика (табела 27, график 30).

Табела 27. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA између анализираних пчела узоркованих 15. дана

Групе	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
	CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
NI/I	0,135	< 0,001	< 0,001	0,940	372,363	< 0,001	
NI/AB	0,423	< 0,001	0,968	0,279	159,881	< 0,001	
NI/I-AB1	0,246	< 0,001	0,004	0,791	23,269	< 0,001	
NI/I-AB3	0,006	< 0,001	0,932	0,996	119,294	< 0,001	
NI/I-AB6	0,002	< 0,001	0,114	0,886	47,470	< 0,001	
I/AB	0,005	< 0,001	< 0,001	0,070	596,672	< 0,001	
I/I-AB1	0,003	0,992	< 0,001	0,316	322,923	< 0,001	
I/I-AB3	0,442	< 0,001	< 0,001	0,998	425,370	< 0,001	
I/I-AB6	0,200	≈ 1,000	< 0,001	0,414	269,567	< 0,001	
AB/I-AB1	0,998	< 0,001	0,001	0,914	256,558	< 0,001	
AB/I-AB3	< 0,001	< 0,001	≈ 1,000	0,137	552,706	< 0,001	
AB/I-AB6	< 0,001	< 0,001	0,032	0,830	354,509	< 0,001	
I-AB1/I-AB3	< 0,001	< 0,001	0,001	0,526	87,159	< 0,001	
I-AB1/I-AB6	< 0,001	0,973	0,387	≈ 1,000	37,393	< 0,001	
I-AB3/I-AB6	0,990	< 0,001	0,024	0,647	33,354	< 0,001	
ANOVA	F	21,804	461,094	329,435	2,872	-	-
	p	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,062	-	-
ДА ¹	F	108,81				-	-
	p	< 0,001				-	-

¹Дискриминациона анализа

Дискриминациона анализа показала је статистички значајну или веома значајну разлику за све параметре посматране истовремено између различитих дана жртвовања у свим групама осим у групи I-AB3 (табела 28). Посматрајући све параметрима истовремено два жртвовања међусобно су се статистички значајно или врло значајно разликовала у свим групама (табела 28). Однос просечних вредности појединачних параметара (нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрацији MDA) између различитих дана жртвовања (6, 9. и 15) није показао правилност у групама појединачно (табела 28, графици 27., 28., 29. и 30).

Табела 28. Резултати поређења просечних нивоа активности CAT, GST, SOD и концентрације MDA у различитим данима жртвовања по групама

Групе	Поређење	p - нивои значајности разлика				ДА ¹ (CAT, GST, SOD и MDA)		
		CAT	GST	SOD	MDA	F	p	
AB	6/9. дан	0,091	< 0,001	0,039	0,013	23,951	0,013	
	6/15. дан	0,389	0,929	0,026	0,001	15,673	0,024	
	9/15. дан	0,017	< 0,001	0,940	0,030	18,787	0,018	
	ANOVA	F	8,284	63,559	7,947	29,964	-	-
		p	0,019	< 0,001	0,021	0,001	-	-
	ДА	F	18,886				-	-
p		0,001				-	-	
I-AB1	6/9. дан	0,003	0,002	0,041	0,079	39,877	0,006	
	6/15. дан	< 0,001	< 0,001	0,014	0,385	54,595	0,004	
	9/15. дан	< 0,001	< 0,001	0,001	0,457	27,291	0,011	
	ANOVA	F	118,440	175,035	27,702	3,670	-	-
		p	< 0,001	< 0,001	0,001	0,091	-	-
	ДА ¹	F	37,457				-	-
p		< 0,001				-	-	
I-AB3	6/9. дан	0,005	< 0,001	0,290	0,002	74,876	0,002	
	6/15. дан	0,001	< 0,001	0,006	0,013	265,038	< 0,001	
	9/15. дан	0,045	< 0,001	0,038	0,244	70,657	0,003	
	ANOVA	F	35,855	224,668	12,729	19,420	-	-
		p	< 0,001	< 0,001	0,007	0,002	-	-
	ДА	F	4,810				-	-
p		0,328				-	-	
I-AB6	9/15. дан ²	0,006	0,990	0,174	0,211	1729,291	0,018	

¹ Резултати дискриминационе анализе

² Резултати t-теста

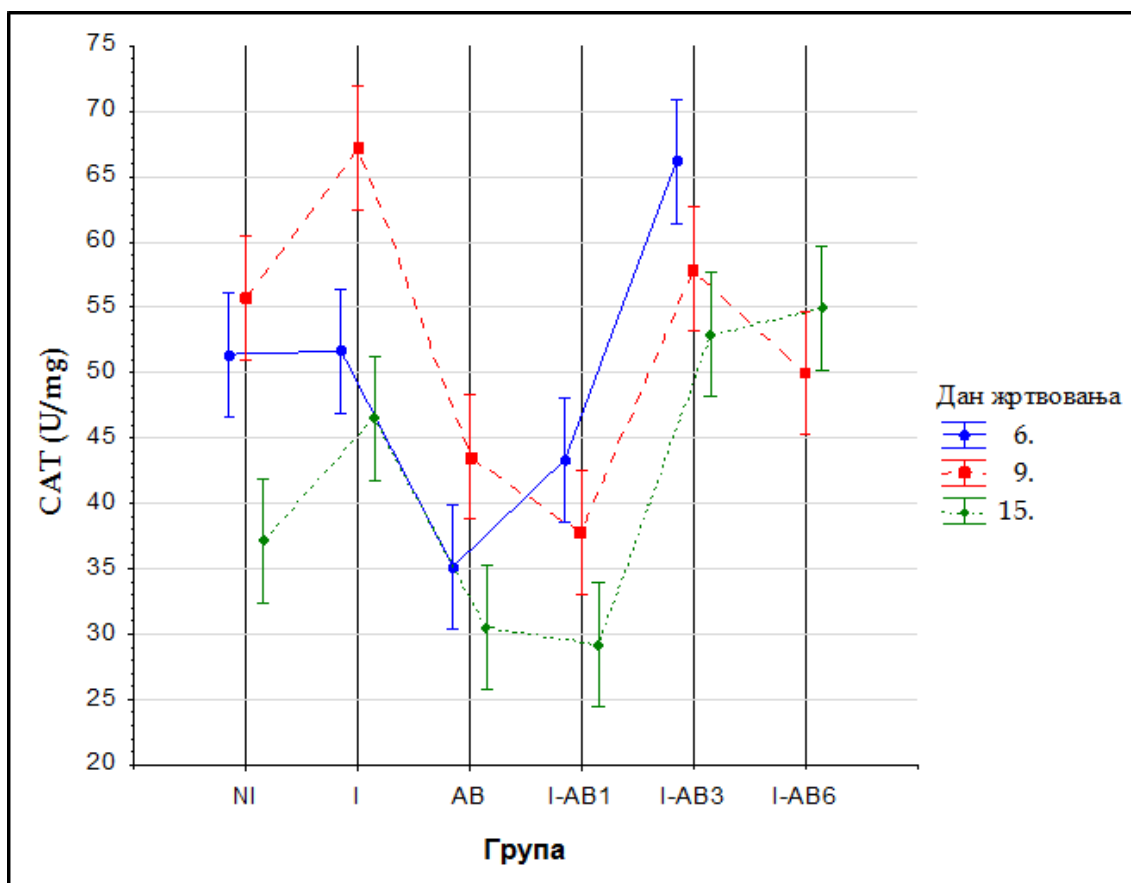


График 27: Нивои активности САТ у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

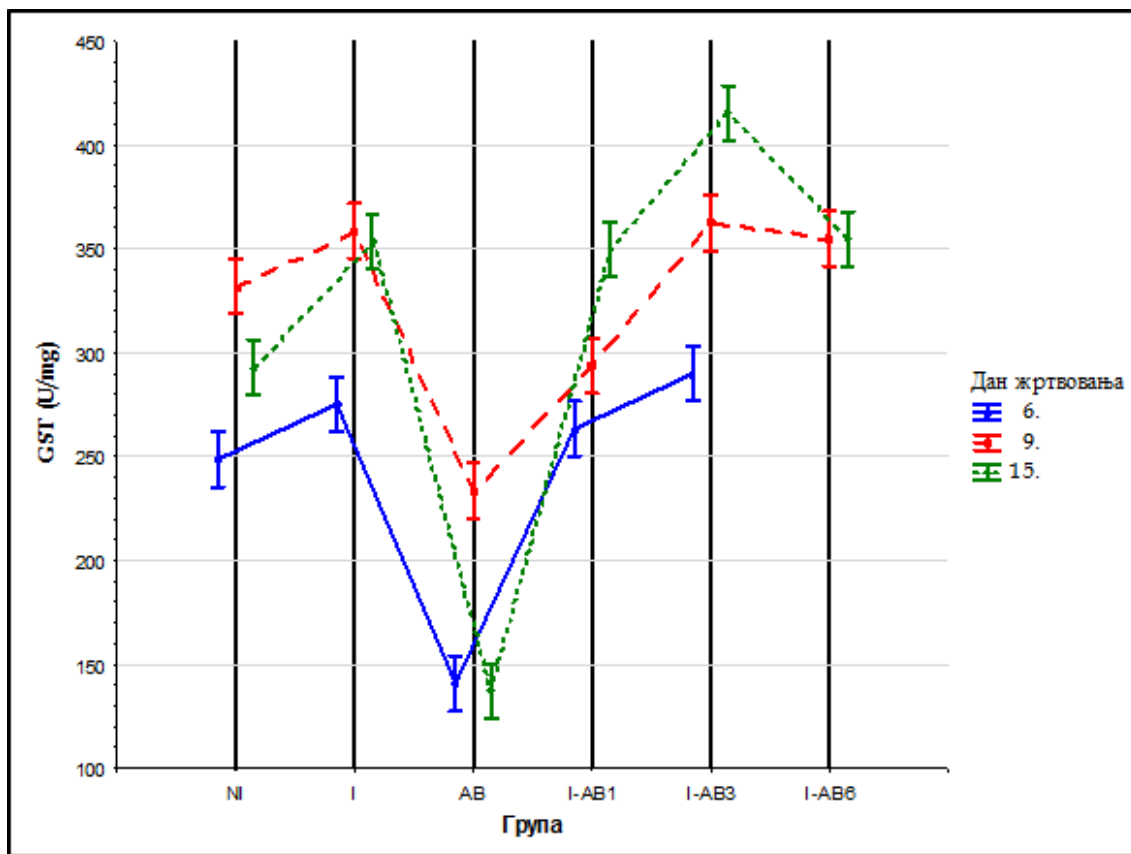


График 28: Нивои активности GST у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

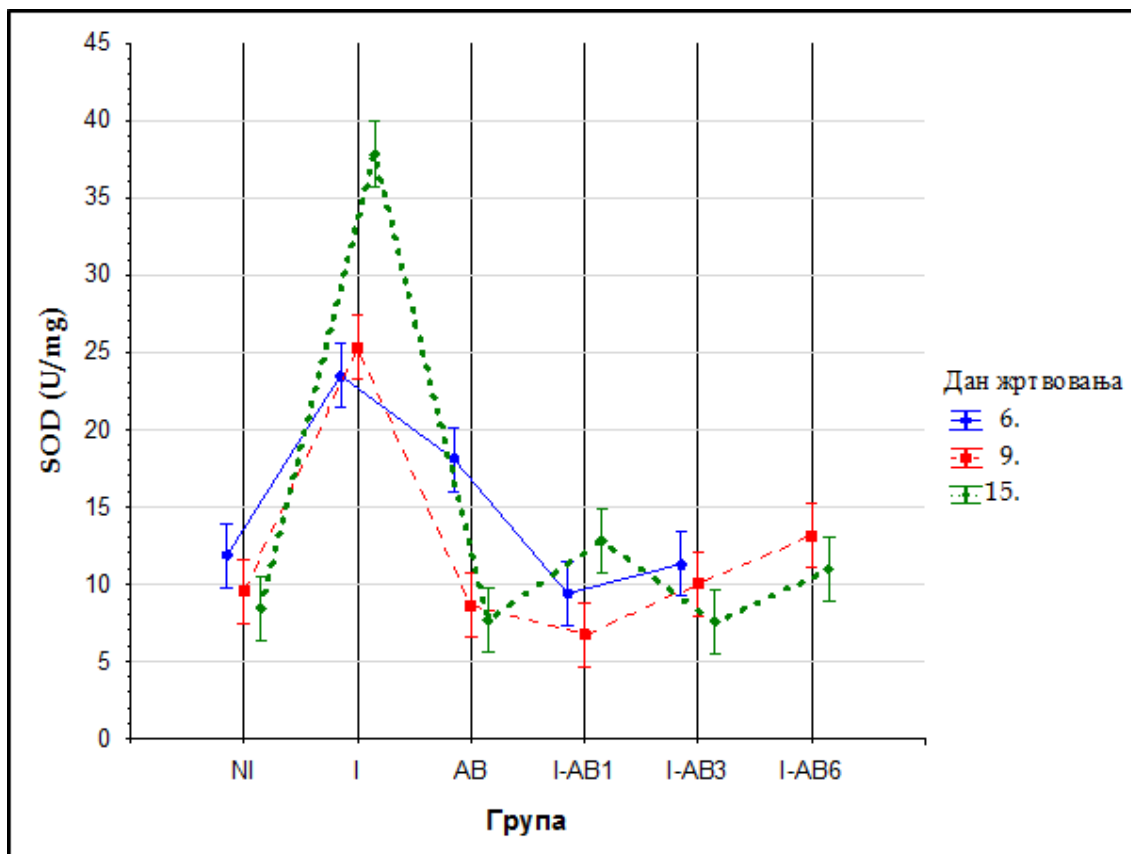


График 29: Нивои активности SOD у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

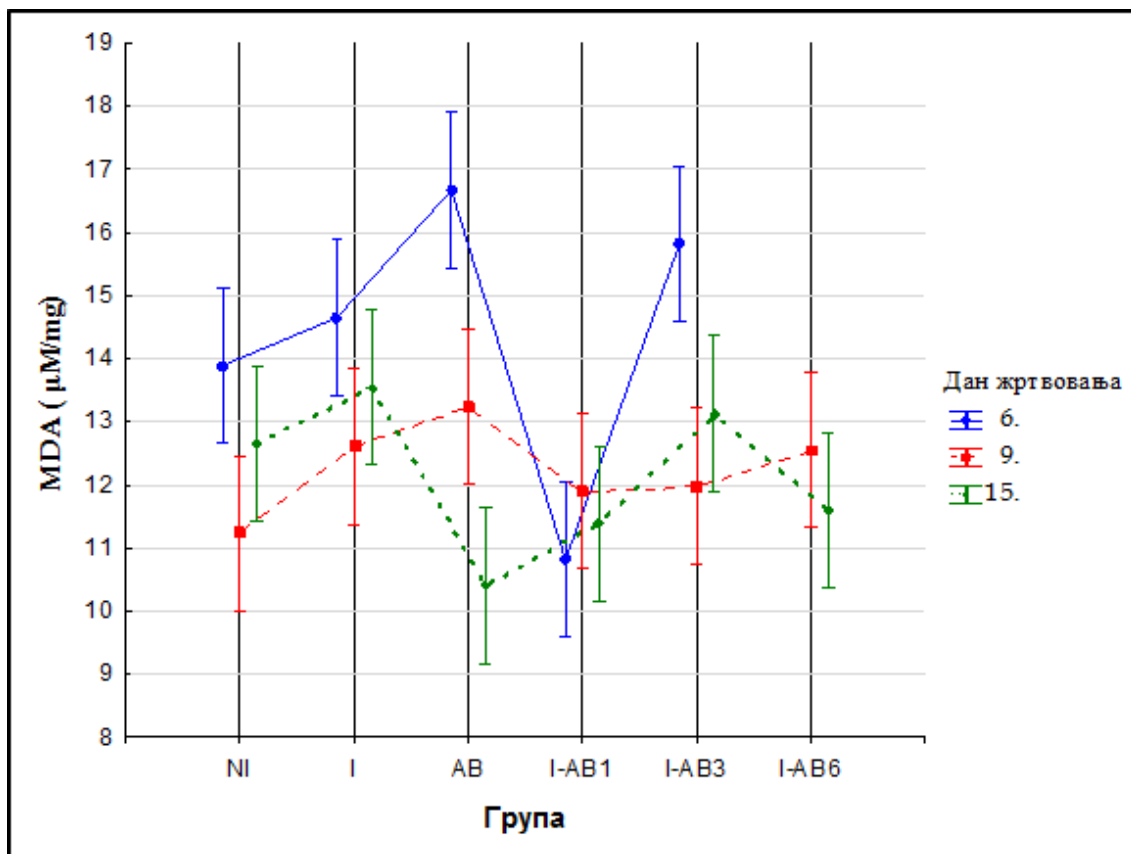


График 30: Концентрација MDA у различитим данима жртвовања по свим експерименталним групама

5. 4. Експресија гена значајних за имунитет код пчела

5. 4. 1. Експресија гена значајних за имунитет код пчела из група третираних фумагилином

Поређење нивоа експресије појединачних гена међу различитим експерименталним групама у истим моментима жртвовања пчела

Анализирајући нивое генске експресије код пчела жртвованих шестог дана, Kruskal-Wallis тест није показао је статистички значајну разлику међу групама у нивоима експресије гена за апидецин ($H = 0,291$; $p = 0,962$), дефензин ($H = 0,920$; $p = 0,821$), хименоптецин ($H = 3,137$; $p = 0,371$), вителогенин ($H = 4,269$; $p = 0,234$) и абецин где су вредности биле близу нивоа значајности ($H = 7,623$; $p = 0,055$). Резултати Mann-Whitny U теста показали су да је ова разлика у нивоима експресије абецина (график 31) потицала од значајно ниже у групи I-F3 у односу на групе F ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F1 ($z = 2,514$; $p = 0,012$).

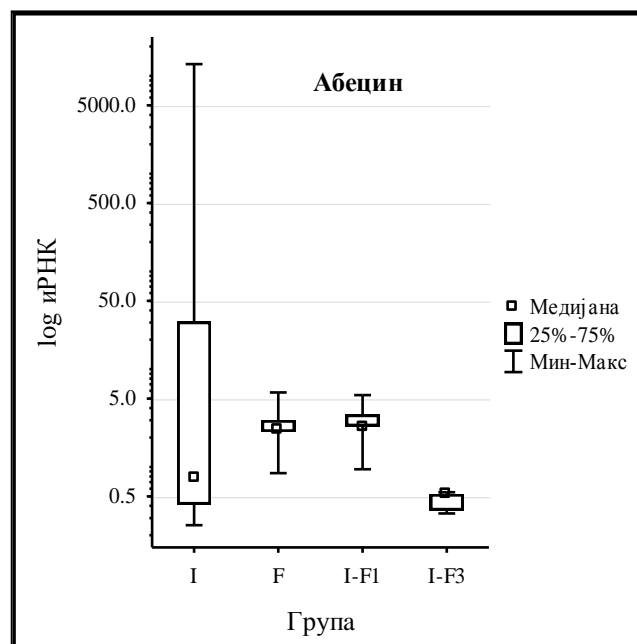
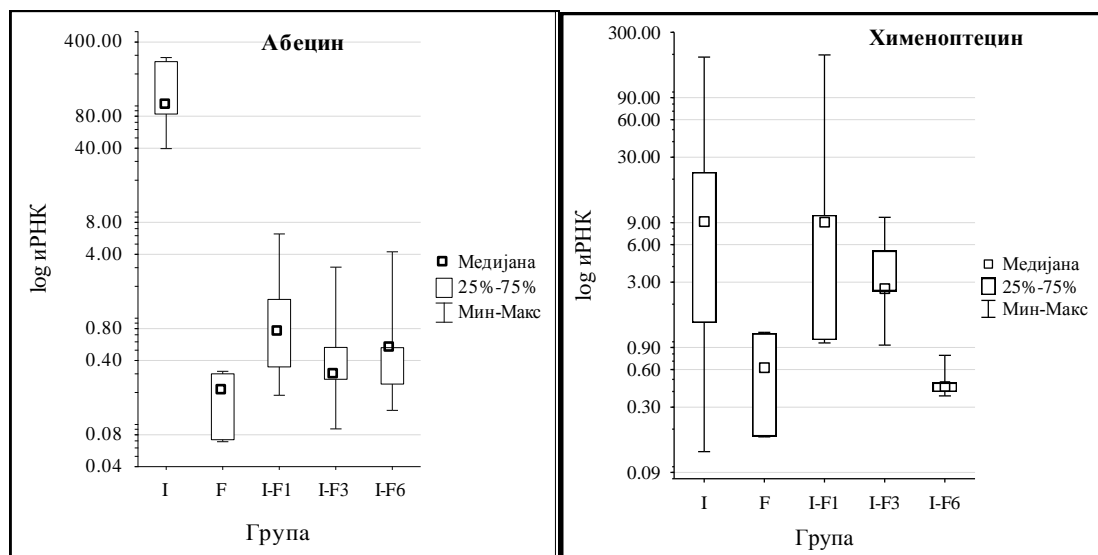


График 31: Нивои експресије гена за абецин код пчела жртвованих шестог дана

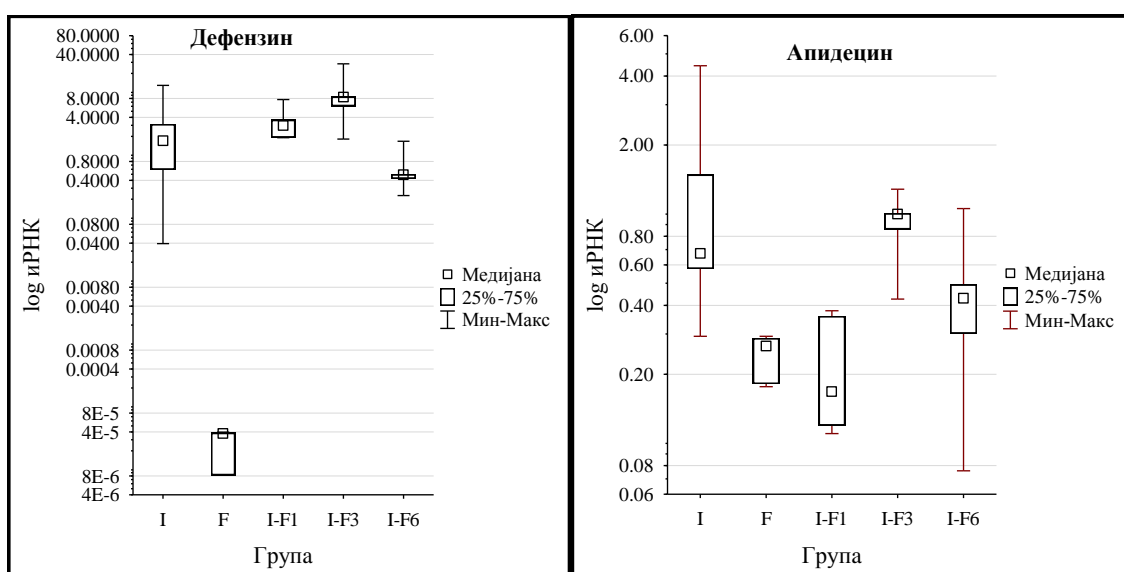
Kruskal-Wallis тест показао је да је статистички веома значајна разлика забележена код пчела жртвованих девет дана након излегања, у експресији гена за апидецин ($N = 18,314$; $p = 0,009$), абецин ($N = 14,614$; $p = 0,006$), вителогенин ($N = 15,545$; $p = ,004$) и дефензин ($N = 13,547$; $p = 0,001$), док је код хименоптецина разлика била статистички значајна ($N = 10,966$; $p = 0,027$). Резултати Mann-Whitny U теста открили су да је експресија гена за абецин (график 32) била статистички значајно виша у групи I у односу на све остале групе: F ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-F3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$);

Ниво експресије гена за хименоптецин (график 33) био је нижи у групи F у односу на групу I-F3 ($z = 2,089$; $p = 0,037$), али и у групи I-F6 у односу на групе I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



Графици 32. и 33: Нивои експресије гена за абецин и хименоптецин код пчела жртвованих деветог дана

Ниво експресије гена за дефензин (график 34) био је најнижи у групи F и то статистички значајно нижи у односу на све остале групе: I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-F3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), али и у групи I-F6 односу на групе I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$). Статистички значајно виша експресија гена за апидецин (график 35) била је у групи I у односу на F ($z = 2,410$; $p = 0,016$) и I-F1 ($z = 2,089$; $p = 0,037$), али и у групи I-F3 у односу на исте групе: F ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



Графици 34. и 35: Нивои експресије гена за дефензин и апидецин код пчела жртвованих деветог дана

Када је реч о вителогенину (график 36) експресија је била статистички значајно нижа у групи I-F1 у односу на групе: I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), F ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F3 ($z = 2,298$; $p = 0,022$); експресија гена за вителогенин била је и статистички значајно виша у групи I у односу на F ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и I-F6 ($z = 2,298$; $p = 0,022$).

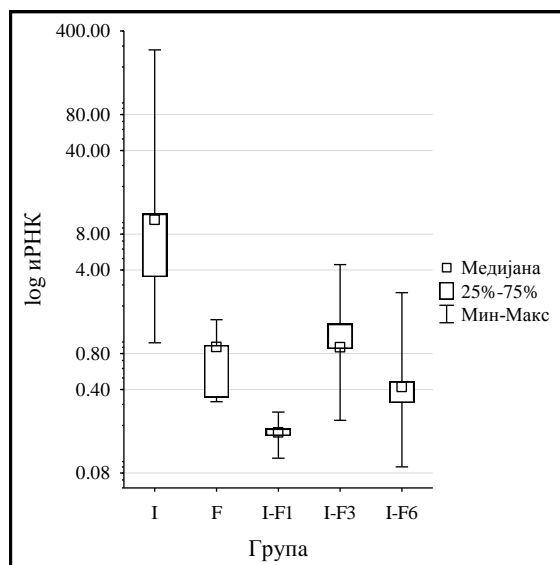
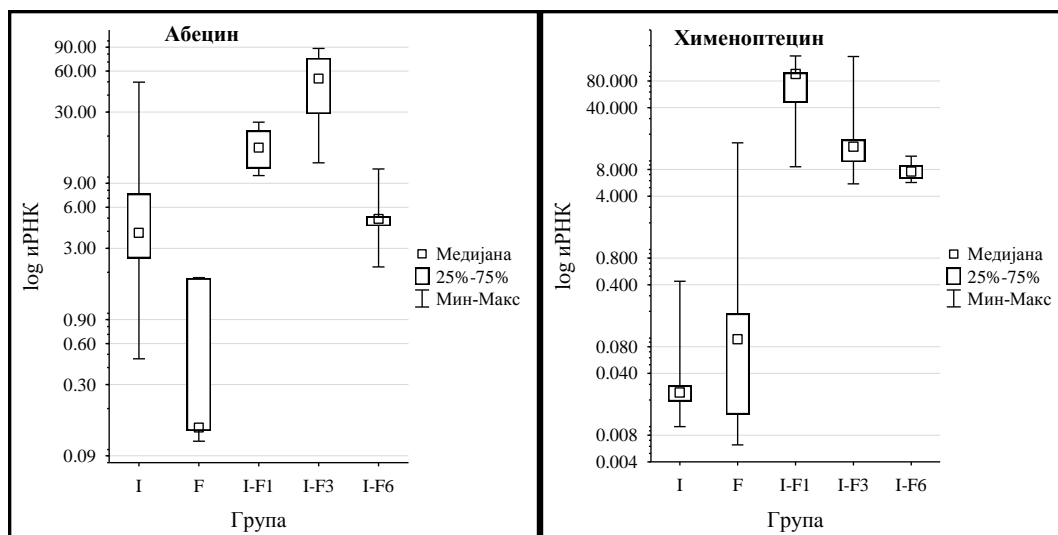


График 36: Нивои експресије гена за вителогенин код пчела
жртвованих деветог дана

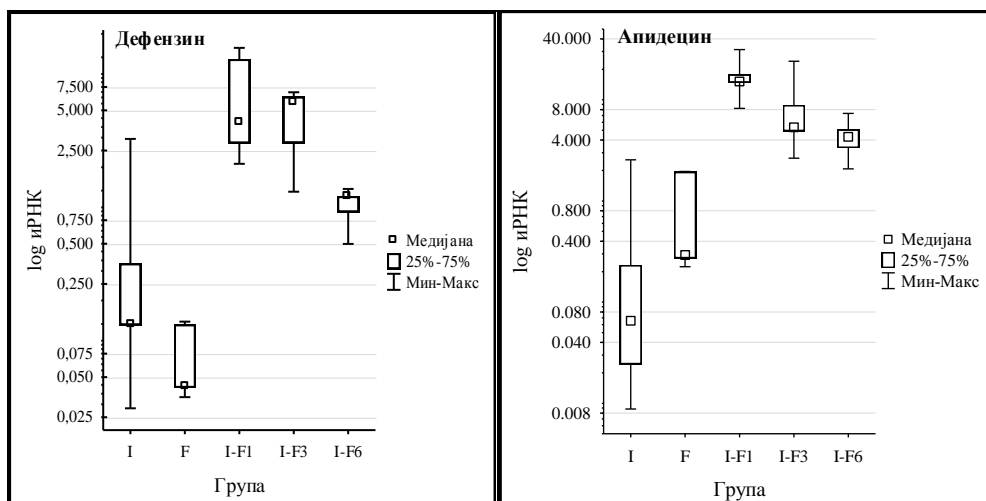
Узорци пчела старих петнаест дана, према резултатима Kruskal-Wallis теста имали су статистички веома значајне разлике у експресији гена за хименоптецин ($N = 16,202$; $p = 0,003$), дефензин ($N = 17,775$; $p = 0,001$), абецин ($N = 18,439$; $p = 0,001$) и апидецин ($N = 19,938$; $p < 0,001$), док је код експресије вителогенина разлика била статистички значајна ($N = 12,089$; $p = 0,017$).

Mann-Whitney U тестом утврђено је да је експресија абецина (график 37) била најнижа у групи F и то статистички значајно нижа у односу на све друге групе: I ($z = 2,089$; $p = 0,037$), I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-F3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), али и у групи I-F6 односу на групе I-F1 ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и I-F3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), као и у групи I у односу на I-F3 ($z = 2,089$; $p = 0,037$). Када је реч о нивоу експресије хименоптецина (график 38), она је била статистички значајно нижа у групи I у односу на групе I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-F3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), али и статистички значајно виша у групи I-F1 у односу на групе I-F1 ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и I-F6 ($z = 2,089$; $p = 0,037$).



Графици 37. и 38: Нивои експресије гена за абедцин и хименоптецин код пчела жртвованих петнаестог дана

Експресија гена за дефензин (график 39) била је статистички значајно нижа у групи F у односу на I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-F3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), али и у групи I у односу на I-F1 ($z = 2,089$; $p = 0,037$) и I-F3 ($z = 2,089$; $p = 0,037$), као и у групи I-F6 у односу на групе I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F3 ($z = 2,298$; $p = 0,022$). Нивои експресије гена за апидецин (график 40) били су статистички значајно нижи у групи I у односу на групе I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-F3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F6 ($z = 2,298$; $p = 0,022$), као и у групи F у односу на исте групе: I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-F3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-F6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), али и у групи I-F6 у односу на групу I-F1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



Графици 39. и 40: Нивои експресије гена за дефензин и апидецин код пчела жртвованих петнаестог дана

Ниво експресије гена за вителогенин (график 41) био је највиши у групи I-F3 и то статистички значајно виши у односу на све остале групе: I ($z = 2,089$; $p = 0,037$), F ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-F1 ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и I-F6 ($z = 2,089$; $p = 0,037$).

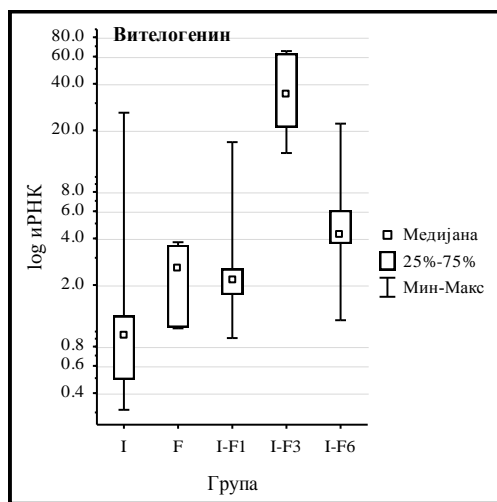
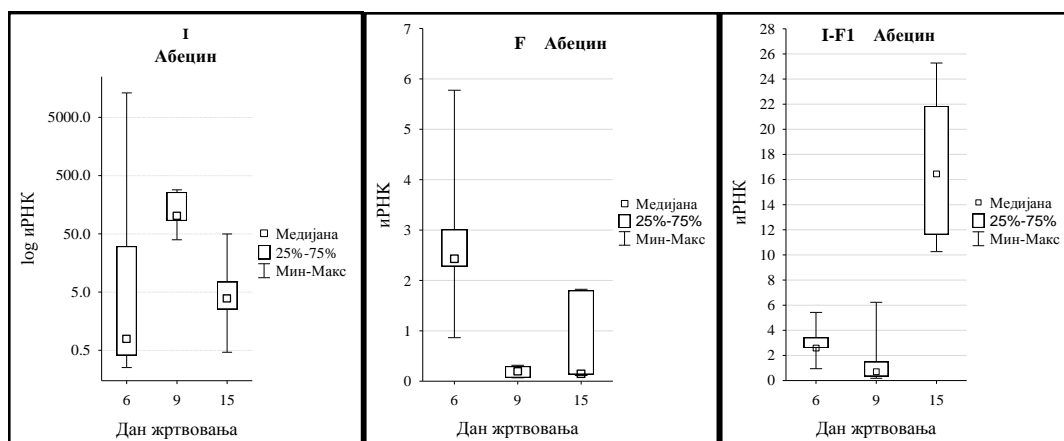


График 41: Нивои експресије гена за вителогенин код пчела жртвованих петнаестог дана

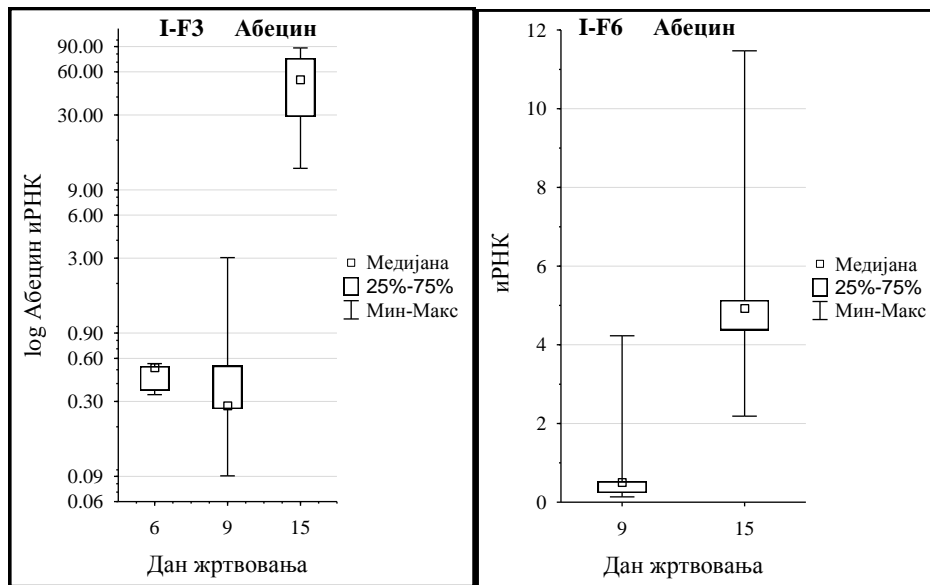
Нивои експресије гена у оквиру исте групе у различитим моментима узорковања пчела

Анализом нивоа експресије гена за абецин Kruskal-Wallis тест показао је статистички веома значајну разлику у групама I-F1 ($H = 10,238$; $p = 0,006$) и I-F6 ($H = 9,620$; $p = 0,008$); статистички значајна разлика забележена је у групи F ($H = 8,340$; $p = 0,016$), док у групи I није било статистички значајне разлике ($H = 5,420$; $p = 0,067$). Према резултатима Mann-Whitny U теста, у групи У групи I експресија гена за абецин (график 42) била је статистички значајно нижа петнаестог у односу на девети дан ($z = 2,402$; $p = 0,016$). У групи F експресија абецина (график 43) била је статистички значајно виша шестог у односу на девети ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и петнаести дан ($z = 2,089$; $p = 0,037$). У групи I-F1 експресија абецина (график 44) била је највиша петнаестог дана, и то статистички значајно, како у односу на шести ($z = 2,514$; $p = 0,012$), тако и на девети дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



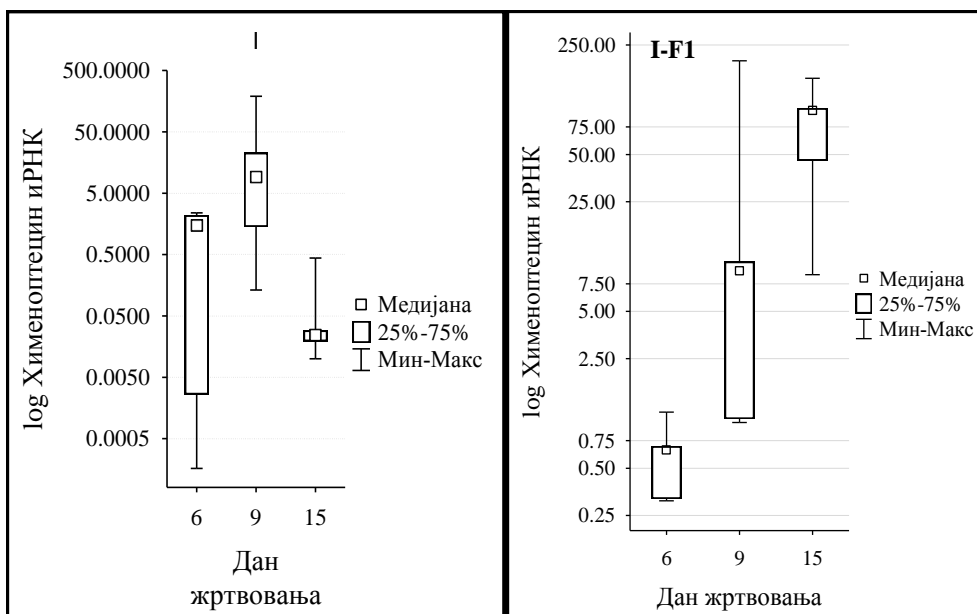
Графици: 42., 43. и 44: Нивои експресије гена за абецин у групама I, F и I-F1 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-F3 (график 45), такође је експресија била статистички значајно виша петнаестог у односу на шести ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и девети дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$); али и у групи I-F6 (график 46), статистички значајно виша петнаестог у односу на девети ($z = 2,298$; $p = 0,022$) дан.



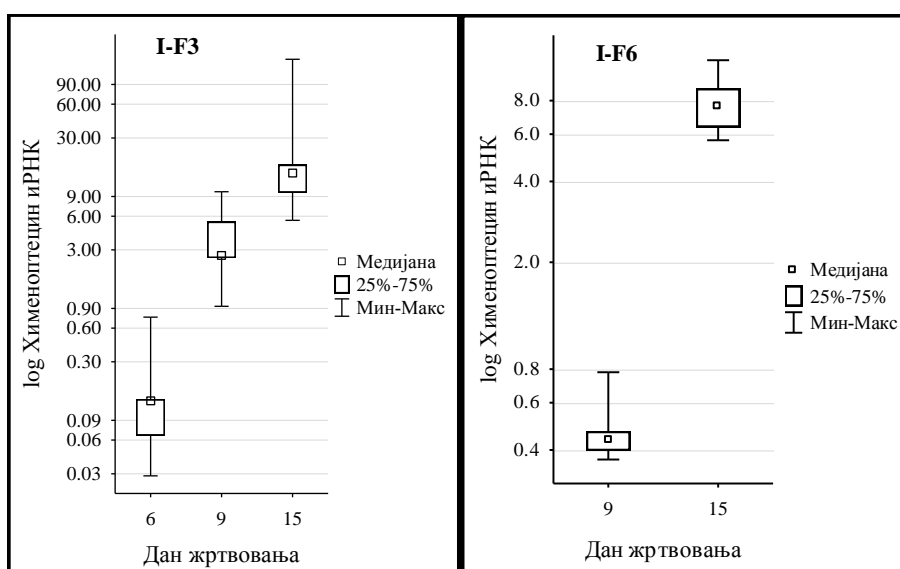
Графици: 45. и 46: Нивои експресије гена за абецин у групама I-F3 и I-F6 у различитим моментима жртвовања пчела

Резултати Kruskal-Wallis теста показали су статистички значајну разлику у експресији гена за хименоптецин код пчела из I-F1 ($N = 8,780$; $p = 0,012$) групе, док је разлика била статистички веома значајна у групи I-F3 ($N = 11,580$; $p = 0,003$), а у групама I ($N = 5,360$; $p = 0,069$) и F ($N = 2,540$; $p = 0,281$) није било статистички значајне разлике. Анализом експресије гена за хименоптецин помоћу Mann-Whitney U теста утврђено је следеће: у групи I ниво хименоптецина (график 47) био статистички значајно нижи код пчела жртвованих 15. дана у односу на оне жртвоване 9. дана ($z = 2,402$; $p = 0,016$); у групи I-F1 (график 48) била је најнижа шестог дана, и то статистички значајно нижа у односу на девети ($z = 2,089$; $p = 0,037$) и петнаести дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$)



Графици: 47. и 48: Нивои експресије гена за хименоптецин у групама I и I-F1 у различитим моментима жртвовања пчела

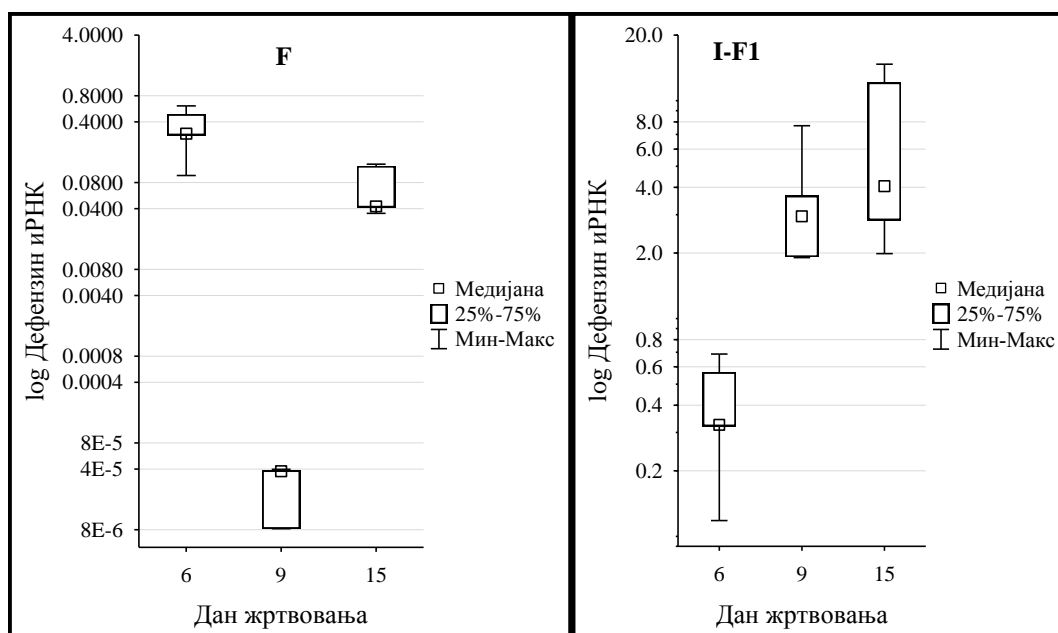
у групи I-F3 (график 49) била је статистички значајно виша у другом у односу на прво жртвовање ($z = 2,507$; $p = 0,012$), трећег у односу на друго ($z = 2,089$; $p = 0,037$), али и у односу на прво жртвовање ($z = 2,507$; $p = 0,012$); у I-F6 (график 50) значајно виша петнаестог у односу на девети дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



Графици: 49. и 50: Нивои експресије гена за хименоптецин у групама I-F3 и I-F6 у различитим моментима жртвовања пчела

Нивои експресије гена за дефензин према резултатима Kruskal-Wallis теста статистички су се веома значајно разликовали у групама: F ($H = 11,580$; $p = 0,003$), I-F1 ($H = 9,980$; $p = 0,007$) и I-F3 ($H = 10,220$; $p = 0,006$), док у групи I није било статистички значајне разлике ($H = 3,980$; $p = 0,137$).

Резултати Mann-Whitny U теста показали су да је ниво експресије гена за дефензин у групи F (график 51) био статистички значајно нижи деветог у односу на шести ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и петнаести дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$), али и петнаестог у односу на шести дан ($z = 2,089$; $p = 0,037$); у групи I-F1 (график 52) статистички је било значајно нижи шестог у односу на девети ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и петнаести дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$);



Графици: 51. и 52: Нивои експресије гена за дефензин у групама F и I-F1 у различитим моментима жртвовања пчела

у групи I-F3 експресија гена за дефензин (график 53) је била најнижа шестог дана и то статистички значајно нижа у односу на девети ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и петнаести дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$); У групи I-F6 није било статистички значајне разлике ($z = 1,462$; $p = 0,144$).

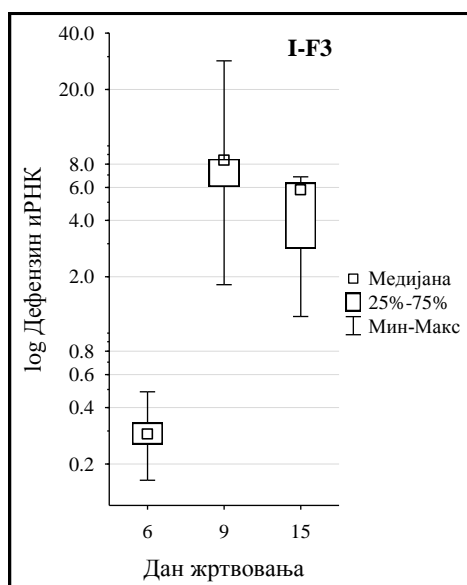
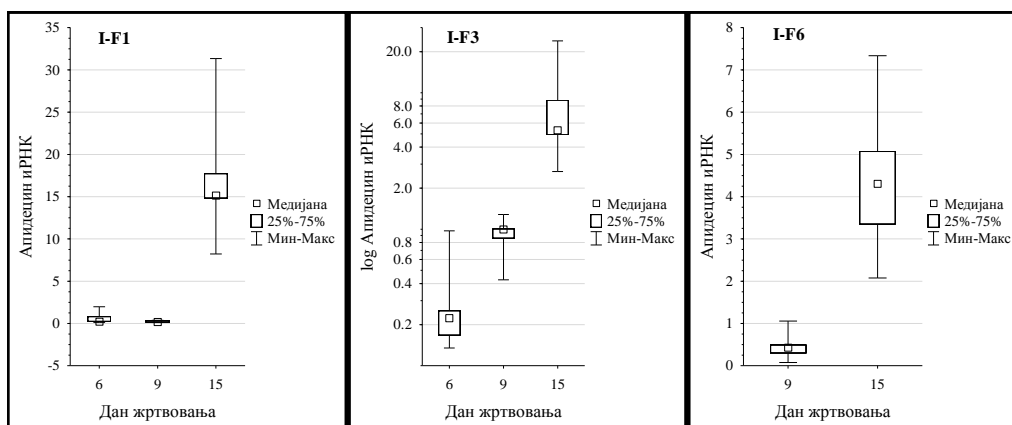


График 53: Нивои експресије гена за дефензин у групи I-F3 у различитим моментима жртвовања пчела

Kruskal-Wallis тестом анализирана је и експресија гена за апидецин и утврђена статистички веома значајна разлика између експресије у групама I-F1 ($N = 9,980$; $p = 0,007$) и I-F3 ($N = 11,580$; $p = 0,003$), док у групама I ($N = 2,000$; $p = 0,368$) и F ($N = 2,750$; $p = 0,253$) није било статистички значајне разлике. Резултати Mann-Whitney U теста открили су да је ниво експресије гена за апидецин био: у групи I-F1 (график 54) статистички значајно виши петнаестог у односу на шести ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и девети ($z = 2,507$; $p = 0,012$) дан; у групи I-F3 (график 55) био је највиши петнаестог дана и то статистички значајно виши у односу на шести ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и девети ($z = 2,507$; $p = 0,012$) дан, али и статистички значајно виши деветог дана у

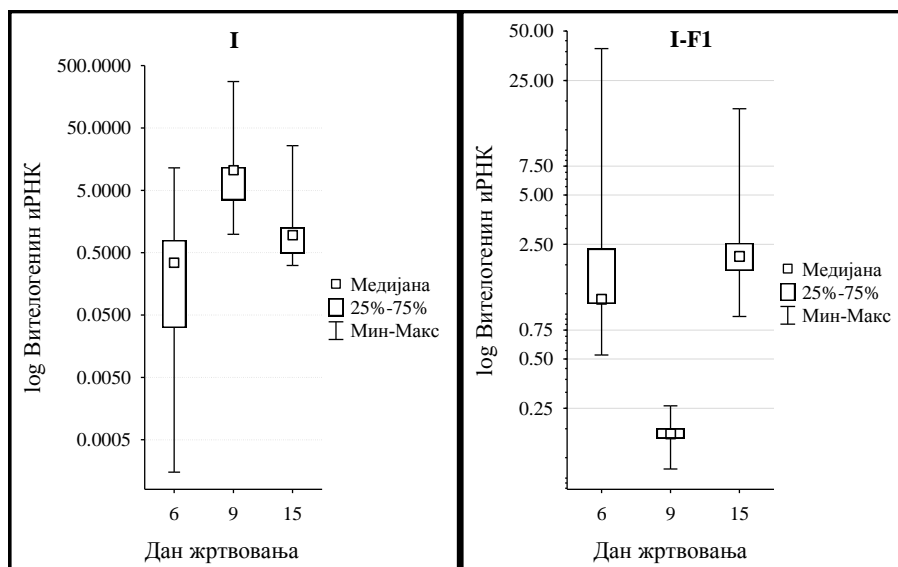
односу на шести ($z = 2,089$; $p = 0,037$); у групи I-F6 ниво експресије (график 56) је растао кроз време и био је значајно виши петнаестог у односу на девети дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$).

Kruskal-Wallis тестом извршено је тестирање разлика у експресији гена за вителогенин у три различита момента узорковања. Ова тестирања показала су да је статистички веома значајне разлике биле у групама I-F1 ($H = 9,500$; $p = 0,009$) и I-F3 ($H = 9,780$; $p = 0,008$), док у групама I ($H = 5,180$; $p = 0,075$) и F ($H = 4,940$; $p = 0,085$) није било статистички значајне разлике.



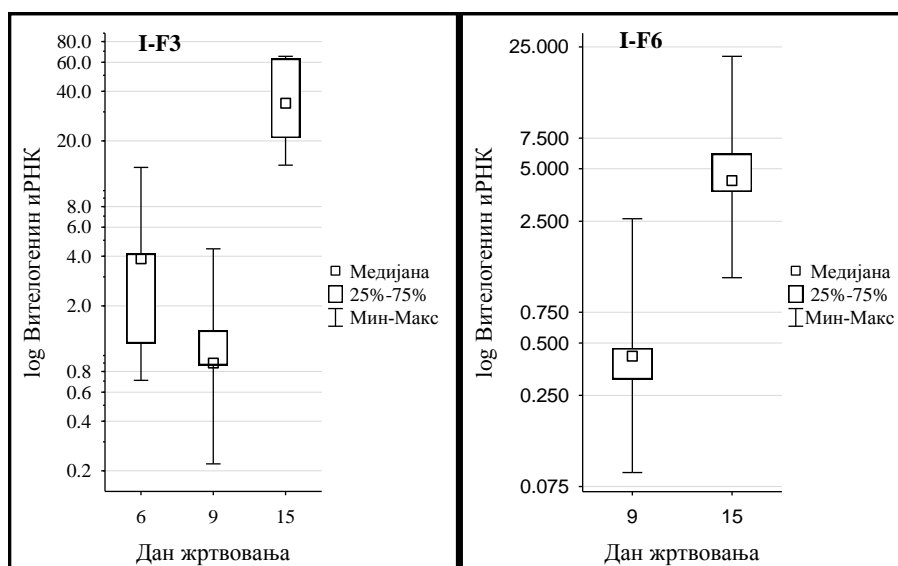
Графици 54., 55. и 56: Нивои експресије гена за апидецин у групама I-F1, I-F3 и I-F6 у различитим моментима жртвовања пчела

Резултати Mann-Whitney U теста показали су да је у групи I експресија гена за вителогенин (график 57) била статистички значајно виша деветог у односу на шести дан ($z = 1,984$; $p = 0,047$); док је у групи I-F1 (график 58) била статистички значајно нижа деветог у односу на шести ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и петнаести ($z = 2,507$; $p = 0,012$) дан.



Графици 57. и 58: Нивои експресије гена за вителогенин у групама I и I-F1 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-F3 експресија гена за вителогенин (график 59) је била статистички значајно виша петнаестог, како у односу на шести ($z = 2,507$; $p = 0,012$), тако и у односу на девети дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$). У групи I-F6 (график 60) експресија је била статистички значајно виша петнаестог у односи на девети дан ($z = 2,298$; $p = 0,022$).

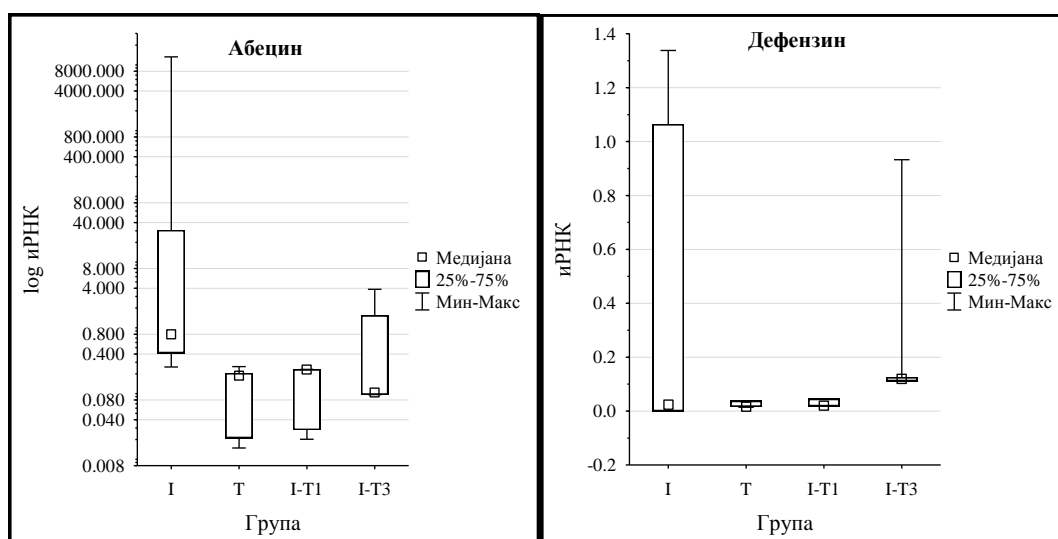


Графици 59. и 60: Нивои експресије гена за вителогенин у групама I-F3 и I-F6 у различитим моментима жртвовања пчела

5. 4. 2. Експресија гена значајних за имунитет код пчела из група храњених уз додатак тимола

Поређење нивоа експресије појединачних гена међу различитим експерименталним групама у истим моментима жртвовања пчела

Експресија гена код пчела које су храњене тимолом, а жртвоване 6 дана након излегања, према резултатима Kruskal-Wallis теста статистички се веома значајно разликовала за ген који кодира синтезу вителогенина ($H = 12,812$; $p = 0,005$), док је код гена за синтезу абецина разлика била статистички значајна ($H = 8,121$; $p = 0,044$), а за гене дефензин ($H = 6,764$; $p = 0,078$), хименоптецин ($H = 2,366$; $p = 0,500$) и апидецин ($H = 1,174$; $p = 0,759$) није било статистички значајне разлике. Резултати Mann-Whitney U теста показали су да је у том тренутку експресија гена за абецин (график 61) била статистички значајно виша у групи I у односу на групе T ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и I-T1 ($z = 2,514$; $p = 0,012$). Експресија гена за дефензин (график 62) била је статистички значајно виша у групи I-T3 у односу на T ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-T1 ($z = 2,530$; $p = 0,011$).



Графици 61. и 62: Нивои експресије гена за абецин и дефензин код пчела жртвованих шестог дана

Осим тога, и експресија гена за вителогенин (график 63) била је статистички значајно виша у групи I-T3 у односу на све остале групе: I ($z = 2,514$; $p = 0,012$), T ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-T1 ($z = 2,530$; $p = 0,011$).

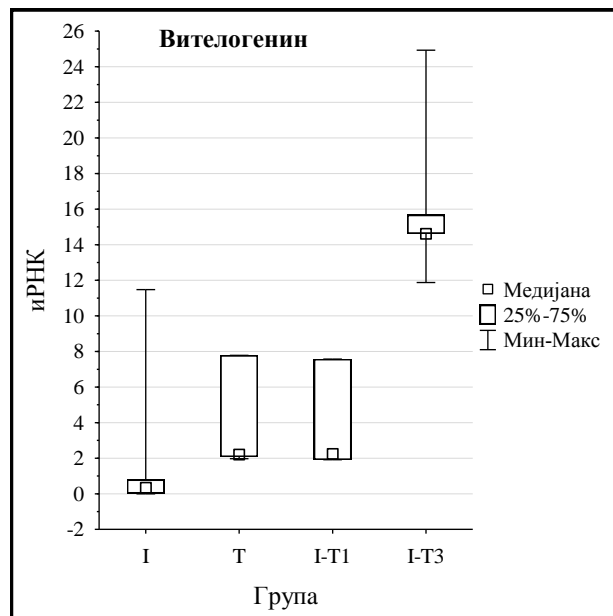
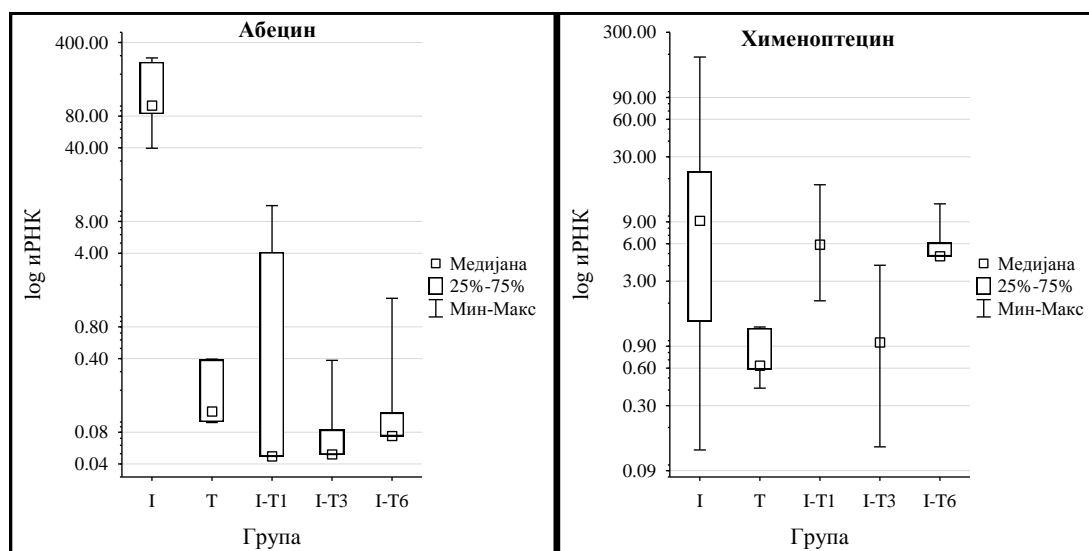


График 63: Нивои експресије гена за вителогенин код пчела жртвованих шестог дана

Код пчела жртвованих 9. дана Kruskal-Wallis тест показао је статистички веома значајну разлику између анализираних група у експресији гена за абецин ($N = 13,539$; $p = 0,009$), вителогенин ($N = 17,422$; $p = 0,002$) и дефензин ($N = 14,786$; $p = 0,005$). Статистички значајна разлика забележена код експресије гена за апидецин ($N = 12,146$; $p = 0,016$) и хименоптецин ($N = 12,369$; $p = 0,016$).

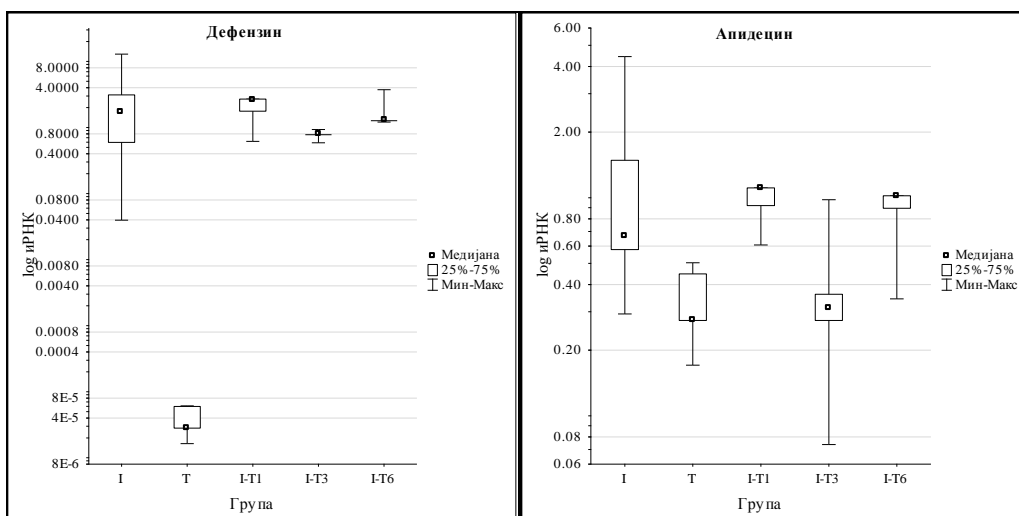
Анализом резултата помоћу Mann-Whitney U теста установљено је да је експресија гена за абецин (график 64) била највиша код групе инфициране ноземом (I) и то статистички значајно у односу на све остале групе T ($z = 2,507$; $p = 0,012$), T ($z = 2,538$; $p = 0,011$), I-T1 ($z = 2,538$; $p = 0,011$) и I-T6 ($z = 2,538$; $p = 0,011$). Експресија гена за хименоптецин (график 65) била је статистички значајно нижа код пчела из групе T у односу на групе

I-T1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-T6 ($z = 2,514$; $p = 0,012$), али и у групи I-T3 у односу на исте групе: I-T1 ($z = 2,312$; $p = 0,021$) и I-T6 ($z = 2,522$; $p = 0,012$).



Графици 64. и 65: Нивои експресије гена за абецид и хименоптецин код пчела жртвованих деветог дана

Када је реч о експресији гена за дефензин (график 66), Mann-Whitney U тест је показао најнижи ниво експресије у групи Т и то статистички значајно нижи у односу на све остале групе: I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-T1 ($z = 2,538$; $p = 0,011$), I-T3 ($z = 2,538$; $p = 0,011$) и I-T6 ($z = 2,538$; $p = 0,011$), осим тога, био је статистички значајно нижи у групи I-T3 у односу на групу I-T6 ($z = 2,570$; $p = 0,010$). Резултати истог теста показали су и статистички значајно нижу експресију гена за апидецин (график 67) код Т групе у односу на групе I ($z = 2,095$; $p = 0,036$), I-T1 ($z = 2,546$; $p = 0,011$) и I-T6 ($z = 2,102$; $p = 0,036$), али у у групи I-T3 у односу на групу I-T1 ($z = 2,115$; $p = 0,034$). Нивое експресије гена за вителогенин (график 68) били су статистички значајно виши у групи I у односу на групе Т ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-T1 ($z = 2,538$; $p = 0,011$) и I-T3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), поред тога нивои су били статистички значајно нижи у групи I-T3 у односу на I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), Т ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-T1 ($z = 2,326$; $p = 0,020$).



Графици 65. и 67: Нивои експресије гена за дефензин и апидецин код пчела жртвованих деветог дана

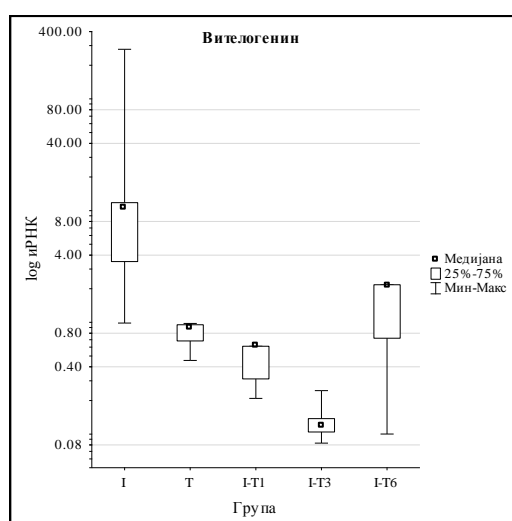


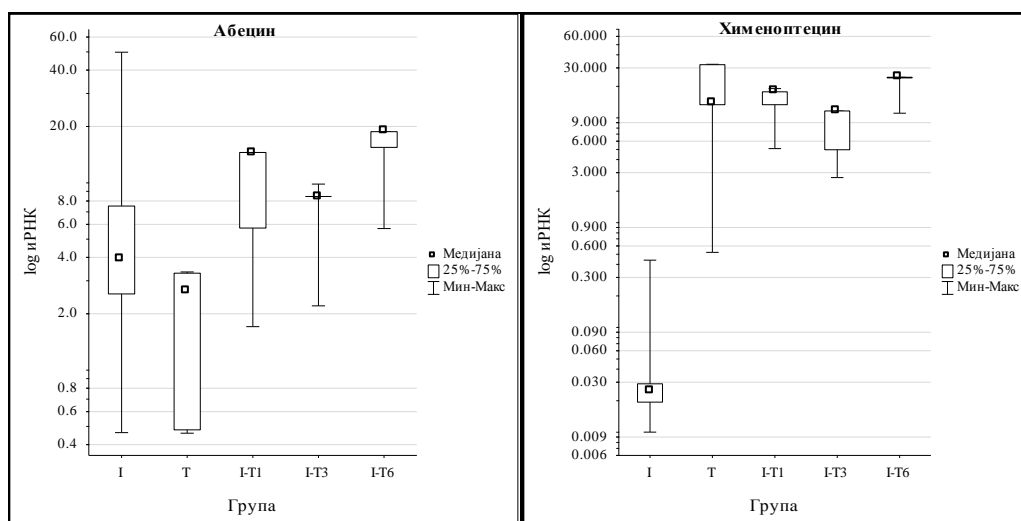
График 68: Нивои експресије гена за вителогенин код пчела жртвованих деветог дана

Анализа пчела жртвованих 15. дана Kruskal-Wallis тестом показала је статистички веома значајну разлику међу групама код гена за хименоптецин ($N = 15,640$; $p = 0,004$), дефензин ($N = 19,851$; $p < 0,001$) и

апидецин (N = 17,209; p = 0,002), разлика је била статистички значајна код експресије гена за абецин (N = 10,414; p = 0,034) док статистички значајна разлика међу групама није постојала код гена за вителогенин (N = 8,796; p = 0,066).

Појединачним поређењем вредности експресије гена за абецин (график 69) помоћу Mann-Whitney U теста доказана је статистички значајно нижа експресија у групи Т у односу на групу I-T6 (z = 2,514; p = 0,012).

Анализом експресије гена за хименоштецин (график 70) утврђена је најнижа експресија у групи I која је статистички значајно нижа у односу на све остале групе: Т (z = 2,507; p = 0,012), I-T1 (z = 2,514; p = 0,012), I-T3 (z = 2,514; p = 0,012) и I-T6 (z = 2,538; p = 0,011).

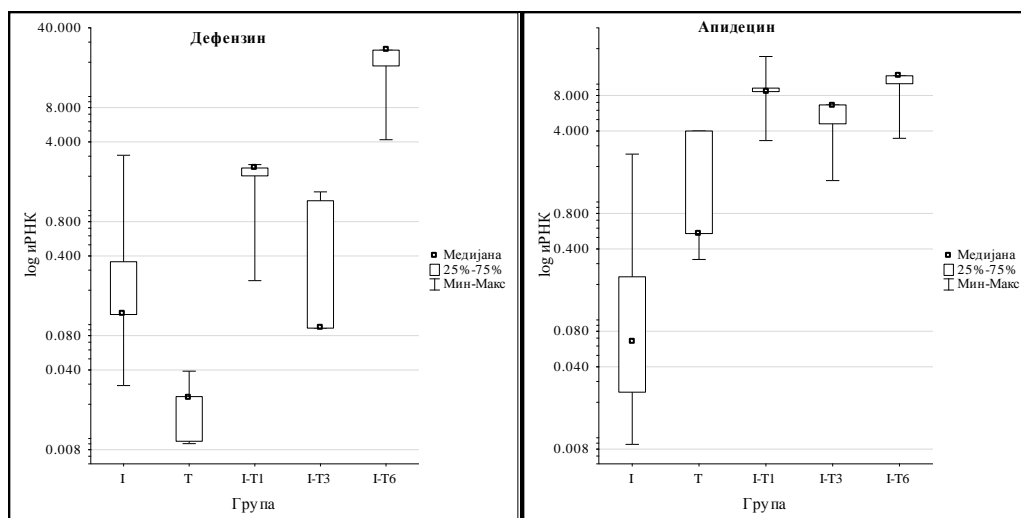


Графици 69. и 70: Нивои експресије гена за абецин и хименоштецин код пчела жртвованих петнаестог дана

Ниво експресије гена за дефензин (график 71) био је најнижи у групи Т, и то статистички значајно нижи у односу на све остале групе: I (z = 2,298; p = 0,022), I-T1 (z = 2,514; p = 0,012), I-T3 (z = 2,514; p = 0,012) и I-T6 (z = 2,514; p = 0,012). Највиши ниво експресије био је у групи I-T6 и то статистички

значајно у односу на све остале групе: I ($z = 2,514$; $p = 0,012$), T ($z = 2,514$; $p = 0,012$), I-T1 ($z = 2,522$; $p = 0,012$) и I-T3 ($z = 2,522$; $p = 0,012$). осимм тога био је и статистички значајно нижи у групи I-T3 у односу на групу I-T1 ($z = 2,102$; $p = 0,036$).

Када је реч о нивоима експресије гена за апидецин (график 72), према резултатима Mann-Whitney U теста, она је била статистички значајно нижа у групи I у односу на групе I-T1 ($z = 2,514$; $p = 0,012$), I-T3 ($z = 2,305$; $p = 0,021$) и I-T6 ($z = 2,538$; $p = 0,011$), али и у групи T у односу на исте групе : I-T1 ($z = 2,095$; $p = 0,036$), I-T3 ($z = 2,095$; $p = 0,036$) и I-T6 ($z = 2,115$; $p = 0,034$).



Графици 71. и 72: Нивои експресије гена за дефензин и апидецин код пчела жртвованих петнаестог дана

Експресија гена за вителогенин (график 73) била је статистички значајно нижа у групи I-T3 у односу на групу I-T1 ($z = 2,522$; $p = 0,012$).

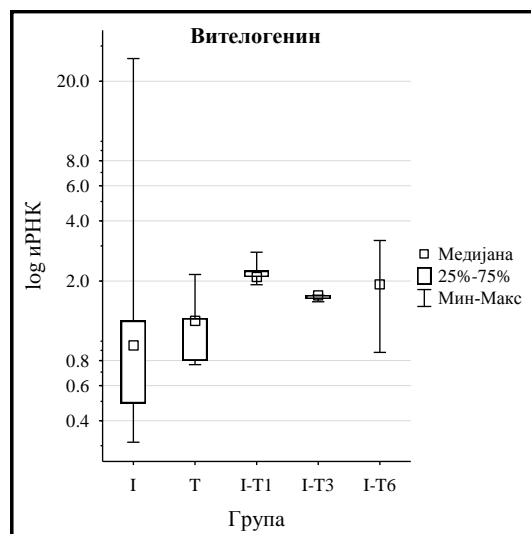
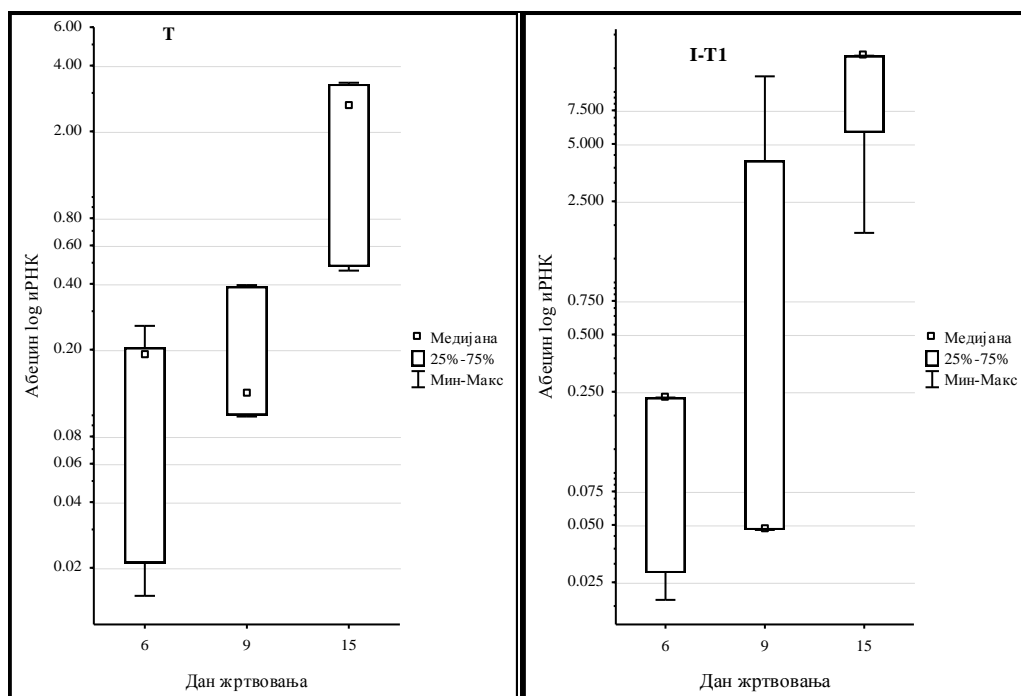


График 73: Нивои експресије гена за вителогенин код пчела жртвованих петнаестог дана

Нивои експресије гена у оквиру исте групе у различитим моментима узорковања пчела

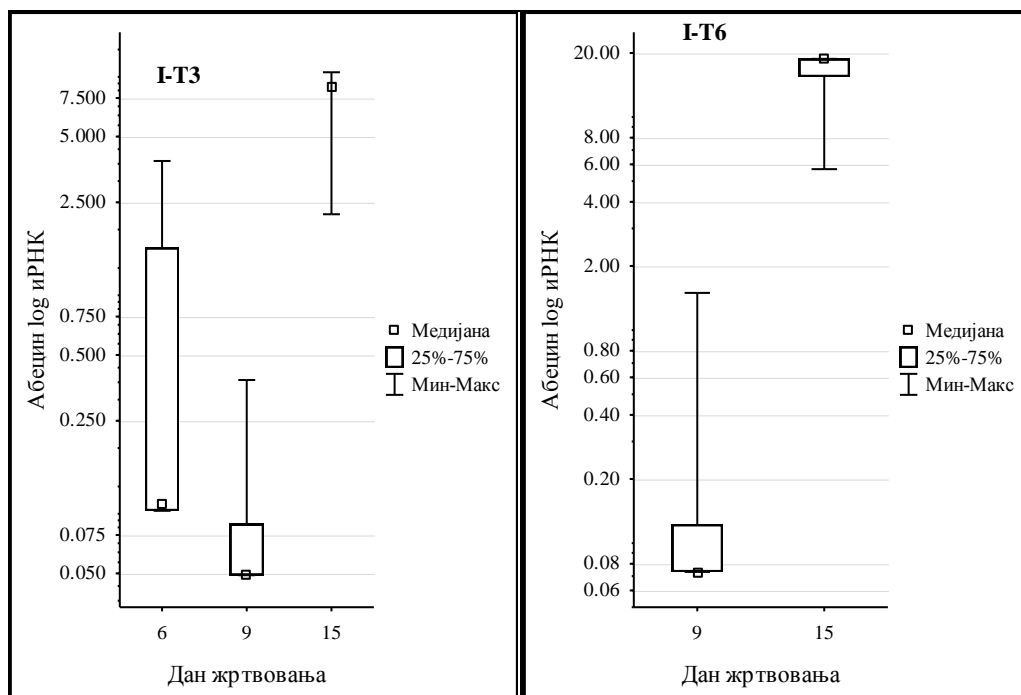
Анализом нивоа експресије гена за абецин Kruskal-Wallis тест показао је статистички веома значајну разлику у групи Т ($N = 9,620$; $p = 0,008$) и I-T3 ($N = 10,755$; $p = 0,005$), док је разлика била статистички значајна у групи I-T1 ($N = 7,887$; $p = 0,019$), док статистички значајних разлика није било у групи I ($N = 5,420$; $p = 0,067$).

Нивои експресије гена за абецин, према резултатима Mann-Whitney U теста статистички су се значајно разликовали у следећим случајевима у инфицираној групи (I) ниво експресије абецина (график 42) статистички је значајно био нижи код пчела инфицираних 15. у односу на 9. дан ($z = 2,402$; $p = 0,016$); у групи Т (график 74) статистички значајно виши ниво експресије био је 15. дана у односу на 6. ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 9. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$); у групи I-T1 (график 75) највећа експресија гена за абецин забележена је 15. дана, када је била статистички значајно виша у односу на 6. дан ($z = 2,506$; $p = 0,011$);



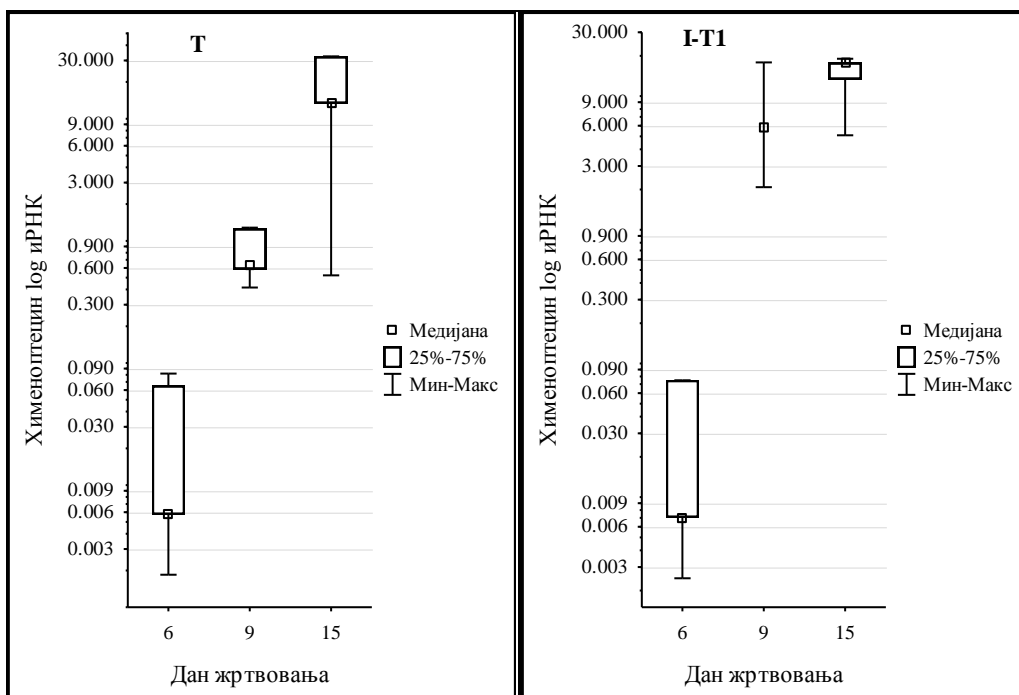
Графици 74. и 75: Нивои експресије гена за абецин у групама Т и I-T1 у различитим моментима жртвовања пчела

у групи I-T3 (график 76) експресија гена за абецин је била статистички значајно виша 15. у односу на 6. ($z = 2,506$; $p = 0,011$) и 9. дан ($z = 2,506$; $p = 0,011$); у групи I-T6 (график 77) експресији гена за абецин, била је статистички значајно виша код пчела жртвованих 15. у односу на 9. дан ($z = 2,546$; $p = 0,011$). Анализом помоћу Kruskal-Wallis теста утврђено је да се разлика у нивоима експресије гена за хименоптецин статистички веома значајно разликовала у групама Т ($H = 10,820$; $p = 0,005$), I-T1 ($H = 10,052$; $p = 0,007$) и I-T3 ($H = 11,120$; $p = 0,004$), док у групи I није било статистички значајних разлика ($H = 5,360$; $p = 0,069$).

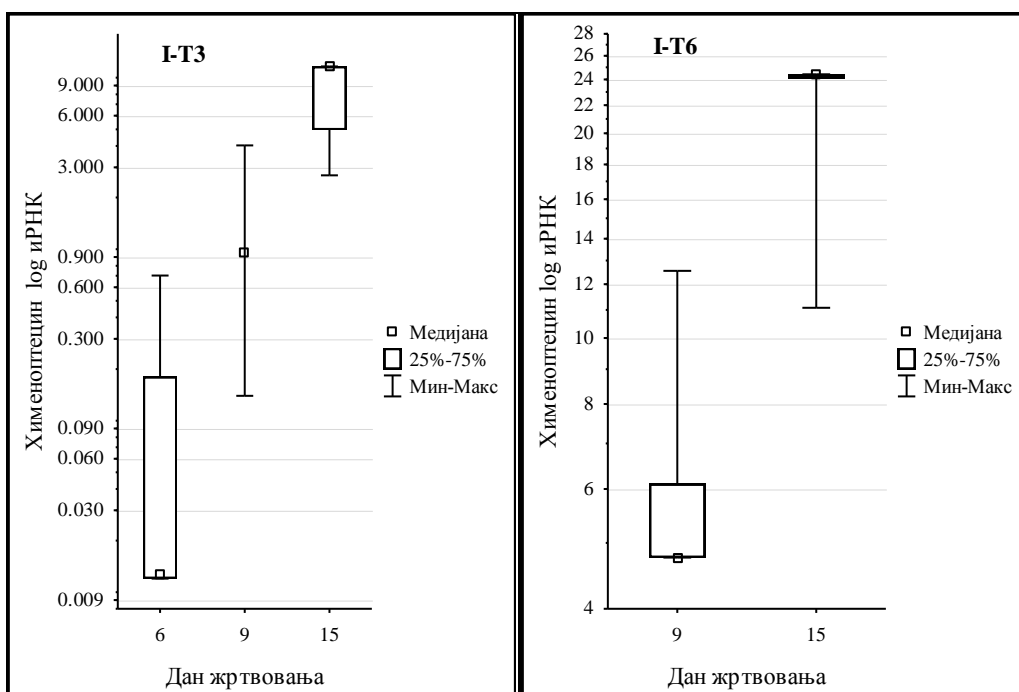


Графици 76. и 77: Нивои експресије гена за абецин у групама I-T3 и I-T6 у различитим моментима жртвовања пчела

Коришћењем Mann-Whitney U теста утврђено је да је у групи I ниво хименоштецина (график 47) био статистички значајно нижи код пчела жртвованих 15. дана у односу на оне жртвоване 9. дана ($z = 2,402$; $p = 0,016$). У групи T (график 78) вредности су биле статистички значајно више 15. дана у односу на 6. ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 9. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$). У групи I-T1 (график 79) ниво хименоштецина био је статистички значајно нижи 6. дана у односу на 9. ($z = 2,530$; $p = 0,011$), и 15. дан ($z = 2,530$; $p = 0,011$). У групи I-T3 15. дана (график 80) забележена је највиша експресија гена за хименоштецин и то статистички значајно виша у односу на 6. ($z = 2,522$; $p = 0,012$) и 9. дан ($z = 2,312$; $p = 0,021$), али и статистички значајно виша и 9. у односу на 6. дан ($z = 2,102$; $p = 0,036$). У групи I-T6 (график 81) нивои експресије гена за хименоштецин, према резултатима Mann-Whitney U теста били су статистички значајно нижи код пчела жртвованих 9. у односу на 15. дан ($z = 2,333$; $p = 0,020$).



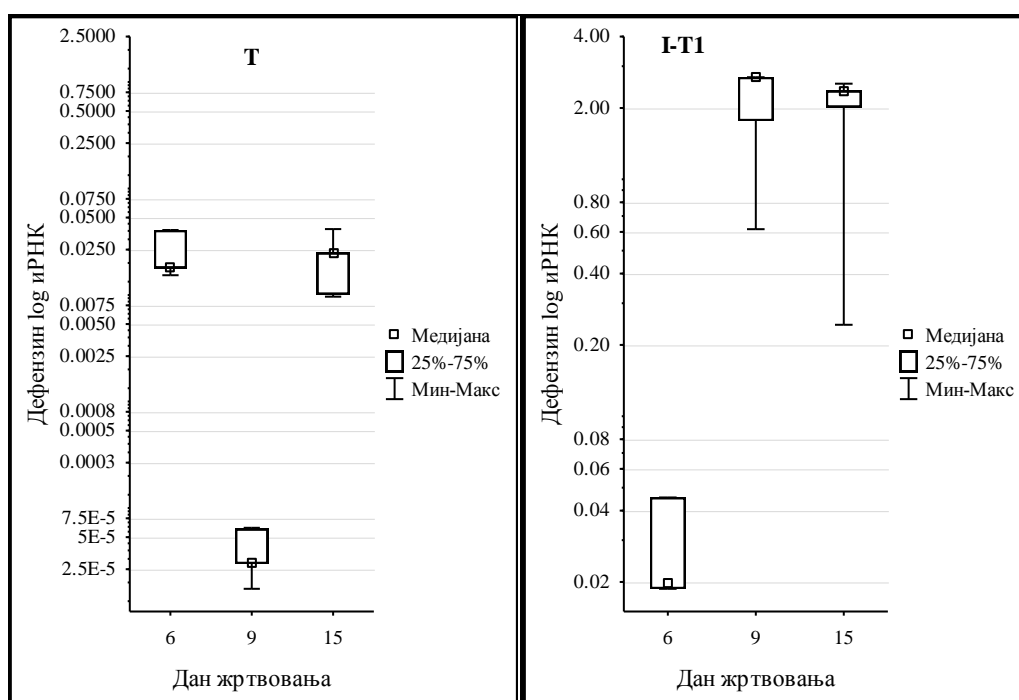
Графици 78. и 79: Нивои експресије гена за хименоптецин у групама Т и I-T1 у различитим моментима жртвовања пчела



Графици 80. и 81: Нивои експресије гена за хименоптецин у групама I-T3 и I-T6 у различитим моментима жртвовања пчела

Нивои експресије гена за дефензин према резултатима Kruskal-Wallis теста у групама Т (Н = 9,420; $p = 0,009$) и I-T1 (Н = 9,904; $p = 0,007$) су се статистички веома значајно разликовали, док у групама I (Н = 3,980; $p = 0,137$) и I-T3 (Н = 1,676; $p = 0,433$) није било статистички значајне разлике.

Mann-Whitney U тест показао је да је у групи Т (график 82) експресија била најнижа код пчела жртвованих 9. дана када је овај ниво био статистички значајно нижи у односу на 6. ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 15. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$). У групи I-T1 (график 83) статистички значајно ниже вредности дефензина забележене су 6. у односу на 9. ($z = 2,554$; $p = 0,011$) и 15. дан ($z = 2,530$; $p = 0,011$).



Графици 82. и 83: Нивои експресије гена за дефензин у групама Т и I-T1 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-T6 (график 84) нивои експресије гена за дефензин, према резултатима Mann-Whitney U теста били су статистички значајно виши код пчела жртвованих 15. у односу на 9. дан ($z = 2,546$; $p = 0,011$).

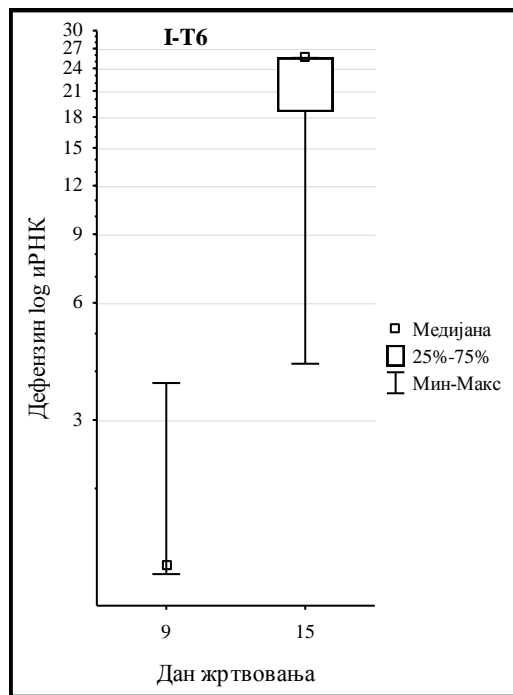
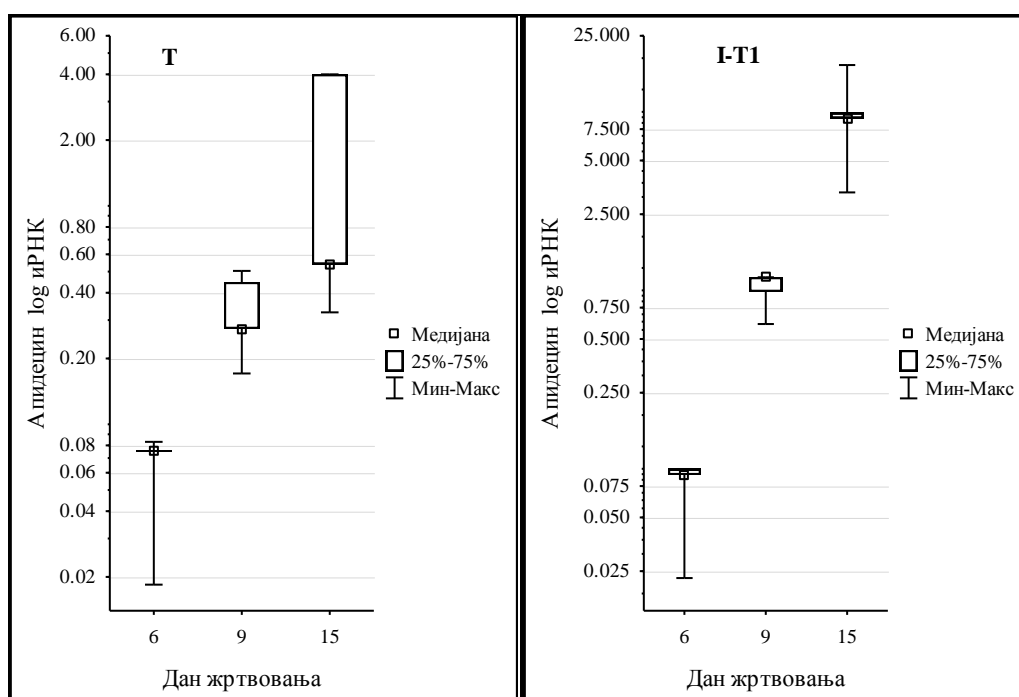


График 84: Нивои експресије гена за дефензин у групи I-T6 у различитим моментима жртвовања пчела

Анализирајући експресију гена за апидецин помоћу Kruskal-Wallis теста примећено је да је она била статистички веома значајно различита у групама T ($N = 11,600$; $p = 0,003$), I-T1 ($N = 12,658$; $p = 0,002$), и I-T3 ($N = 10,257$; $p = 0,006$), док у групи I није било статистички значајне разлике ($N = 2,000$; $p = 0,368$).

Резултати Mann-Whitney U теста показали су да је експресија гена за апидецин у T групи (график 85) била највиша код пчела жртвованих 15. дана, што је статистички значајно више у односу на 9. ($z = 2,095$; $p = 0,036$) и 15. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$) али је била статистички значајно виша и 9. у односу на 6. дан ($z = 2,514$; $p = 0,012$). У групи I-T1 (график 86) експресија апидецина такође је била највиша 15. дана, и то статистички значајно

виша него 9. дана ($z = 2,546$; $p = 0,011$) и 6. дана ($z = 2,530$; $p = 0,011$), као и 9. дана у односу на 6. дан ($z = 2,554$; $p = 0,011$).

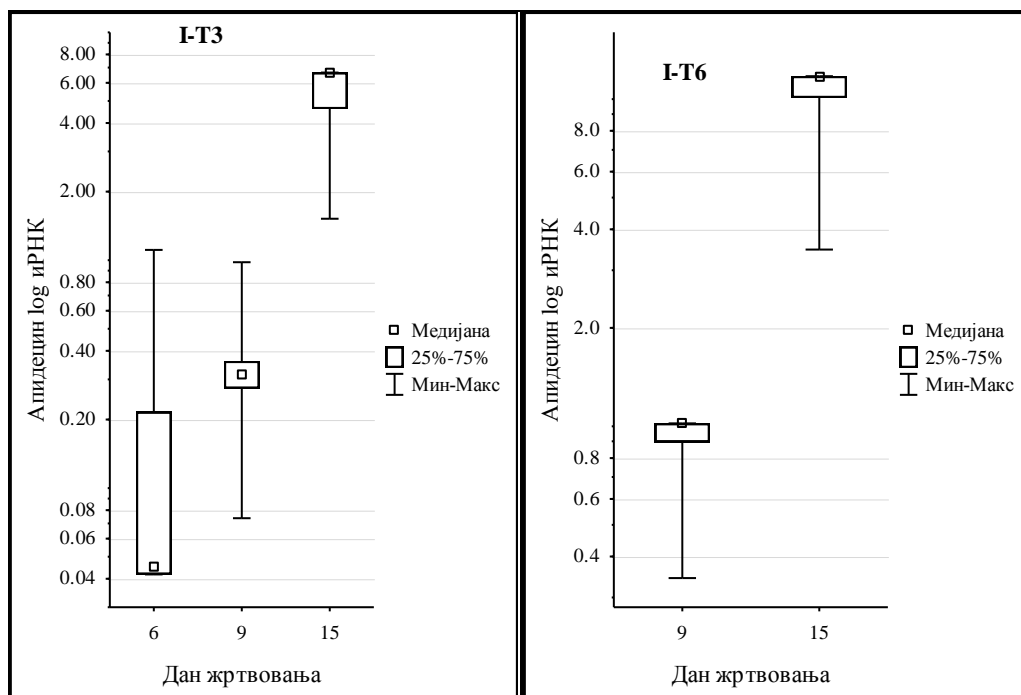


Графици 85. и 86: Нивои експресије гена за апидецин у групама Т и I-T1 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-T3 ниво апидецина (график 87) био је статистички значајно виши 15. у односу на 9. дан ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и 6. дан ($z = 2,522$; $p = 0,012$).

У групи I-T6 нивои експресије гена за апидецин (график 88), према резултатима истог теста били су статистички значајно виши 15. дана у односу на 9. дан ($z = 2,546$; $p = 0,011$).

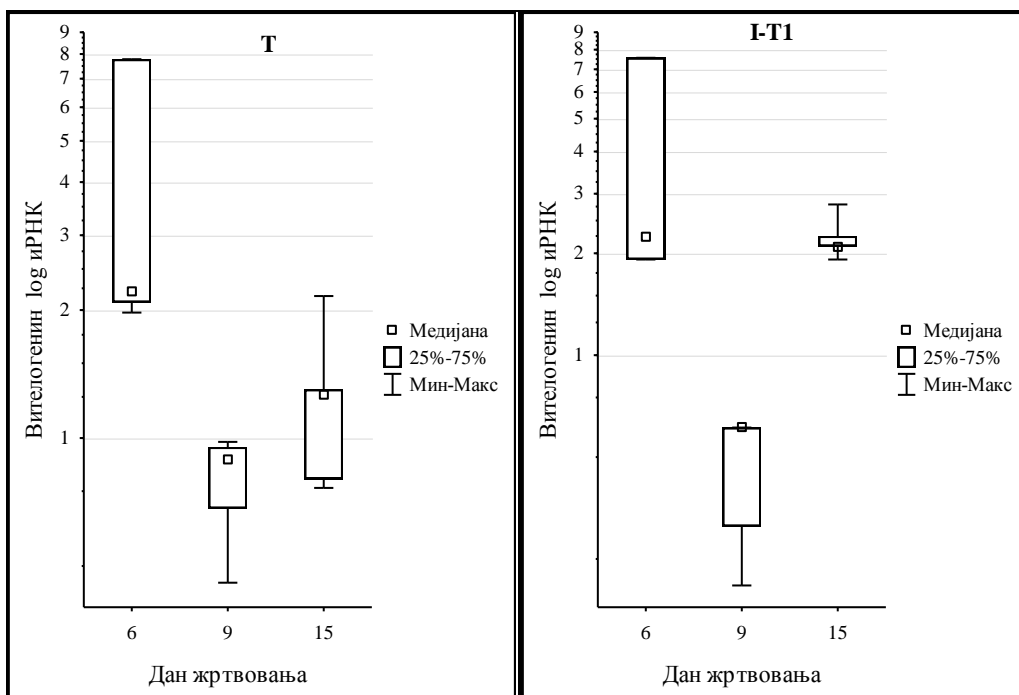
Анализирајући експресију гена за вителогенин помоћу Kruskal-Wallis теста примећено је да је она била статистички веома значајно различита у групама I-T1 ($H = 9,539$; $p = 0,009$), и I-T3 ($H = 12,545$; $p = 0,002$), статистички значајно различита у групи Т ($H = 9,060$; $p = 0,011$), док у групи I није било статистички значајне разлике ($H = 5,180$; $p = 0,075$).



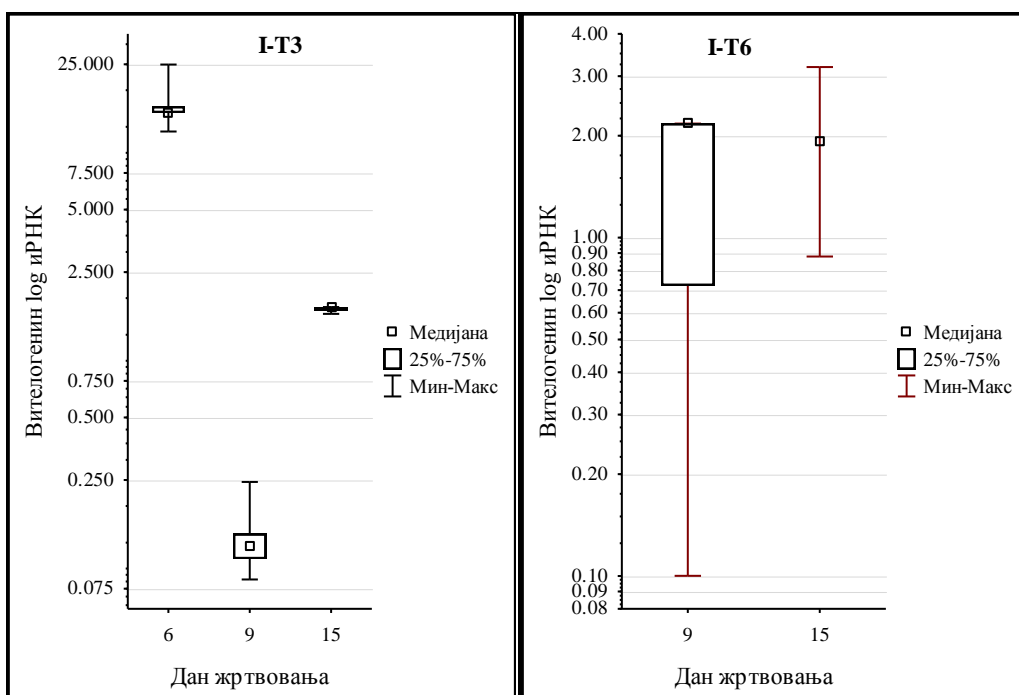
Графици 87. и 88: Нивои експресије гена за апидецин у групама I-T3 и I-T6 у различитим моментима жртвовања пчела

Анализа вредности за експресију вителогенина помоћу Mann-Whitney U теста дала је следеће резултате: у инфоцираној (I) групи (график 57) експресија је била статистички значајно већа у другом жртвовању и односу на прво ($z = 1,984$; $p = 0,047$). У групи T која је храњена уз додатак тимола (график 89) експресија је била највиша 6. дана и то статистички значајно виша у односу на 9. ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 15. ($z = 2,089$; $p = 0,037$) дан. У групи I-T1 (график 90) ниво експресије вителогенина био је статистички значајно нижи 9. дана у односу на 6. дан ($z = 2,554$; $p = 0,011$) и 15. дан ($z = 2,546$; $p = 0,011$).

У групи I-T3 (график 91) ниво експресије за вителогенин је био статистички значајно нижи 9. дана у односу на 6. дан ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и 15. дан ($z = 2,514$; $p = 0,012$), али и 15. дана у односу на 6. дан ($z = 2,522$; $p = 0,012$). У групи I-T6 (график 92) експресија се није статистички значајно значајно разликовала међу пчелама жртвованим 9. и 15. дана ($z = 0,000$; $p = 1,000$).



Графици 89. и 90: Нивои експресије гена за вителогенин у групама Т и I-T1 у различитим моментима жртвовања пчела



Графици 91. и 92: Нивои експресије гена за вителогенин у групама I-T3 и I-T6 у различитим моментима жртвовања пчела

5. 4. 3. Експресија гена значајних за имунитет код пчела из група храњених уз додатак препарата Beewell AminoPlus

Поређење нивоа експресије појединачних гена међу различитим експерименталним групама у истим моментима жртвовања пчела

Резултати Kruskal-Wallis теста показали су да код узорака пчела у првом жртвовању (6 дана након излегања) била статистички веома значајна разлика у експресији гена за абецин ($H = 12,198$; $p = 0,007$), док код експресије осталих гена: вителогенин ($H = 3,071$; $p = 0,381$), дефензин ($H = 1,677$; $p = 0,642$), хименоштецин ($H = 1,024$; $p = 0,800$), и апидецин ($H = 0,280$; $p = 0,964$) није било статистички значајних разлика. Резултати Mann-Whitney U теста показали су да је експресија гена за абецин (график 93) била статистички значајно виша у групи I-BW1 у односу на групе I ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-BW3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) али у групи BW у односу на I-BW3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$).

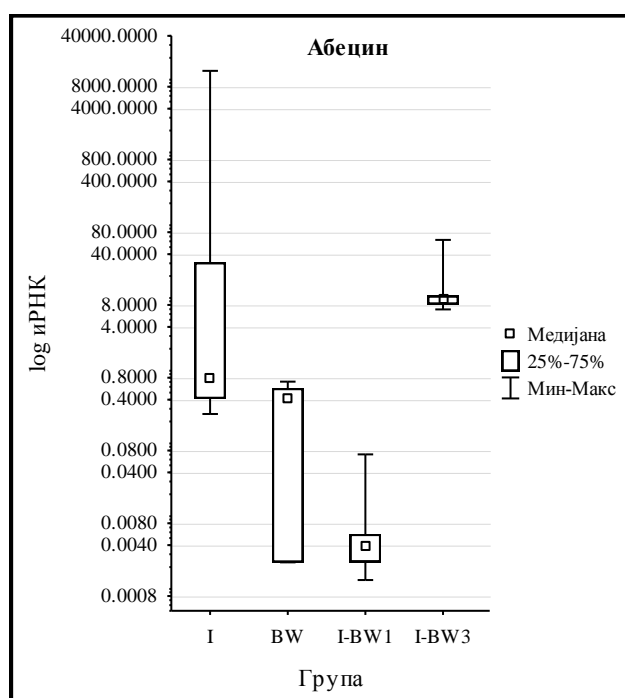
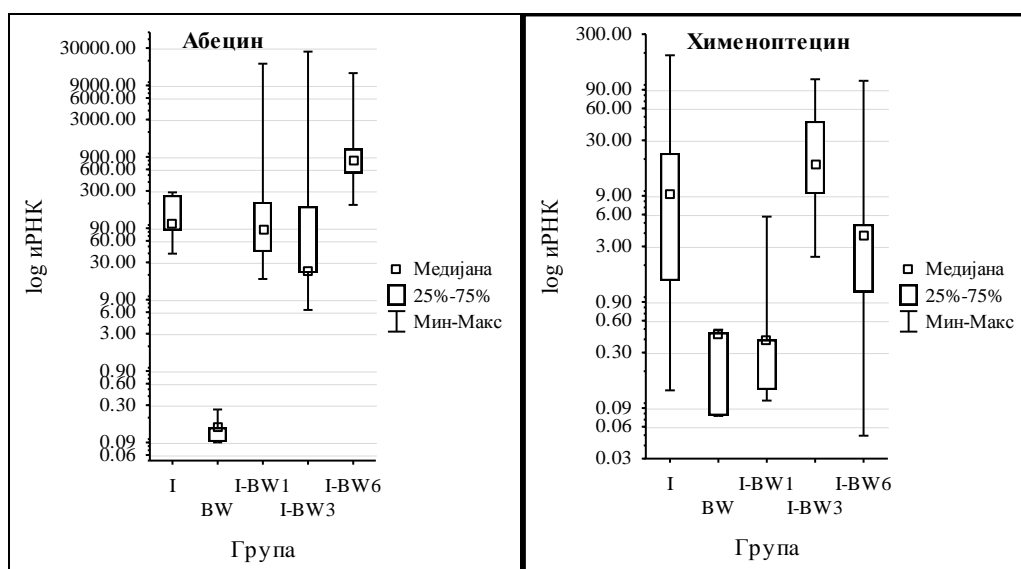


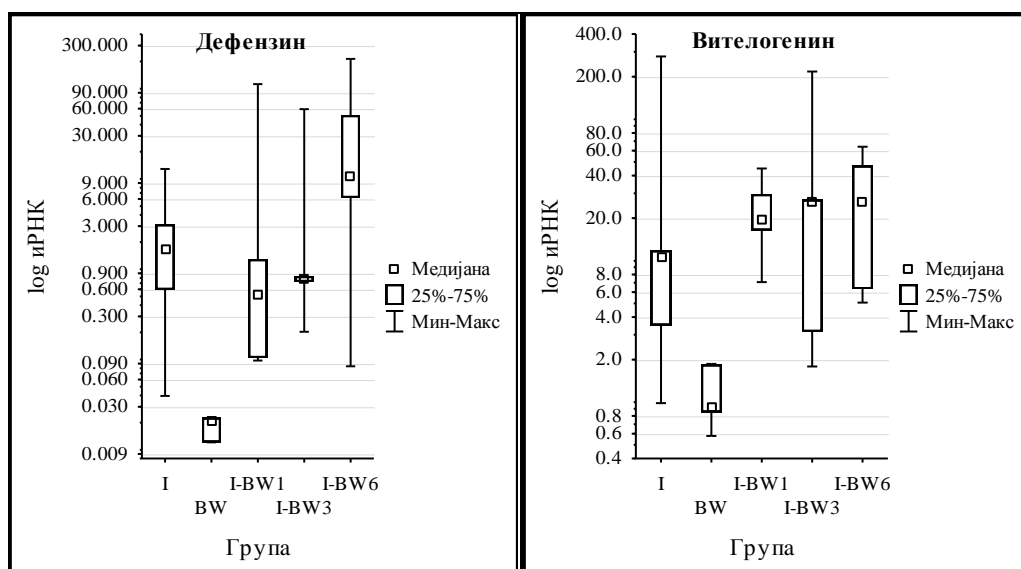
График 93: Нивои експресије гена за абецин код пчела жртвованих шестог дана

Код пчела жртвованих у другом жртвовању (9 дана након излегања) Kruskal-Wallis тест показао је статистички веома значајну разлику између анализираних група у експресији гена за абецин ($N = 14,718$; $p = 0,006$), док је статистички значајна разлика забележена код експресије гена за хименоштецин ($N = 10,626$; $p = 0,031$), дефензин ($N = 12,827$; $p = 0,012$), апидецин ($N = 10,130$; $p = 0,038$) и вителогенин ($N = 10,716$; $p = 0,030$). Анализом односа између две групе помоћу Mann-Whitney U теста установљено је да је експресија гена за абецин (график 94) била најнижа код групе BW и то статистици значајно у односу на све остале групе: I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-BW1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-BW3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-BW6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$). Осим тога експресија гена за абецин тада је била статистички значајно нижа и у групи I у односу на групу I-BW6 ($z = 2,089$; $p = 0,037$). Када је реч о експресији гена за хименоштецин (график 95), она је била статистички значајно виша у групи I-BW3 у односу на групу BW ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и групу I-BW1 ($z = 2,298$; $p = 0,022$).



Графици 94. и 95: Нивои експресије гена за абецин и хименоштецин код пчела жртвованих деветог дана

Експресија гена за дефензин (график 96) била је статистички значајно нижа у групи BW у односу на све остале групе: I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-BW1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-BW3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-BW6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$). Такође, и експресија гена за вителогенин (график 97) у овој групи је била најнижа у односу на остале: I ($z = 2,089$; $p = 0,037$), I-BW1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-BW3 ($z = 2,089$; $p = 0,037$) и I-BW6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



Графици 96. и 97: Нивои експресије гена за дефензин и вителогенин код пчела жртвованих деветог дана

Насупрот томе у овој групи (BW) експресија гена за апидецин (график 98) била је статистички значајно виша, у односу на групе: I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-BW1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-BW3 ($z = 2,089$; $p = 0,037$). Анализа пчела узоркованих у трећем жртвовању (15 дана након излегања) Kruskal-Wallis тестом показала је статистички веома значајну разлику међу експерименталним групама код гена за хименоптецин ($H = 18,284$; $p = 0,001$), дефензин ($H = 16,801$; $p = 0,002$), апидецин ($H = 17,878$; $p = 0,001$ и вителогенин ($H = 15,257$; $p = 0,004$), док није било статистички значајне разлике међу групама није било код експресије гена за абецин ($H = 6,742$; $p = 0,150$).

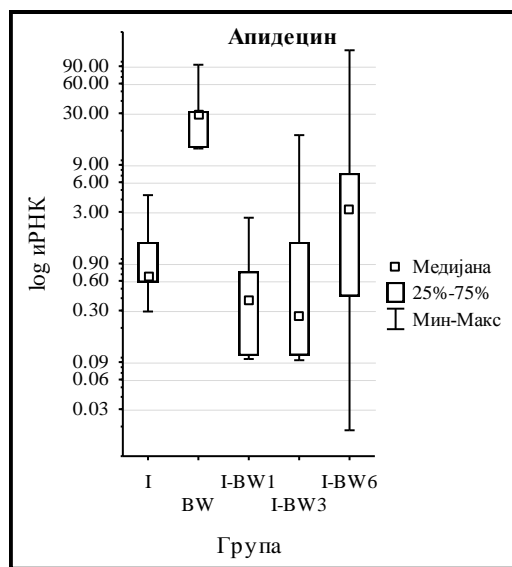
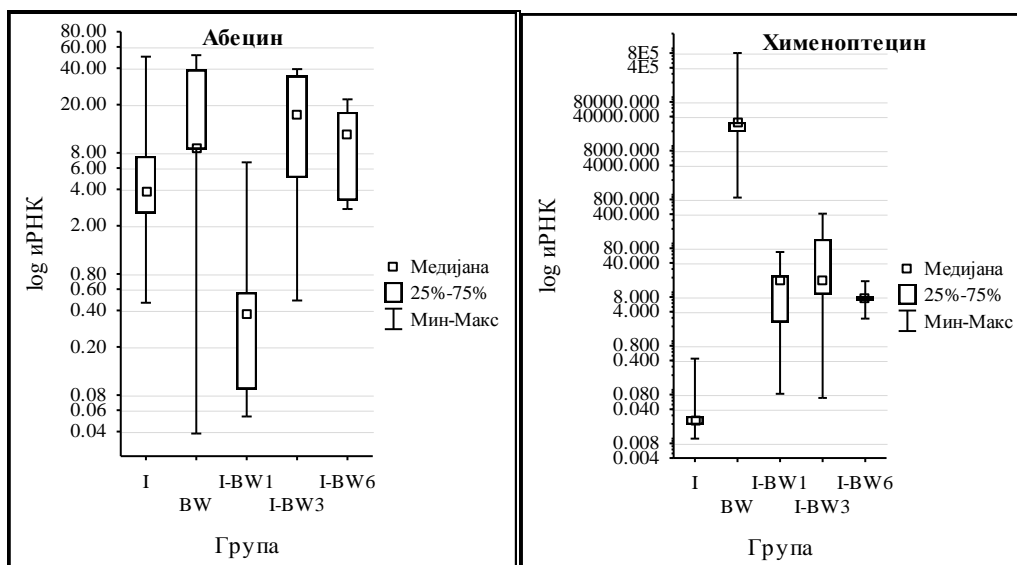
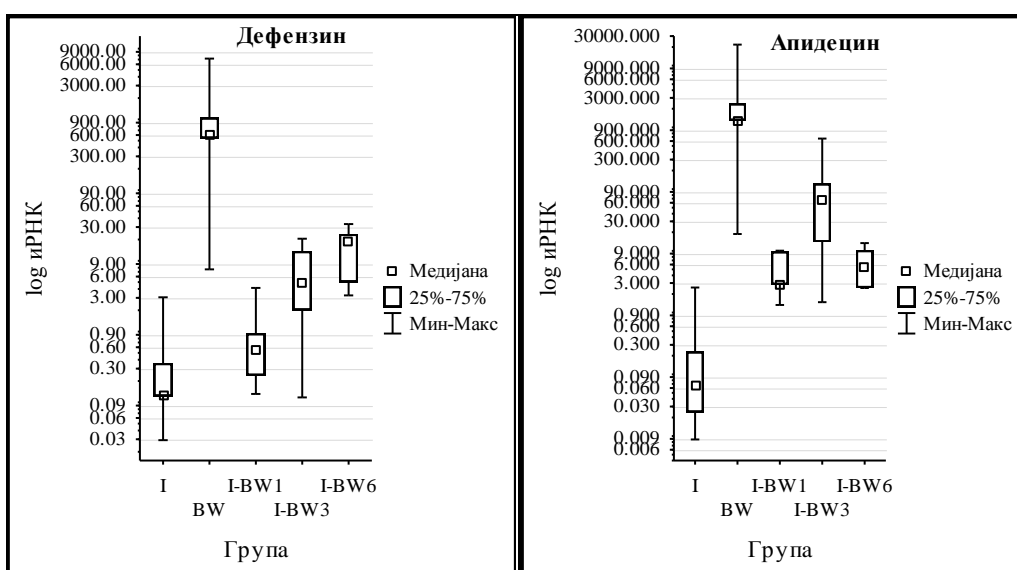


График 98: Нивои експресије гена за апидецин код пчела жртвованих деветог дана

Појединачним поређењем вредности експресије гена за абецин (график 99) утврђена је нижа експресија у групи I-BW1 која је према резултатима Mann-Whitney U теста статистички значајно нижа у односу на I-BW6 ($z = 2,089$; $p = 0,037$). Нивои експресије гена за хименоптецин (график 100) били су највиши у групи BW у односу на све друге групе: I ($z = 2,514$; $p = 0,012$), I-BW1 ($z = 2,514$; $p = 0,012$), I-BW3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-BW6 ($z = 2,515$; $p = 0,012$); док су најнижи били у групи I, и то сатистицки значајно у односу на све остале групе: BW ($z = 2,514$; $p = 0,012$), I-BW1 ($z = 2,298$; $p = 0,022$), I-BW3 ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и I-BW6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$). Каде је реч о нивоима експресије гена за дефензин (график 101), у групи BW били су статистички значајно виши у односу на групе I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-BW1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-BW3 ($z = 2,089$; $p = 0,037$), али и у групи I-BW6 у односу на групе I ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-BW1 ($z = 2,298$; $p = 0,022$). Нивои експресије гена за апидецин (график 102) били су статистички значајно нижи у групи I у односу на све остале групе: BW ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-BW1 ($z = 2,298$; $p = 0,022$), I-BW3 ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и I-BW6 ($z = 2,089$; $p = 0,037$), али и статистички значајно виши у групи BW у односу на I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-BW1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-BW6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



Графици 99. и 100: Нивои експресије гена за абецин и хименоптецин код пчела жртвованих петнаестог дана



Графици 101. и 102: Нивои експресије гена за дефензин и апидецин код пчела жртвованих петнаестог дана

Експресија гена за вителогенин (график 103) била је статистички значајно виша у групи BW у односу на групе I ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и I-BW1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), али и у групи I-BW3 у односу на исте групе: I ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и I-BW1 ($z = 2,089$; $p = 0,037$).

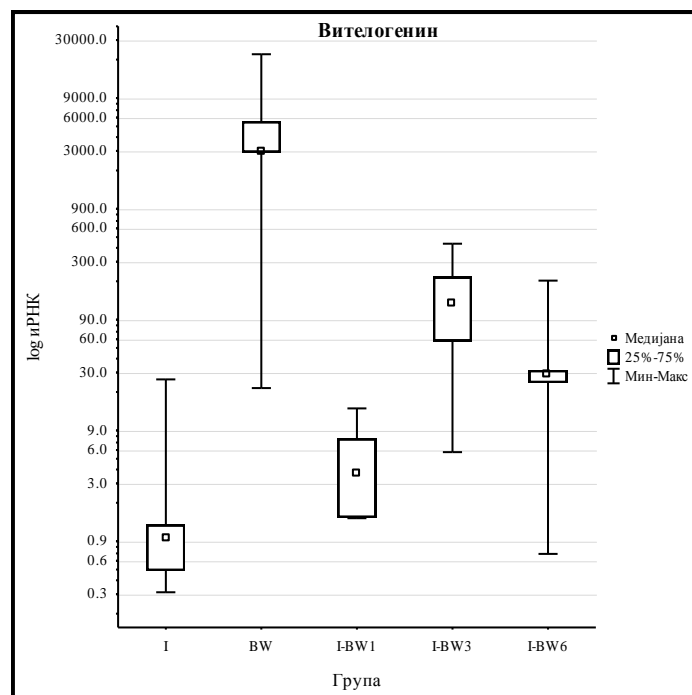


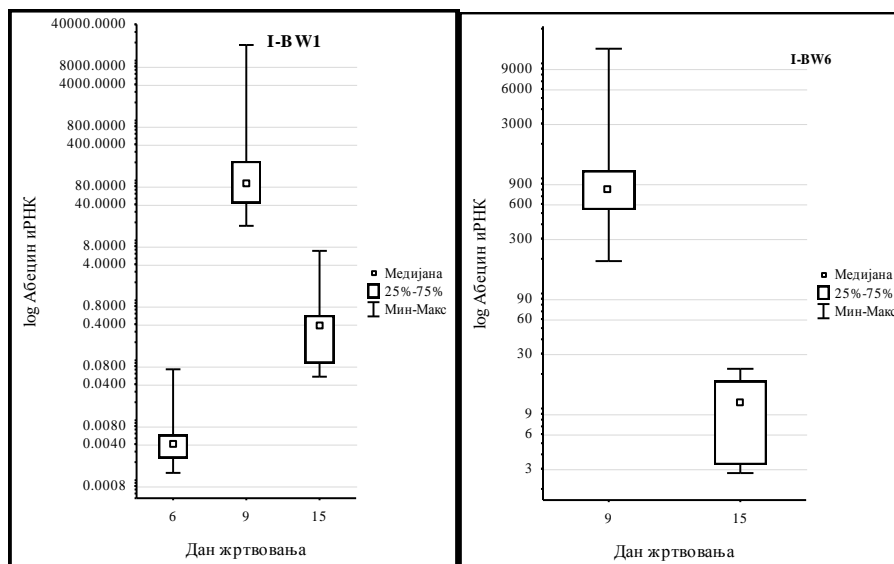
График 103: Нивои експресије гена за вителогенин код пчела
жртвованих петнаестог дана

Нивои експресије гена у оквиру исте групе у различитим моментима узорковања пчела

Анализом нивоа експресије гена за абецин Kruskal-Wallis тест показао је статистички веома значајну разлику у групи I-BW1 ($N = 12,020$; $p = 0,003$), док статистички значајних разлика није било у групама I ($N = 5,420$; $p = 0,067$), BW ($N = 4,388$; $p = 0,112$) и I-BW3 ($N = 1,820$; $p = 0,403$).

Нивои експресије гена за абецин, према резултатима Mann-Whitney U теста статистички су се значајно разликовали у следећим случајевима: у инфицираној групи (I) ниво експресије абецина (график 42) статистички је значајно био нижи код пчела инфицираних 15. дана у односу на 9. дан ($z = 2,402$; $p = 0,016$); у групи I-BW1 (график 104) статистички значајно виши ниво експресије био је 9. дана у односу на 15. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 6. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$), али и 15. дана у односу на 6. дан ($z = 2,298$; $p = 0,022$); у групи I-BW6 (график 105) експресији гена за абецин, била је

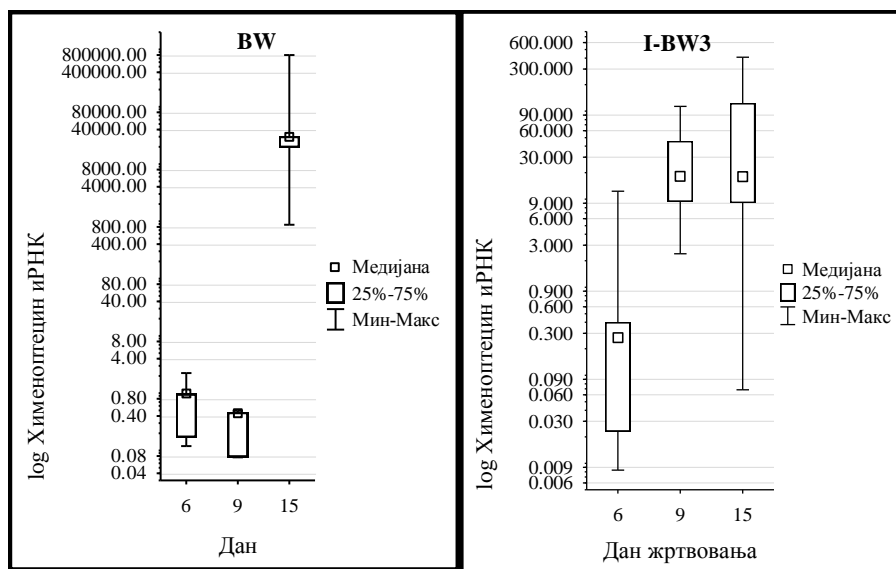
статистички значајно виша код пчела жртвованих 9. дана у односу на 15. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



Графици 104. и 105: Нивои експресије гена за абецин у групама I-BW1 и I-BW6 у различитим моментима жртвовања пчела

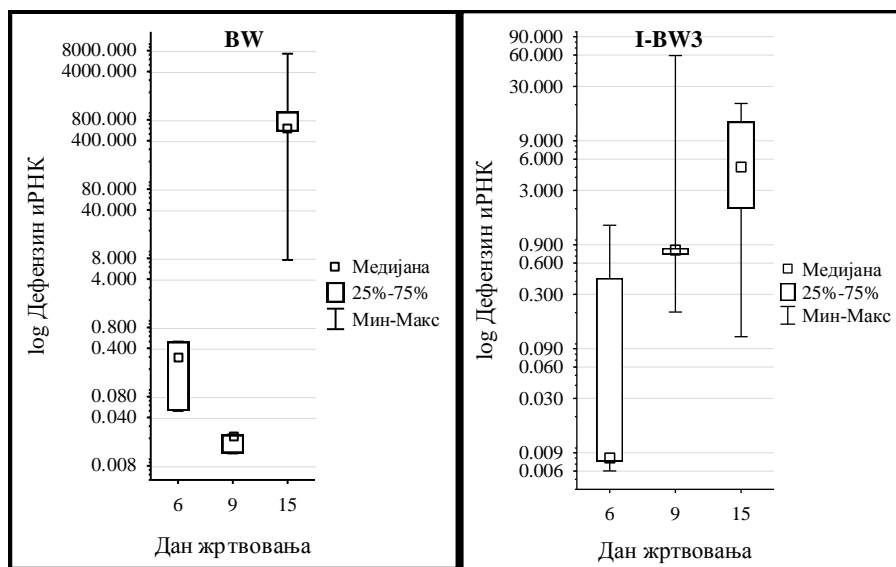
Анализом помоћу Kruskal-Wallis теста утврђено је да се разлика у нивоима експресије гена за хименоптецин статистички веома значајно разликовала у групи BW ($N = 10,257$; $p = 0,006$), док у осталим групама није било статистички значајних разлика I ($N = 5,360$; $p = 0,069$), I-BW1 ($N = 2,220$; $p = 0,340$) и I-BW3 ($N = 5,420$; $p = 0,067$). Помоћу Mann-Whitney U теста утврђено је да је у групи I (график 47) ниво хименоптецина био статистички значајно нижи код пчела жртвованих 15. дана у односу на оне жртвоване 9. дана ($z = 2,402$; $p = 0,016$). У групи BW (график 106) вредности су биле статистички значајно више 15. дана у односу на 6. дан ($z = 2,522$; $p = 0,012$) и 9. дан ($z = 2,514$; $p = 0,012$). У групи I-BW3 ниво хименоптецина био је статистички значајно виши 9. дана у односу на 6. дан ($z = 2,089$; $p = 0,037$). У групи I-BW3 (график 107) експресија гена је била статистички значајно виша 9. дана у односу на 6. дан. У групи I-BW6 нивои експресије

гена за хименоптецин, према резултатима Mann-Whitney U теста нису се статистички значајно разликовали међу пчелама жртвованим 9. дана у односу на 15. дан ($z = 1,044$; $p = 0,296$).



Графици 106. и 107: Нивои експресије гена за хименоптецин у групама BW и I-BW3 у различитим моментима жртвовања пчела

Када је реч о нивоима експресије гена за дефензин резултати Kruskal-Wallis теста показали су статистички веома значајну разлику у групи да у групама BW ($N = 12,545$; $p = 0,002$), док у осталим групама није било статистички значајних разлика I ($N = 3,980$; $p = 0,137$), I-BW1 ($N = 3,420$; $p = 0,181$) и I-BW3 ($N = 5,360$; $p = 0,069$). Mann-Whitney U тест показао је да је у групи BW (график 108) експресија била највиша код пчела жртвованих 15. дана када је била статистички значајно виша у односу на 6. ($z = 2,522$; $p = 0,012$) и 9. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$), осим тога била је статистички значајно нижа и 9. у односу на 6. дан ($z = 2,522$; $p = 0,012$). У групи I-BW3 (график 109) ниво експресије гена за дефензин био је статистички значајно виши 15. дана у односу на 6. дан ($z = 2,089$; $p = 0,037$).

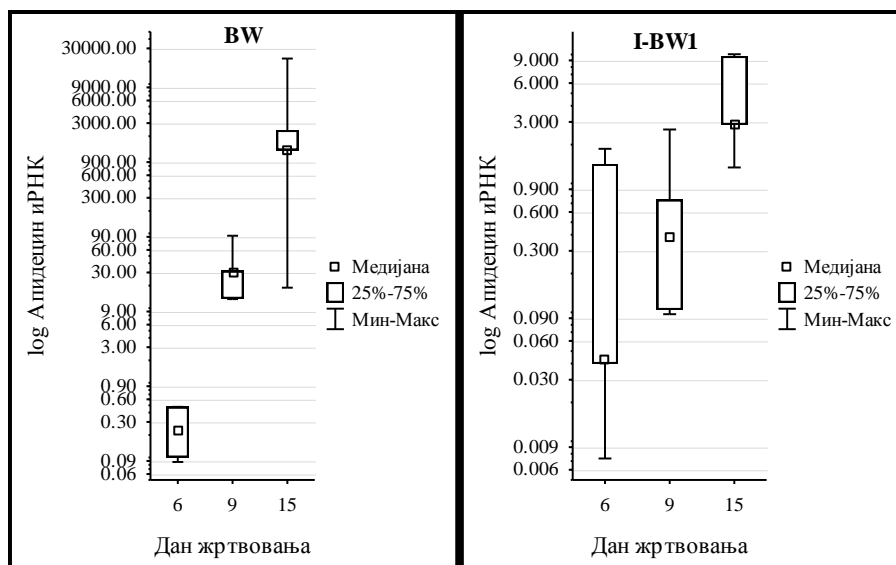


Графици 108. и 109: Нивои експресије гена за дефензин у групама BW и I-BW3 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-BW6 нивои експресије гена за дефензин, према резултатима Mann-Whitney U теста нису се статистички значајно разликовали међу пчелама жртвованим 9. дана у односу на 15. дан ($z = 0,209$; $p = 0,835$).

Анализирајући експресију гена за апидецин помоћу Kruskal-Wallis теста примећено је да је она била статистички веома значајно различита у групи BW ($H = 11,200$; $p = 0,004$), док је у групама I-BW1 ($H = 7,580$; $p = 0,023$), и I-BW3 ($H = 6,860$; $p = 0,032$), док у групи I није било статистички значајне разлике ($H = 2,000$; $p = 0,368$).

Резултати Mann-Whitney U теста показали су да је експресија гена за апидецин у BW групи (график 110) била најнижа код пчела жртвованих 6. дана, када је била статистички значајно нижа у односу на 9. и 15. дан ($z = 2,514$; $p = 0,012$). У групи I-BW1 (график 111) експресија апидецина је била највиша 15. дана, када је била статистички значајно виша него 9. дана ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и 6. дана ($z = 2,089$; $p = 0,037$).



Графици 110. и 111: Нивои експресије гена за апидецин у групама BW и I-BW1 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-BW3 (график 112) ниво апидецина био је статистички значајно виши 15. у односу на 6. дан жртвовања ($z = 2,298$; $p = 0,022$). У групи I-BW6 нивои експресије гена за апидецин, према резултатима Mann-Whitney U теста нису се статистички значајно разликовали међу пчелама у првом и другом жртвовању ($z = 0,418$; $p = 0,676$).

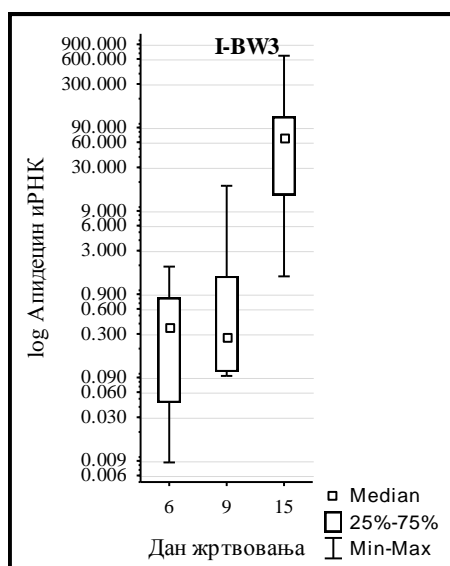
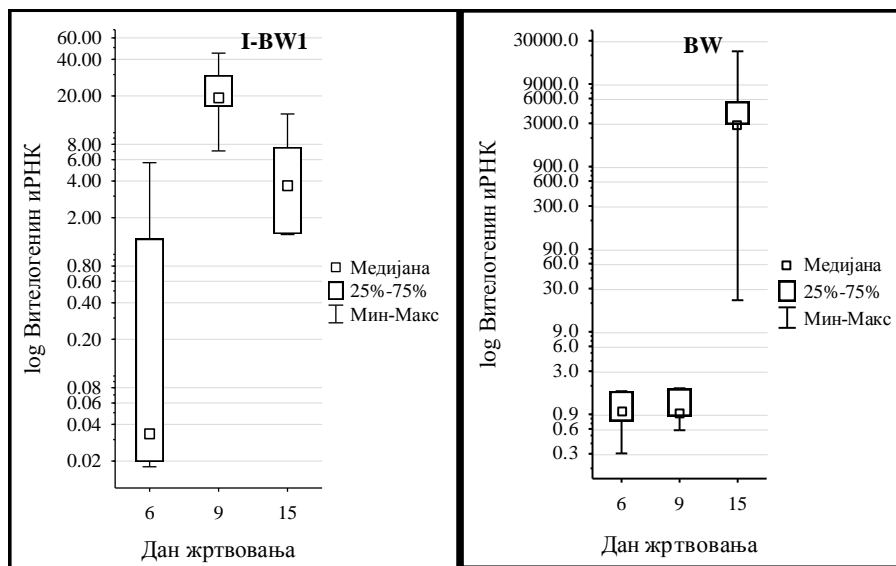


График 112: Нивои експресије гена за апидецин у групи I-BW3 у различитим моментима жртвовања пчела

Анализирајући експресију гена за вителогенин помоћу Kruskal-Wallis теста примећено је да је она била статистички веома значајно различита у групама BW (H = 9,517; p = 0,009) и I-BW1 (H = 10,140; p = 0,006), док у групама I (H = 5,180; p = 0,075) и I-BW3 (H = 5,460; p = 0,065) није било статистички значајних разлика.

Анализа вредности за експресију вителогенина помоћу Mann-Whitney U теста дала је следеће резултате: у инфицираној I групи (график 57) експресија је била статистички значајно већа у другом жртвовању и односу на прво (z = 1,984; p = 0,047). У групи BW (график 113) експресија је била највиша 15. дана и то статистички значајно виша у односу на 9. (z = 2,507; p = 0,012) и 6. (z = 2,514; p = 0,012) дан. У групи I-BW1 (график 114) ниво експресије вителогенина био је статистички значајно виши 9. у односу на 6 дан. (z = 2,507; p = 0,012) и 15. дан (z = 2,089; p = 0,037). У групи I-BW6 експресија се није статистички значајно разликовала 9. дана у односу на 15. дан (z = 0,000; p = 1,000).



Графици 113. и 114: Нивои експресије гена за вителогенин у групама BW и I-BW1 у различитим моментима жртвовања пчела

5. 4. 4. Експресија гена значајних за имунитет код пчела из група храњених уз додатак препарата Medenko forte

Поређење нивоа експресије појединачних гена међу различитим експерименталним групама у истим моментима жртвовања пчела

Резултати Kruskal-Wallis теста показали су да код узорака пчела жртвованих 6 дана након излегања није било статистички значајних разлика између свих експерименталних група, ни за један од анализираних гена: абецин ($H = 2,360$; $p = 0,501$), хименоптецин ($H = 2,497$; $p = 0,476$), дефензин ($H = 4,040$; $p = 0,257$), апидецин ($H = 0,154$; $p = 0,985$) и вителогенин ($H = 4,658$ $p = 0,199$). Међутим, резултати Mann-Whitney U теста показали су да је у том тренутку експресија гена за дефензин (график 115) била статистички значајно виша у групи I-MF3 у односу на групу MF ($z = 2,089$; $p = 0,037$).

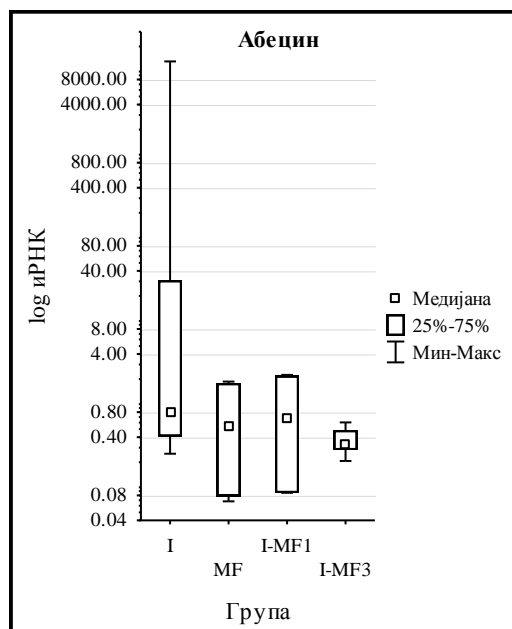
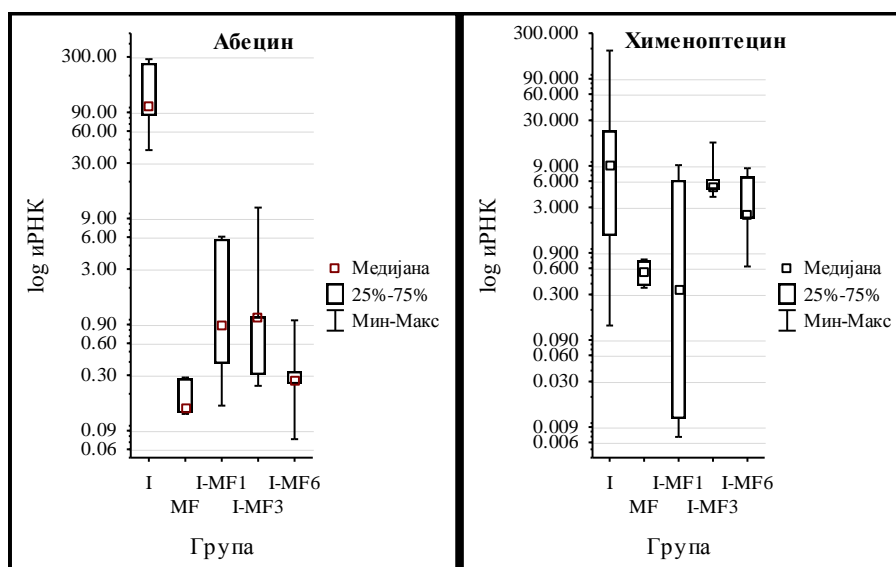


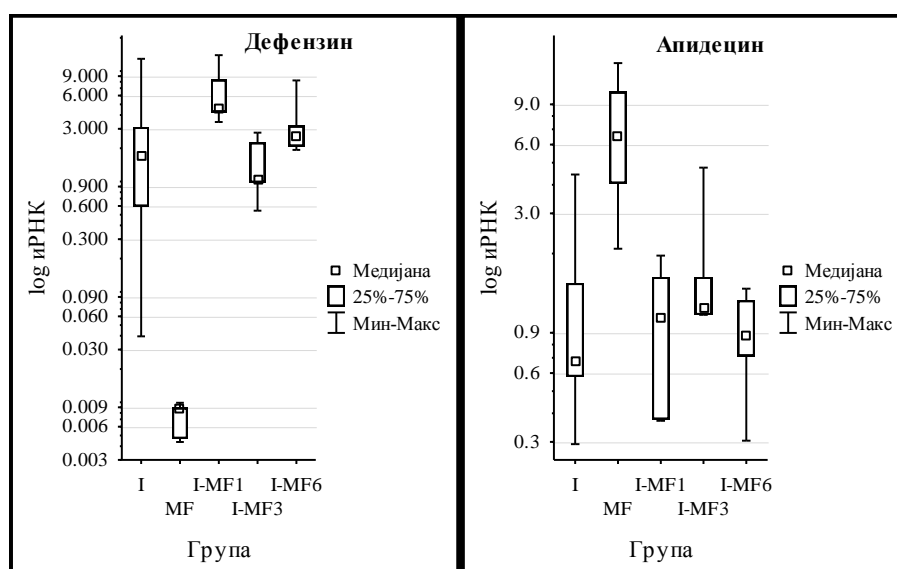
График 115: Нивои експресије гена за абецин код пчела жртвованих шестог дана

Код пчела жртвованих 9. дана Kruskal-Wallis тест показао је статистички веома значајну разлику између анализираних група у експресији гена за абецин ($H = 19,067$; $p = 0,001$), вителогенин ($H = 17,995$; $p = 0,001$) и дефензин ($H = 15,493$; $p = 0,004$). Статистички значајна разлика забележена код експресије гена за апидецин ($H = 9,707$; $p = 0,046$), док тада у експресији гена за хименоптецин није било статистички значајне разлике ($H = 8,108$; $p = 0,088$). Анализом односа између две групе помоћу Mann-Whitney U теста установљено је да је експресија гена за абецин (график 116) била највиша код групе инфициране ноземом (I) и то статистички значајно у односу на групу која није инфицирана а храњена је уз додатак препарата Medenکو forte - MF ($z = 2,507$; $p = 0,012$), као и групе инфициране спорама ноземе али и храњеним уз додатак препарата од првог - I-MF1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), трећег - I-MF3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и шестог дана - I-MF6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$). Такође, статистички значајно виша експресија гена за абецин забележена је и у групи MF у односу на остале групе: I-MF1 ($z = 2,089$; $p = 0,037$) и I-MF3 ($z = 2,095$; $p = 0,036$). Експресија гена за хименоптецин (график 117) била је статистички значајно нижа код пчела из групе MF у односу на групе I-MF3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-MF6 ($z = 2,089$; $p = 0,037$).



Графици 116. и 117: Нивои експресије гена за абецин и хименоптецин код пчела жртвованих деветог дана

Када је реч о експресији гена за дефензин (график 118), Mann-Whitney U тест је показао статистички значајно нижи ново експресије у неинфицираној групи храњеној уз додатак препарата (MF) у односу на групе инфициране (I), инфициране и храњене уз додатак препарата од првог (I-MF1), трећег (I-MF3) и шестог (I-MF6) дана ($z = 2,507$; $p = 0,012$). Осим тога, забележена је и статистички значајно виша експресија код групе I-MF1 у односу на групу I-MF3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$). Резултати истог теста показали су и статистички значајно вишу експресију гена за апидецин (график 119) код MF групе у односу на I ($z = 2,089$; $p = 0,037$), I-MF1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-MF3 ($z = 2,095$; $p = 0,036$) и I-MF6 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) групу.



Графици 118. и 119: Нивои експресије гена за дефензин и апидецин код пчела жртвованих деветог дана

Анализирајући нивое експресије гена за вителогенин (график 120) утврдили смо статистички значајно више вредности у групи I у односу на MF ($z = 2,507$; $p = 0,012$) I-MF1 ($z = 2,298$; $p = 0,022$), I-MF3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-MF6 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) групе; као и у групи I-MF1 у односу на I-MF3 ($z = 2,095$; $p = 0,036$).

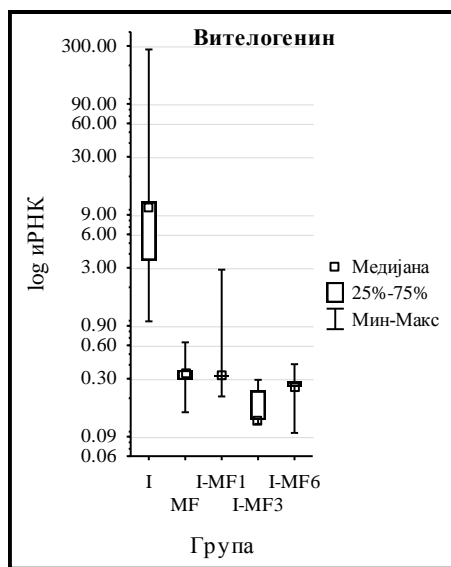


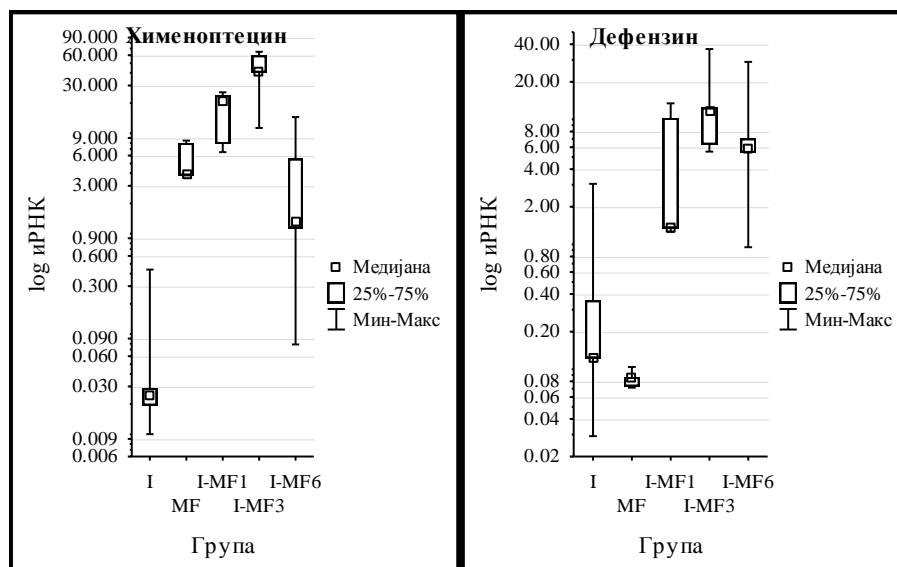
График 120: Нивои експресије гена за вителогенин код пчела жртвованих деветог дана

Анализа пчела жртвованих 15. дана Kruskal-Wallis тестом показала је статистички веома значајну разлику међу групама код гена за хименоштецин ($N = 19,363$; $p = 0,001$), дефензин ($N = 17,228$; $p = 0,002$) и апидецин ($N = 19,813$; $p < 0,001$), док значајна разлика међу групама није постојала код гена за абецин ($N = 7,481$; $p = 0,113$) и вителогенин ($N = 5,767$; $p = 0,217$).

Појединачним поређењем вредности експресије гена за хименоштецин (график 121) утврђена је најнижа експресија у групи I која је према резултатима Mann-Whitney U теста статистички значајно нижа у односу на остале групе: MF ($z = 2,514$; $p = 0,012$), I-MF1 ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-MF3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-MF6 ($z = 2,298$; $p = 0,022$). Осим тога, статистички значајно ниже вредности биле су и у MF групи у односу на I-MF3 групу ($z = 2,514$; $p = 0,012$) али и у I-MF6 у односу на I-MF1 ($z = 2,089$; $p = 0,037$) и I-MF3 ($z = 2,298$; $p = 0,022$) групе.

Нивои експресије гена за дефензин (график 122) били су статистички значајно нижи у инфицираној (I) групи у односу на I-MF3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-MF6 ($z = 2,298$; $p = 0,022$) групе. Такође, ниво експресије

дефензина био статистички значајно нижи код пчела из MF групе у односу на све три групе које су осим исхране уз додатак препарата Medenko forte биле инфициране ноземом ($z = 2,298$; $p = 0,022$).



Графици 121. и 122: Нивои експресије гена за хименоптецин и дефензин код пчела жртвованих петнаестог дана

Када је реч о нивоима експресије гена за апидецин (график 123), према резултатима Mann-Whitney U теста, она је статистички значајно нижа у групи I у односу на I-MF1 ($z = 2,298$; $p = 0,022$), I-MF3 ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и I-MF6 ($z = 2,298$; $p = 0,022$). Такође, статистички значајно ниже вредности забележене су у MF групи у односу на групе које су осим исхране уз додатак препарата Medenko forte биле инфициране ноземом ($z = 2,298$; $p = 0,022$). Осим тога у групи I-MF3 ниво експресије је значајно виши у односу на групе I-MF1 ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и I-MF6 ($z = 2,298$; $p = 0,022$).

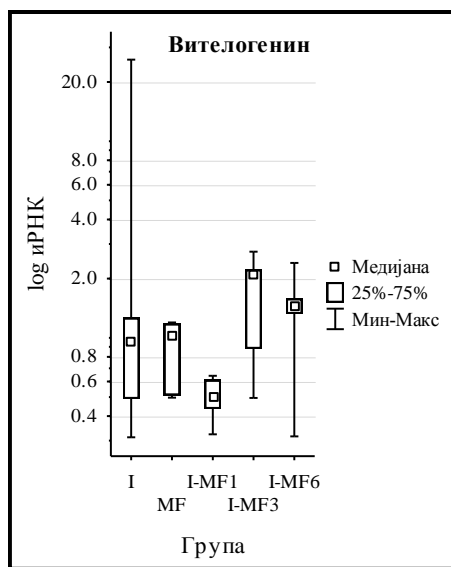


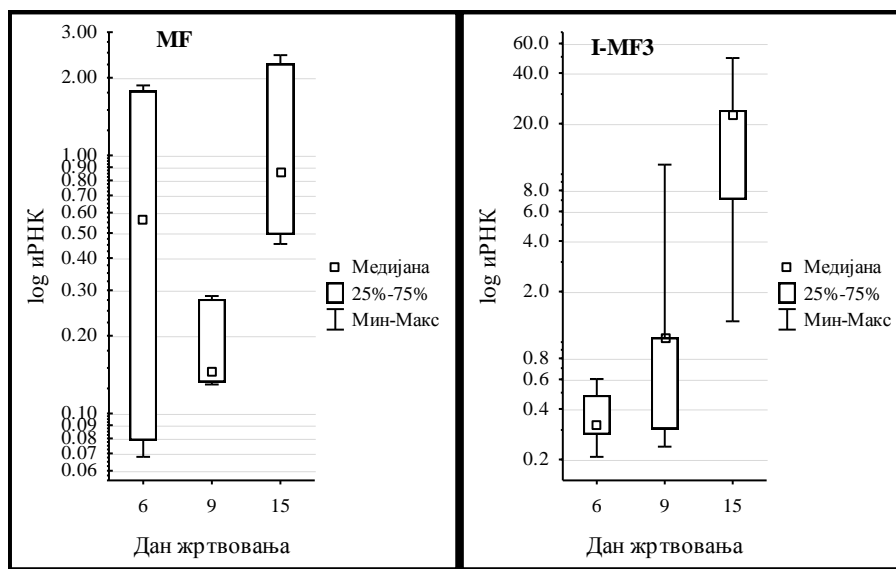
График 123: Нивои експресије гена за вителогенин код пчела жртвованих петнаестог дана

Нивои експресије гена у оквиру исте групе у различитим моментима узорковања пчела

Анализом нивоа експресије гена за абецин Kruskal-Wallis тест показао је статистички значајну разлику у групи I-MF3 ($H = 8,796$; $p = 0,012$), док статистички значајних разлика није било у групама I ($H = 5,420$; $p = 0,067$), MF ($H = 5,180$; $p = 0,075$) и I-MF1 ($H = 0,740$; $p = 0,6907$).

Нивои експресије гена за абецин, према резултатима Mann-Whitney U теста статистички су се значајно разликовали у следећим случајевима: у инфицираној групи (I) ниво експресије абецина (график 42) статистички је значајно био нижи код пчела инфицираних 15. у односу на 9. дан ($z = 2,402$; $p = 0,016$); у групи MF (график 124) статистички значајно виши ниво експресије био је 15. дана у односу на 9 дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$); у групи I-MF3 (график 125) највећа експресија абецина забележена је 15. дана, када је била статистички значајно виша у односу на 6. ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 9. дан

($z = 2,095$; $p = 0,036$); у групи I-MF6 (график 126) експресији гена за абецин, била је статистички значајно виша код пчела жртвованих 9. дана у односу на 15. дан ($z = 2,298$; $p = 0,022$).



Графици 124. и 125: Нивои експресије гена за абецин у групама MF и I-MF3 у различитим моментима жртвовања пчела

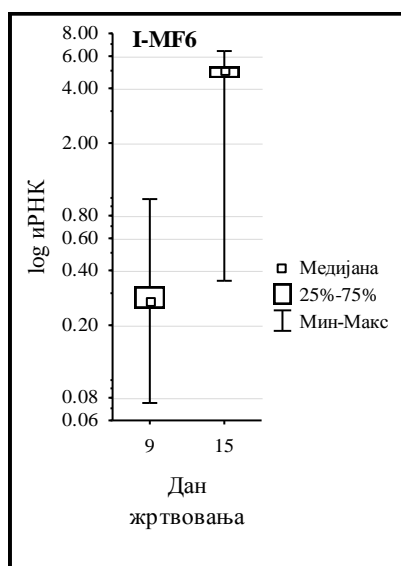
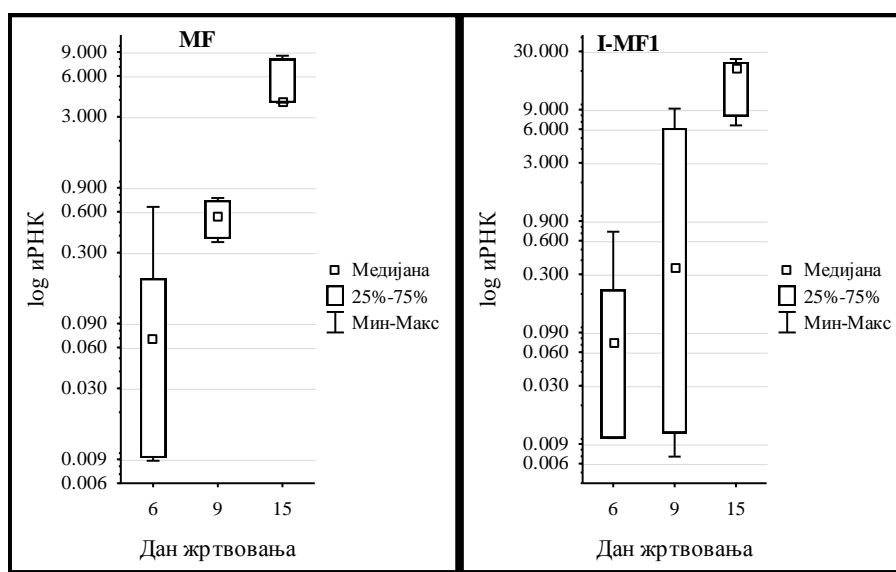


График 126: Нивои експресије гена за абецин у групи I-MF6 у различитим моментима жртвовања пчела

Анализом помоћу Kruskal-Wallis теста утврђено је да се разлика у нивоима експресије гена за хименоштецин статистички веома значајно разликовала у групама MF ($H = 11,200$; $p = 0,004$) и I-MF3 ($H = 12,020$; $p = 0,003$), значајно разликовала у групи I-MF1 ($H = 8,340$; $p = 0,016$), док у групи I није било статистички значајних разлика ($H = 5,360$; $p = 0,069$).

Mann-Whitney U теста утврђено је да је у групи I ниво хименоштецина (график 47) био статистички значајно нижи код пчела жртвованих 15. дана у односу на оне жртвоване 9. дана ($z = 2,402$; $p = 0,016$). У групи MF (график 127) вредности су биле статистички значајно више 15. дана у односу на 6. ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и 9. дан ($z = 2,514$; $p = 0,012$). У групи I-MF1 ниво хименоштецина (график 128) био је највиши 15. дана, када је био статистички значајно виши како у односу на 9. дан ($z = 2,089$; $p = 0,037$), тако и у односу на 6. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



Графици 127. и 128: Нивои експресије гена за хименоштецин у групама MF и I-MF1 у различитим моментима жртвовања пчела

Такође, у групи I-MF3 (график 129) 15. дана забележена је највиша експресија гена за хименоптецин и то статистички значајно виша у односу на 6. ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 9. дан ($z = 2,298$; $p = 0,022$), статистички значајно виша и 9. у односу на 6. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$). У групи I-MF6 нивои експресије гена за хименоптецин, према резултатима Mann-Whitney U теста нису се статистички значајно разликовали међу пчелама жртвованим 9. дана у односу на 15. дан ($z = 0,418$; $p = 0,676$).

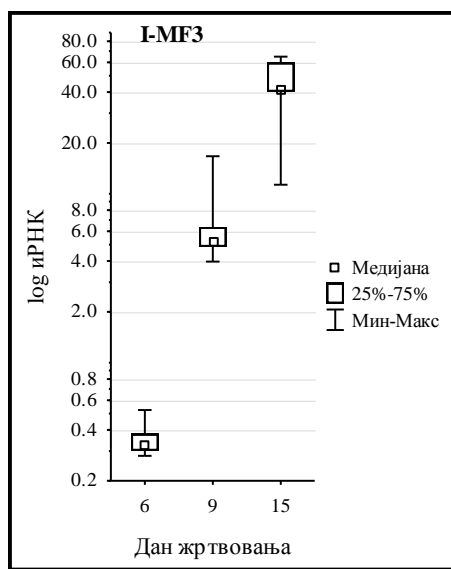
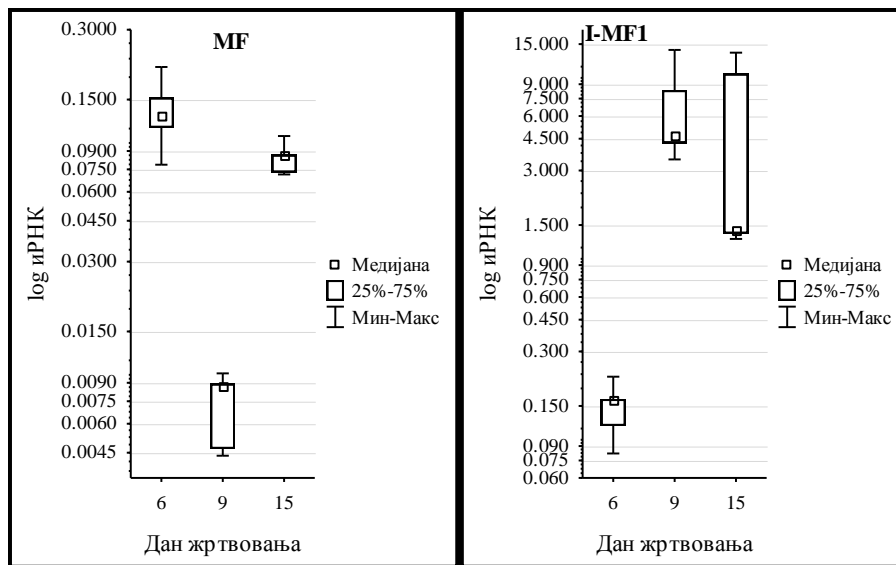


График 129: Нивои експресије гена за хименоптецин у групи I-MF3 у различитим моментима жртвовања пчела

Када је реч о нивоима експресије дефензина резултати Kruskal-Wallis теста показали су да у групама MF ($N = 11,180$; $p = 0,004$), I-MF1 ($N = 9,780$; $p = 0,008$), и I-MF3 ($N = 12,500$; $p = 0,002$) разлика била статистички веома значајна, док у групи I није било статистички значајне разлике ($N = 3,980$; $p = 0,137$). Mann-Whitney U тест показао је да је у групи MF (график 130) експресија била најнижа код пчела жртвованих 9. дана када је овај ниво био статистички значајно виши у односу на 6. ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 15. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$). У групи I-MF1 (график 131) статистички значајно ниже вредности дефензина забележене су 6. у односу на 9. и 15. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



Графици 130. и 131: Нивои експресије гена за дефензин у групама MF и I-MF1 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-MF3 (график 132) ниво експресије дефензина статистички веома значајно је растао, како од 6. до 9. ($z = 2,507$; $p = 0,012$), тако и од 9. до 15. дана ($z = 2,507$; $p = 0,012$). У групи I-MF6 нивои експресије гена за дефензин, према резултатима Mann-Whitney U теста нису се статистички значајно разликовали међу пчелама жртвованим 9. дан у односу на 15. дан ($z = 0,836$; $p = 0,403$).

Анализирајући експресију гена за апидецин помоћу Kruskal-Wallis теста примећено је да је она била статистички веома значајно различита у групама MF ($H = 9,620$; $p = 0,008$), I-MF1 ($H = 9,620$; $p = 0,008$), и I-MF3 ($H = 12,522$; $p = 0,002$), док у групи I није било статистички значајне разлике ($H = 2,000$; $p = 0,368$).

Резултати Mann-Whitney U теста показали су да је експресија гена за апидецин у MF групи (график 133) била највиша код пчела жртвованих 9. дана, што је статистички значајно више у односу на 6. и 15. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$). У групи I-MF1 (график 134) експресија апидецина је била највиша

15. дана, статистички значајно виша него 9. дана ($z = 2,298$; $p = 0,022$) и 6. дана ($z = 2,507$; $p = 0,012$).

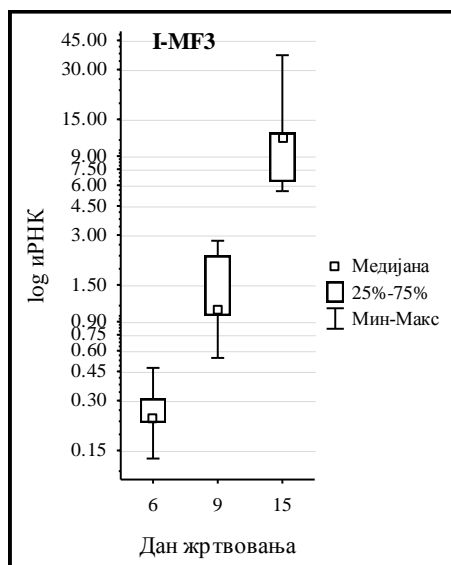
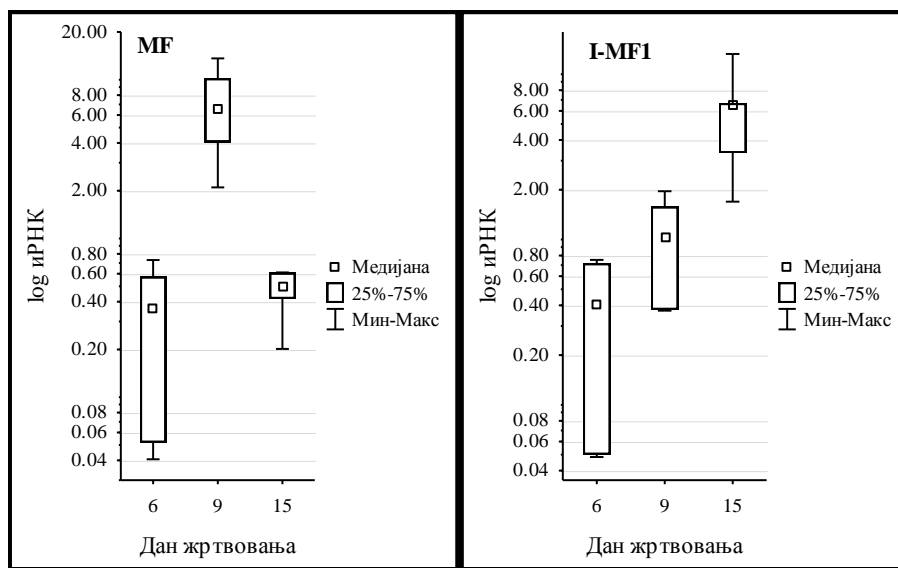


График 132: Нивои експресије гена за дефензин у групи I-MF3 у различитим моментима жртвовања пчела



Графици 133. и 134: Нивои експресије гена за апидецин у групама MF и I-MF1 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-MF3 (график 135) ниво апидецина растао је кроз време, и то статистички значајно између жртвовања ($z = 2,514$; $p = 0,012$), али и када

упоредимо прво и треће жртвовање ($z = 2,507$; $p = 0,012$). У групи I-MF6 нивои експресије гена за апидецин, према резултатима Mann-Whitney U теста нису се статистички значајно разликовали међу пчелама у првом и другом жртвовању ($z = 1,880$; $p = 0,060$).

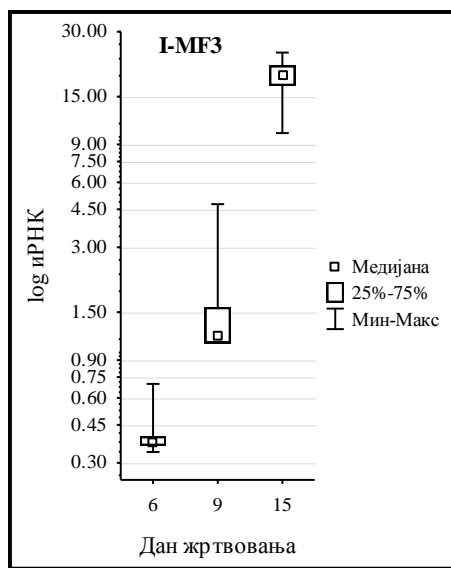
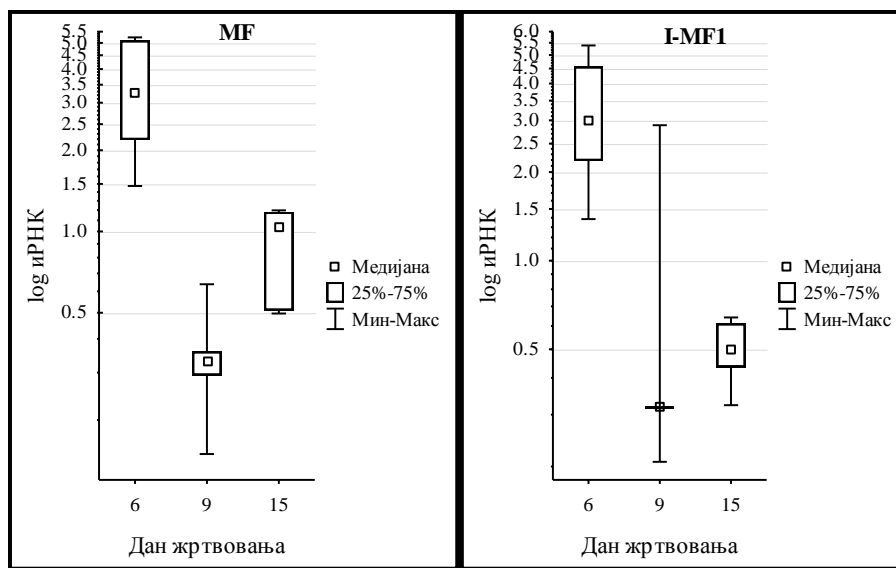


График 135: Нивои експресије гена за апидецин у групи I-MF3 у различитим моментима жртвовања пчела

Анализирајући експресију гена за вителогенин помоћу Kruskal-Wallis теста примећено је да је она била статистички веома значајно различита у групама MF ($H = 11,580$; $p = 0,003$), и I-MF3 ($H = 10,839$; $p = 0,004$), статистички значајно различита у групи I-MF1 ($H = 8,780$; $p = 0,012$), док у групи I није било статистички значајне разлике ($H = 5,180$; $p = 0,075$).

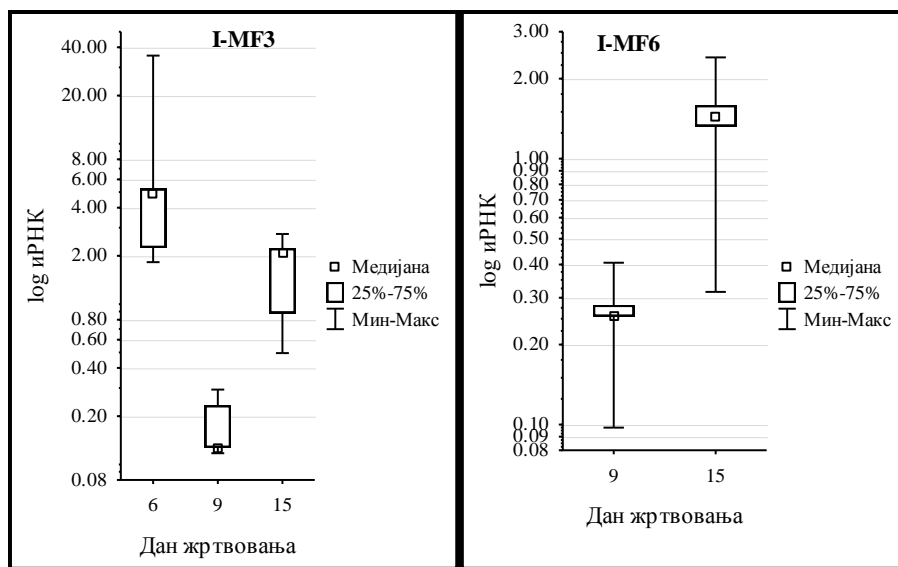
Анализа вредности за експресију вителогенина помоћу Mann-Whitney U теста дала је следеће резултате: у инфоцираној (I) групи (график 57) експресија је била статистички значајно већа у другом жртвовању и односу на прво ($z = 1,984$; $p = 0,047$). У групи MF која је храњена уз додатак препарата Medenko forte (график 136) експресија је била највиша 6. дана и то статистички значајно виша у односу на 9. ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 15. ($z =$

2,507; $p = 0,012$) дан, али и 9. у односу на 15. дан ($z = 2,089$; $p = 0,037$). У групи I-MF1 (график 137) ниво експресије вителогенина био је статистички значајно виша првог у односу на друго ($z = 2,089$; $p = 0,037$) и треће жртвовање ($z = 2,507$; $p = 0,012$).



Графици 136. и 137: Нивои експресије гена за вителогенин у групама MF и I-MF1 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-MF3 (график 138) ниво експресије за вителогенин је био статистички веома значајно нижи код пчела из другог жртвовања у поређењу и са првим и са трећим ($z = 2,514$; $p = 0,012$). У групи I-MF6 (график 139) експресија је била статистички значајно нижа у другом у односу на треће жртвовање ($z = 2,305$; $p = 0,021$).

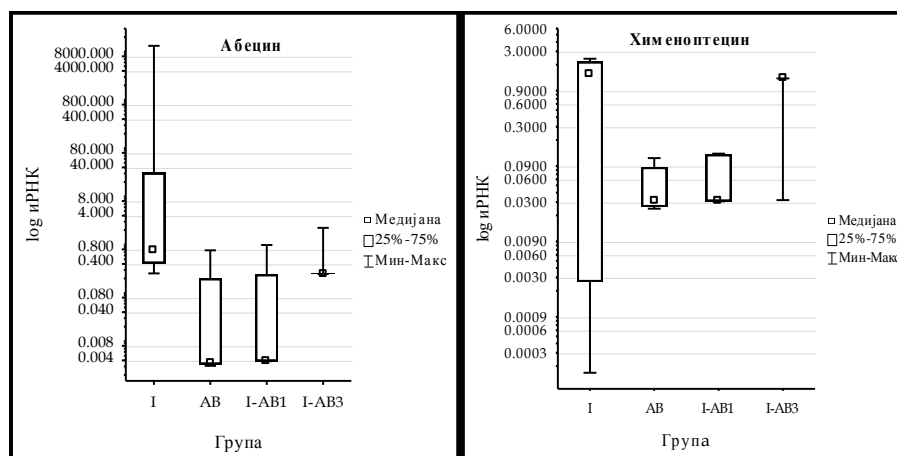


Графици 138. и 139: Нивои експресије гена за вителогенин у групама I-MF3 и I-MF6 у различитим моментима жртвовања пчела

5. 4. 5. Експресија гена значајних за имунитет код пчела из група храњених уз додатак екстракта гљиве *Agaricus blazei*

Поређење нивоа експресије појединачних гена међу различитим експерименталним групама у истим моментима жртвовања пчела

Анализирајући нивое генске експресије код пчела жртвованих 6. дана, Kruskal-Wallis тест показао је статистички значајну разлику међу групама у нивоима експресије гена за абецин ($H = 9,653$; $p = 0,022$). Насупрот томе за остале гене није било статистички значајних разлика: дефензин ($H = 7,623$; $p = 0,545$), хименоштецин ($H = 4,535$; $p = 0,209$), апидецин ($H = 4,260$; $p = 0,235$) и вителогенин ($H = 1,673$; $p = 0,643$). Резултати Mann-Whitney U теста показали су да је разлика у нивоима експресије абецина (график 140) потицала од значајно више у групи I у односу на групу АВ ($z = 2,089$; $p = 0,037$). Осим тога, овај тест показао је и да је експресија хименоштецина (график 141) била статистички значајно виша у групи I-АВ3 у односу на групу АВ ($z = 2,102$; $p = 0,036$) и групу I-АВ1 ($z = 2,128$; $p = 0,033$).



Графици 140. и 141: Нивои експресије гена за абецин и хименоштецин код пчела жртвованих шестог дана

У истој групи (I-AB3) забележена је и статистички значајно виша експресија гена за дефензин (график 142) у односу на групу АВ ($z = 2,326$; $p = 0,020$) и групу I-AB1 ($z = 2,121$; $p = 0,034$).

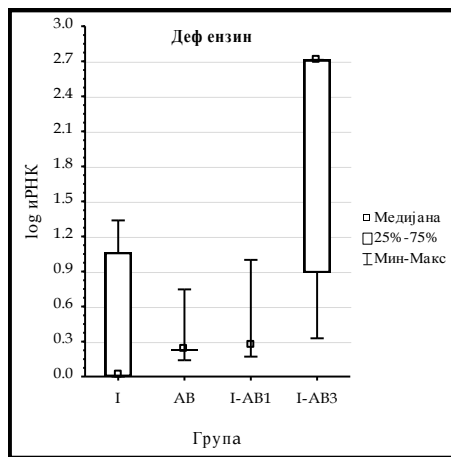
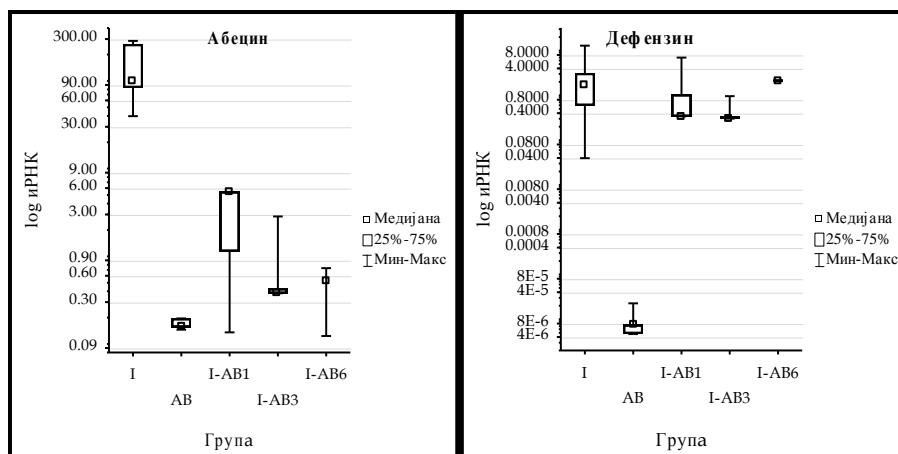


График 142: Нивои експресије гена за дефензин код пчела жртвованих шестог дана

Kruskal-Wallis тест показао је да је статистички веома значајна разлика забележена код пчела жртвованих девет дана, у експресији гена за абецин ($H = 16,302$; $p = 0,003$) и дефензин ($H = 16,184$; $p = 0,003$), док је код вителогенина била статистички значајна разлика ($H = 12,383$; $p = 0,015$). У нивоима експресије гена за хименоптецин ($H = 4,744$; $p = 0,314$) и апидецин ($H = 7,455$; $p = 0,114$) није било статистички значајних разлика. Резултати Mann-Whitny U теста открили су да је експресија гена за абецин (график 143) била статистички значајно виша у групи I у односу на АВ ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-AB1 ($z = 2,538$; $p = 0,011$) и I-AB3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$); Експресија гена за абецин је такође била статистички значајно виша у групи I-AB3 у односу на групу АВ ($z = 2,514$; $p = 0,012$). Ниво експресије гена за дефензин (график 144) био је најнижи у групи АВ, и то статистички значајно нижи него у I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-AB1 ($z = 2,538$; $p = 0,011$), I-AB3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-AB6 ($z = 2,586$; $p = 0,010$). Такође, била је статистички значајно нижа у групи I-AB3 у односу на I-AB6 ($z = 2,595$; $p = 0,0010$).



Графици 143. и 144: Нивои експресије гена за абецин и дефензин код пчела жртвованих деветог дана

Када је реч о вителогенину (график 145) експресија је била статистички значајно виша у групи I у односу на све остале: AB ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-AB1 ($z = 2,514$; $p = 0,012$), I-AB3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-AB6 ($z = 2,538$; $p = 0,011$).

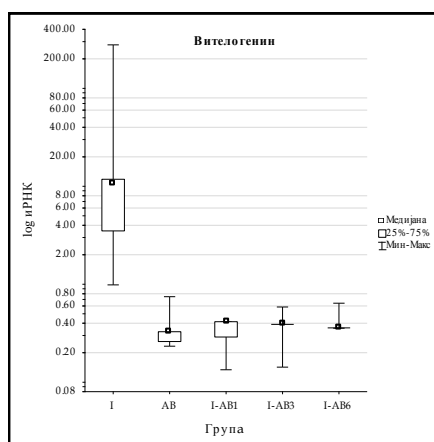
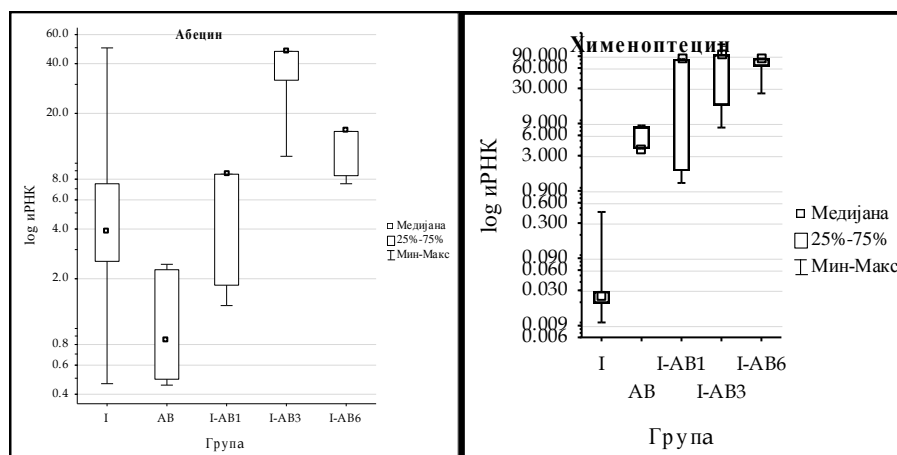


График 145: Нивои експресије гена за вителогенин код пчела жртвованих деветог дана

Узорци пчела старих петнаест дана, према резултатима Kruskal-Wallis теста имали су статистички веома значајне разлике у експресији гена за вителогенин ($H = 18,038$; $p = 0,001$), хименоптецин ($H = 19,511$; $p = 0,001$), апидецин ($H = 20,997$; $p < 0,001$) и дефензин ($H = 21,798$; $p < 0,001$), док је код експресије абецина разлика била статистички значајна ($H = 10,932$; $p = 0,012$).

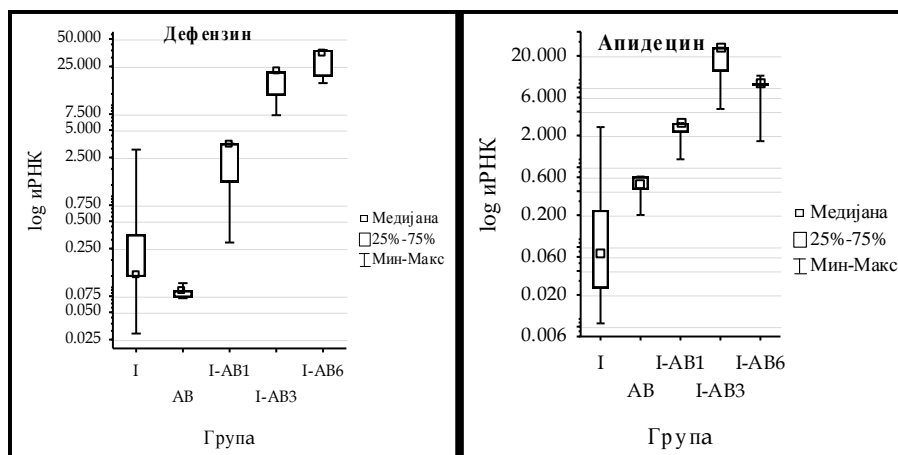
Mann-Whitney U тестом утврђено је да је експресија абецина (график 146) била статистички значајно виша у групи I-AB3 у односу на групе AB ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-AB1 ($z = 2,546$; $p = 0,011$). Када је реч о нивоу експресије хименоштецина (график 147), она је била статистички значајно нижа у групи I у односу на све остале групе: AB ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-AB1 ($z = 2,538$; $p = 0,011$), I-AB3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-AB6 ($z = 2,538$; $p = 0,011$), али и статистички значајно виша у групи AB у односу на I-AB1 ($z = 2,538$; $p = 0,011$), I-AB3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-AB6 ($z = 2,538$; $p = 0,011$) групе.



Графици 146. и 147: Нивои експресије гена за абeцин и хименоштецин код пчела жртвованих петнаестог дана

Експресија гена за дефензин (график 148) била је статистички значајно виша у AB групи у односу на све остале: I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-AB1 ($z = 2,538$; $p = 0,011$), I-AB3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-AB6 ($z = 2,514$; $p = 0,012$), али и статистички значајно нижа у групи I у односу на I-AB3 и I-AB6 ($z = 2,514$; $p = 0,012$), као и у групи I-AB1 у односу на I-AB3 и I-AB6 ($z = 2,546$; $p = 0,011$) групе. Нивои експресије гена за апидецин (график 149) били су статистички значајно нижи у групи I у односу на све групе: -AB ($z = 2,507$;

$p = 0,012$), I-AB1 ($z = 2,095$; $p = 0,036$), I-AB3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-AB6 ($z = 2,305$; $p = 0,021$); али и статистички значајно виши у групи АВ у односу на групе I-AB1 ($z = 2,514$; $p = 0,012$), I-AB3 ($z = 2,514$; $p = 0,012$) и I-AB6 ($z = 2,514$; $p = 0,012$); као и у групи I-AB1 у односу на I-AB3 ($z = 2,522$; $p = 0,012$).



Графици 148. и 149: Нивои експресије гена за дефензин и апидецин код пчела жртвованих петнаестог дана

Осим тога, ниво експресије гена за вителогенин (график 150) био је статистички значајно виши у групи АВ у односу на групе I ($z = 2,507$; $p = 0,012$), I-AB1 ($z = 2,514$; $p = 0,012$), I-AB3 ($z = 2,538$; $p = 0,012$) и I-AB6 ($z = 2,514$; $p = 0,012$). Осим тога нивои експресије гена за вителогенин били су статистички значајно виши у групи I-AB6 у односу групе I-AB1 ($z = 2,522$; $p = 0,012$) и I-AB3 ($z = 2,546$; $p = 0,011$).

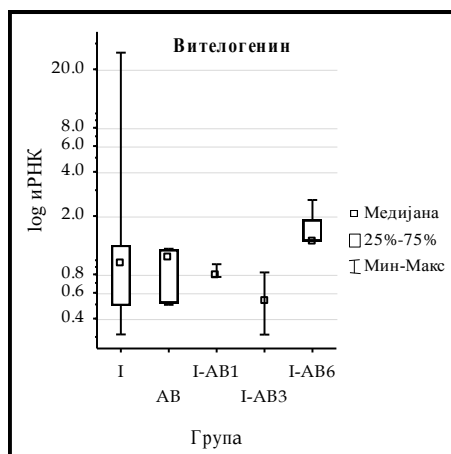
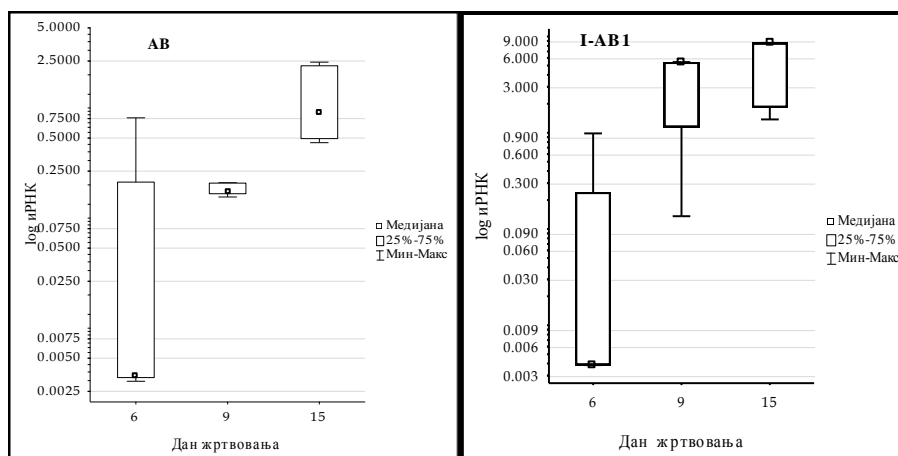


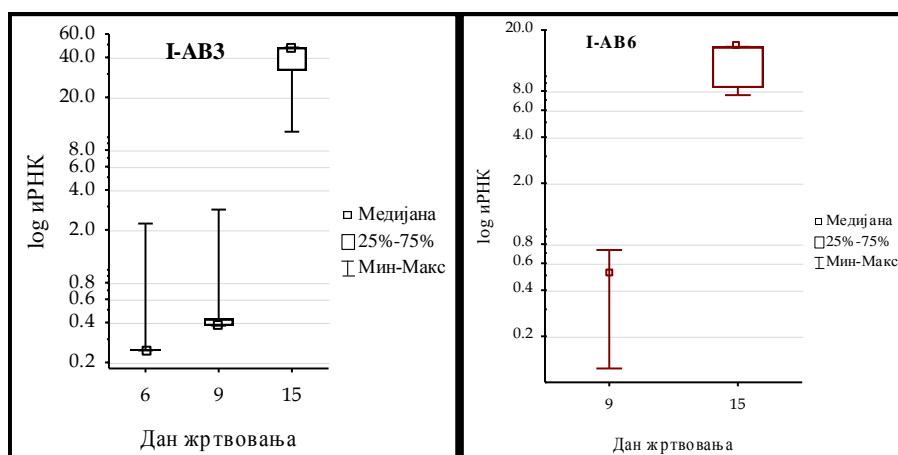
График 150: Нивои експресије гена за вителогенин код пчела жртвованих петнаестог дана

Нивои експресије гена у оквиру исте групе у различитим моментима узорковања пчела

Анализом нивоа експресије гена за абецин Kruskal-Wallis тест показао је статистички веома значајну разлику у групама АВ ($N = 9,500$; $p = 0,009$), I-AB1 ($N = 9,258$; $p = 0,0098$) и I-AB3 ($N = 10,878$; $p = 0,004$), док у групи I није било статистички значајне разлике ($N = 5,420$; $p = 0,067$). У групи АВ (график 151) експресија абецина (Mann-Whitny U тест) била је статистички значајно виша 15. у односу на шести ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 9. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$). У групи I-AB1 (график 152) експресија абецина била је статистички значајно нижа 6. у односу на 9. дан ($z = 2,141$; $p = 0,032$) и 15. дан ($z = 2,570$; $p = 0,010$). У групи I-AB3 (график 153) експресија гена за абецин, 15. дана, била је статистички значајно виша како у односу на 9. ($z = 2,522$; $p = 0,012$) тако и на 6. дан ($z = 2,522$; $p = 0,012$). У групи I-AB6 (график 154) експресија гена за абецин била је статистички значајно виша 15. у односу на 9. ($z = 2,546$; $p = 0,011$) дан, док је у групи I била виша 9. него 15. дана ($z = 2,402$; $p = 0,016$).



Графици 151. и 152: Нивои експресије гена за абецин у групама АВ и I-AB1 у различитим моментима жртвовања пчела

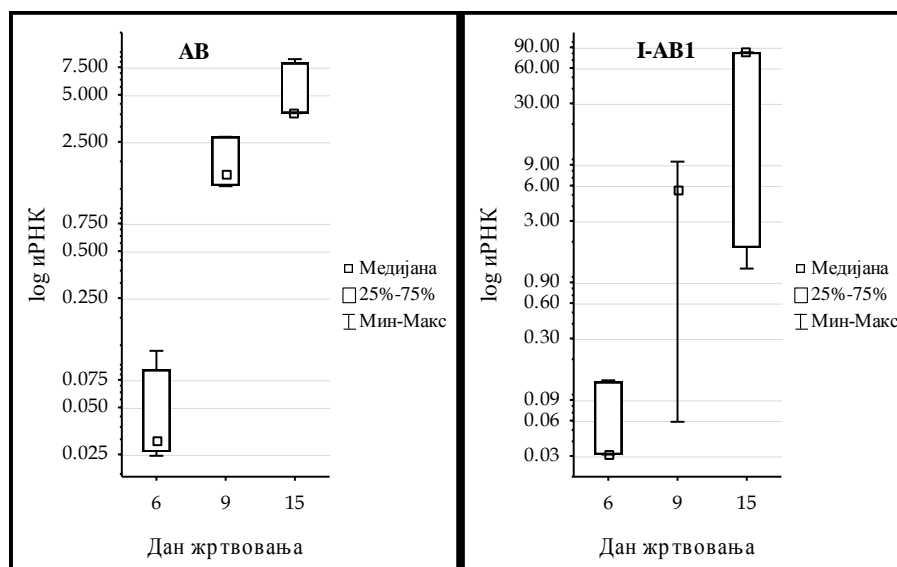


Графици 153. и 154: Нивои експресије гена за абецин у групама I-AB3 и I-AB6 у различитим моментима жртвовања пчела

Резултати Kruskal-Wallis теста показали су статистички значајну разлику у експресији гена за хименоптецин код I-AB1 ($H = 8,679$; $p = 0,013$) групе, док је разлика била статистички веома значајна у групама АВ ($H = 12,500$; $p = 0,002$) и I-AB3 ($H = 12,590$; $p = 0,002$), док у групи I није било статистички значајне разлике ($H = 5,360$; $p = 0,069$).

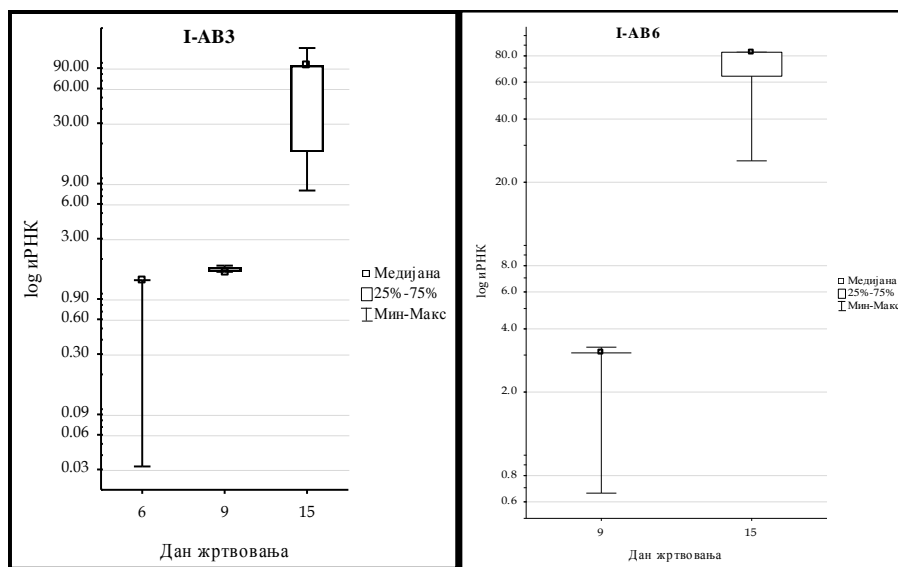
Анализом експресије гена за хименоптецин помоћу Mann-Whitny U теста утврђено је следеће: у групи I (график 47) била је статистички значајно нижа 15. у односу на 9. дан ($z = 2,402$; $p = 0,016$); у групи АВ (график 155) била је статистички значајно виша 15. дана у односу на 9. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и

шести дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$), али и 9. дана у односу на 6. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$) дан; у групи I-AB1 (график 156) била је најнижа 6. дана, и то статистички значајно нижа него 9. дана ($z = 2,121$; $p = 0,034$) као и 15. дана ($z = 2,570$; $p = 0,010$);



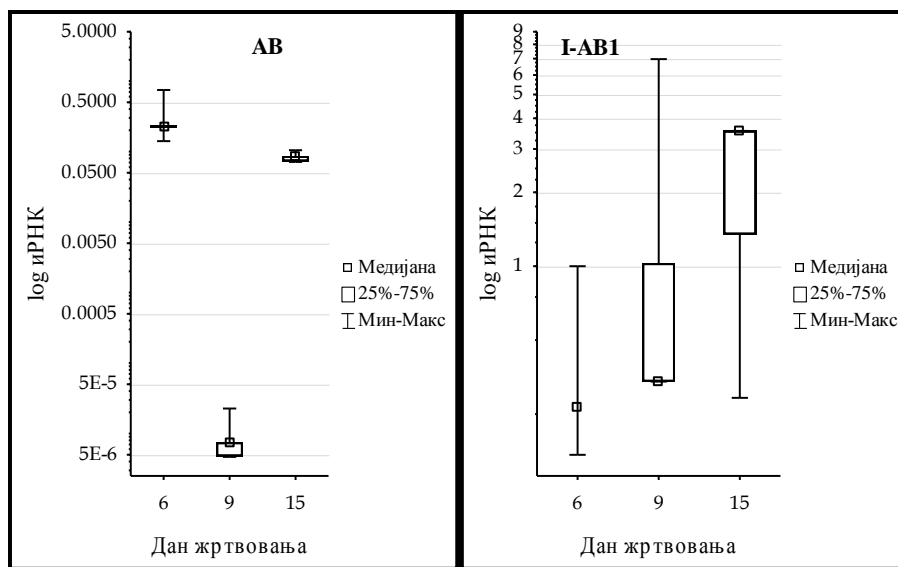
Графици 155. и 156: Нивои експресије гена за хименоптецин у групама АВ и I-AB1 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-AB3 (график 157) експресија гена за хименоптецин повећавала се кроз време и била је виша 9. дана у односу на 6. дан ($z = 2,530$; $p = 0,011$), 15. дана у односу на 9. дан ($z = 2,522$; $p = 0,012$), али и 15. дана у односу на 6. дан ($z = 2,530$; $p = 0,012$); у групи I-AB6 (график 158) била је виша 15. у односу на 9. дан ($z = 2,570$; $p = 0,010$).

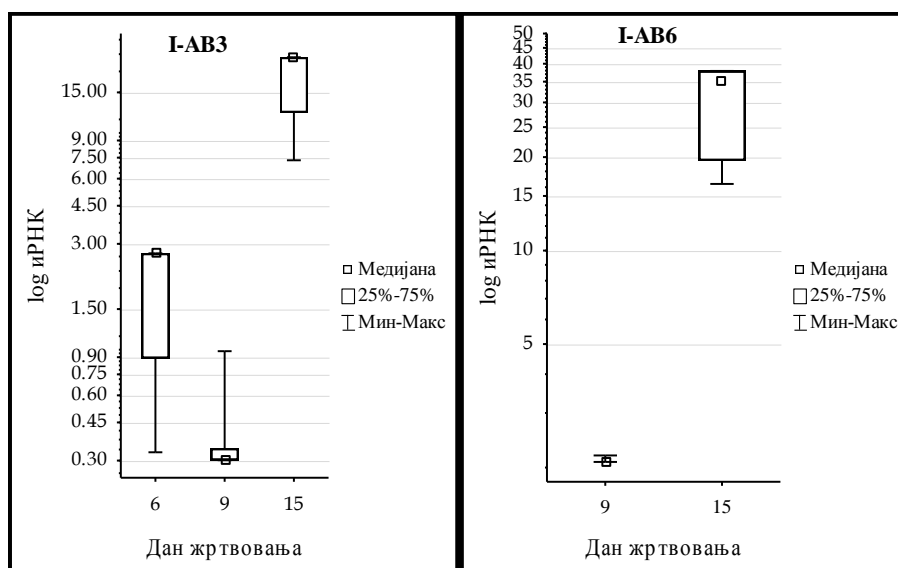


Графици 157. и 158: Нивои експресије гена за хименоптецин у групама I-AB3 и I-AB6 у различитим моментима жртвовања пчела

Нивои експресије гена за дефензин према резултатима Kruskal-Wallis теста статистички су се веома значајно разликовали у групама AB ($N = 12,500$; $p = 0,002$) и I-AB3 ($N = 11,301$; $p = 0,004$), значајно у групи I-AB1 ($N = 7,135$; $p = 0,028$), док у групи I није било значајне разлике ($N = 2,980$; $p = 0,1367$). Резултати Mann-Whitny U теста показали су да је ниво експресије гена за дефензин у групи AB (график 159) био статистички значајно виши 15. дана у односу на 9. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и шести дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$), али и шестог у односу на девети дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$); у групи I-AB1 (график 160) статистички је било значајно виша 15. дана у односу на 6. дан ($z = 2,333$; $p = 0,020$); у групи I-AB3 (график 161) експресија је била највиша 15. дана и то статистички значајно виша, како 6. дана ($z = 2,546$; $p = 0,011$), тако и 9. дана ($z = 2,522$; $p = 0,012$); у групи I-AB6 (график 162) експресија је била статистички веома значајно виша 15. дана у односу на 9. дан ($z = 2,595$; $p = 0,009$).



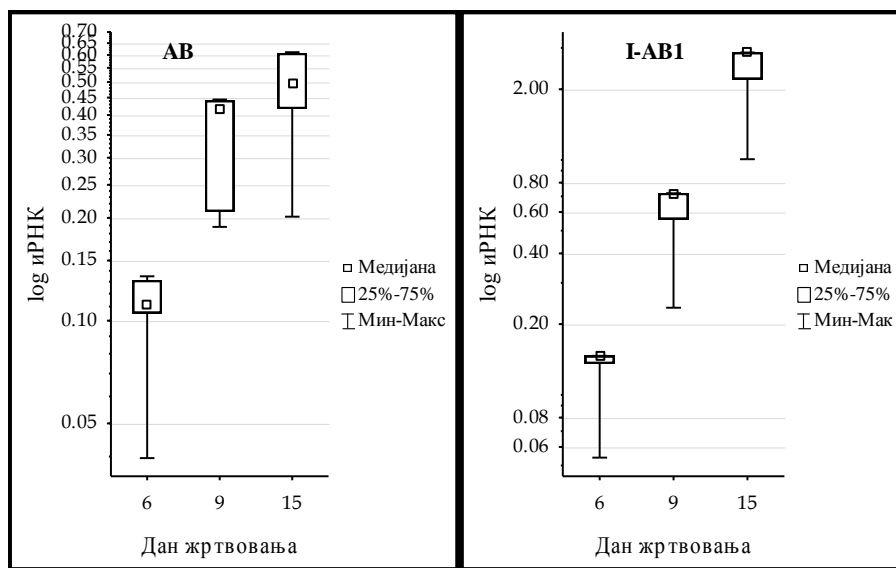
Графици 159. и 160: Нивои експресије гена за дефензин у групама АВ и I-AB1 у различитим моментима жртвовања пчела



Графици 161. и 162: Нивои експресије гена за дефензин у групама I-AB3 и I-AB6 у различитим моментима жртвовања пчела

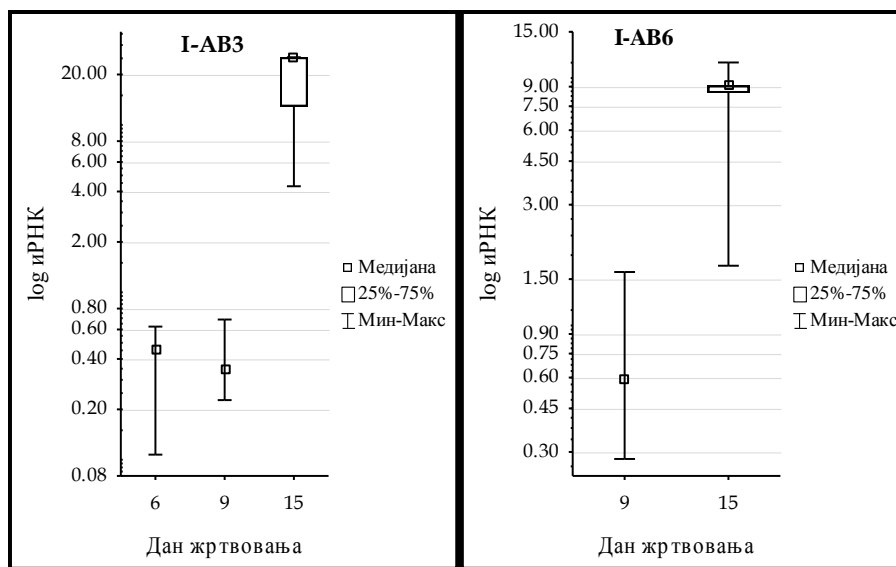
Kruskal-Wallis тестом анализирана је и експресија гена за апидецин и утврђена статистички веома значајна разлика између експресије у групама АВ ($N = 12,500$; $p = 0,002$), I-AB1 ($N = 12,704$; $p = 0,0017$) и I-AB3 ($N = 9,724$; $p = 0,0077$), док у групи I није било статистички значајних разлика ($N = 2,000$; $p = 0,368$). Резултати Mann-Whitney U теста открили су да је ниво експресије

гена за апидецин био: у групи АВ (график 163) статистички значајно нижи 6. дана у односу на 9. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 15. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$) али и 9. дана у односу на 15. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$); у групи I-AB1 (график 164) статистички значајно виши 15. дана у односу на 6. дан ($z = 2,546$; $p = 0,011$) и 9. дан ($z = 2,546$; $p = 0,011$) али и 9. дана у односу 6. дан ($z = 2,570$; $p = 0,010$);



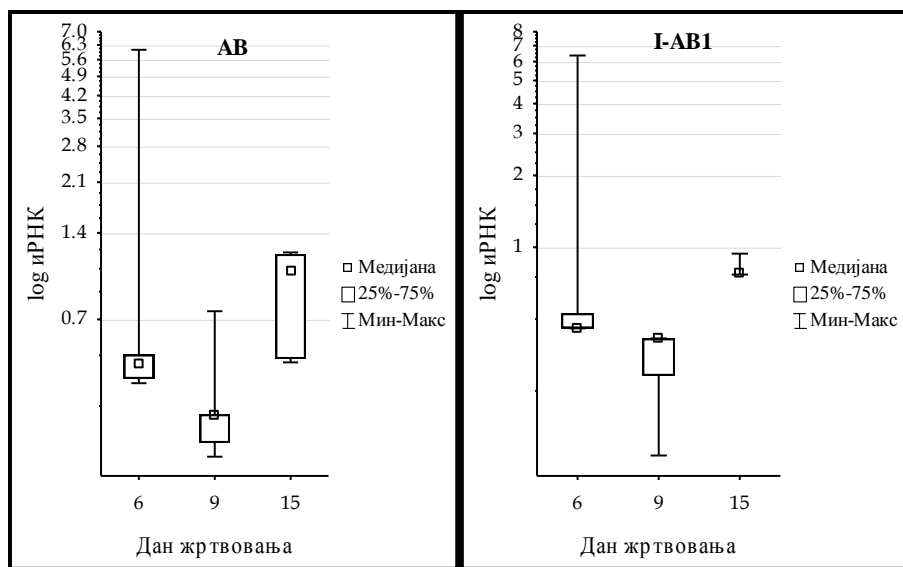
Графици 163. и 164: Нивои експресије гена за апидецин у групама АВ и I-AB1 у различитим моментима жртвовања пчела

У групи I-AB3 (график 165) ниво експресије гена за апидецин је био највиши 15. дана, када је био статистички значајно виша у односу на 6. дан ($z = 2,546$; $p = 0,011$) и 9. дан ($z = 2,522$; $p = 0,012$); у групи I-AB6 (график 166) ниво експресије је растао кроз време и био је значајно виши 15. дан у односу на 9. дан ($z = 2,546$; $p = 0,011$).

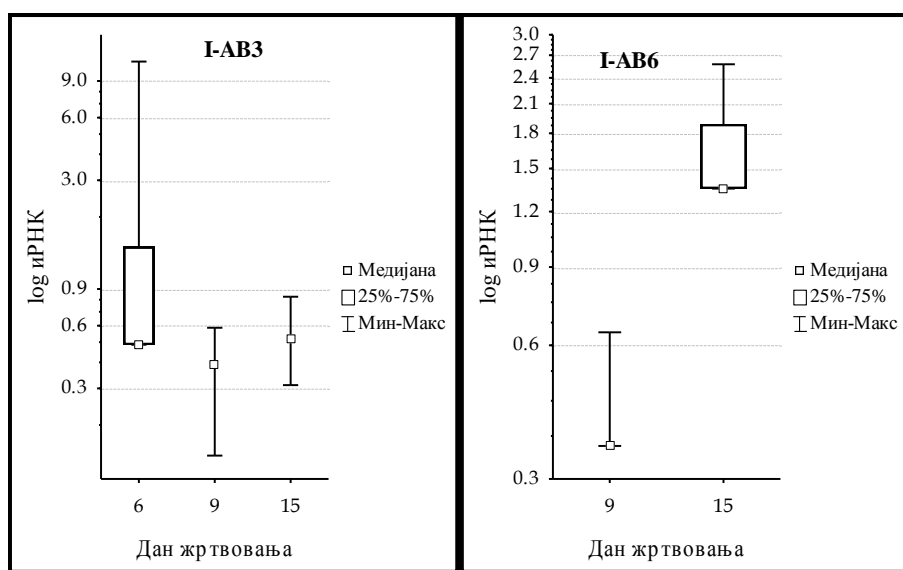


Графици 165. и 166: Нивои експресије гена за апицецин у групама I-AB3 и I-AB6 у различитим моментима жртовања пчела

Kruskal-Wallis тестом извршено је тестирање разлика у експресији гена за вителогенин у три различита момента узорковања. Ова тестирања показала су да је статистички веома значајна разлика била у групама AB ($N = 10,820$; $p = 0,005$) и I-AB1 била ($N = 10,614$; $p = 0,005$), а у групама I ($N = 5,180$; $p = 0,075$) и I-AB3 није било статистички значајне разлике ($N = 3,557$; $p = 0,169$). Резултати Mann-Whitny U теста показали су да је у групи I (график 57) експресија гена за вителогенин била статистички значајно виша 9. дана у односу на 6. дан ($z = 1,984$; $p = 0,047$); док је у групи AB (график 168) била статистички значајно виша 15. дана у односу на 6. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$) и 9. дан ($z = 2,507$; $p = 0,012$); у групи I-AB1 (график 169) статистички веома значајно нижа 9. дана у односу на 6. дан ($z = 2,652$; $p = 0,008$) и 15. дан ($z = 2,627$; $p = 0,009$); у групи I-AB3 (график 170) статистички значајно виша 6. дана у односу на 9. дан ($z = 2,015$; $p = 0,044$); а у групи I-AB6 (график 171) статистички веома значајно виша 15. дана у односи на 9. дан ($z = 2,652$; $p = 0,008$).



Графици 168. и 169: Нивои експресије гена за вителогенин у групама АВ и I-AB1 у различитим моментима жртовања пчела



Графици 170. и 171: Нивои експресије гена за вителогенин у групама I-AB3 и I-AB6 у различитим моментима жртовања пчела

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Утицај фумагалина на праћене параметре

Фумагнилин је моћан антибиотик изолован из гљивице *Aspergillus fumigatus* који се примењује против микроспоридијалних инфекције у ветеринарској и хуманој медицини (Van den Heever и сар., 2014). Континуирано се користи у пчеларству за третман најпре *Nosema apis* а касније (након њеног описивања) и *N. ceranae* (Van den Heever и сар., 2016a), јер је убрзо након открића фумагалина (Hanson и Eble 1949) доказана и његова ефикасност у контроли нозема инфекција код пчела (Katznelson и Jamieson 1952; Bailey 1953). За контролу инфекција са *N. ceranae* према неким ауторима је неопходно понављати сезонске третмане (Van den Heever и сар., 2014). Међутим, треба бити опрезан јер на овај начин, иако фумагнилин деградира током времена (Kochansky и Nasr, 2004; Nozal и сар., 2008; Higes и сар., 2011), неколико генерација пчела бива изложено ниским нивоима фумагалина заосталог у кошници (Higes и сар., 2011; Huang и сар., 2013) који могу довести до супротног ефекта, односно хиперпролиферације *Nosema* spp. (Huang и сар., 2013).

Број угинулих пчела у овом експерименту (графици 1-5) у инфицираној групи (I) и контролној неинфицираној групи (NI) статистички се веома значајно разликовао и доказ је повећања морталитета пчела након инфекције спорама *N. ceranae* што је у складу са многим ранијим сличним лабораторијским кавезним експериментима (Mayack и Naug, 2009; Alaux и сар., 2010; Martín-Hernández и сар., 2011; Dussaubat и сар., 2012; Goblirsch и сар., 2013; Schwarz и Evans, 2013; Aufauvre и сар., 2014; Basualdo и сар., 2014; Roberts и Hughes, 2014a,b; Williams и сар., 2014; Doublet и сар., 2015a; Huang и сар., 2015). Одсуство статистички значајне разлике у броју угинулих пчела између контролне (I) групе и групе која је све време добијала фумагнилин а није била инфицирана ноземом (F) показали су да у овом експерименту

фумагилин није имао статистички значајан негативан утицај на преживљавање пчела. Осим тога, одсуство значајних разлика у преживљавању пчела у контролној неинфицираној групи (NI) и групама које су поред инфекције ноземом добијале фумагилин од првог (I-F1) и трећег (I-F3) дана, а статистички значајно боље преживљавање у ове две групе (I-F1 и I-F3) у односу на групу (I), говоре о смањењу смртности код инфицираних пчела уколико се третирају фумагилином, што је у складу са многим ранијим истраживањима (Van den Heever и сар., 2014).

Микроскопским прегледом пчела, споре ноземе нису детектоване у узорцима пчела из неинфицираних група (NI и F) што доказује да током овог експеримента није било унакрсне контаминације међу експерименталним групама. Број спора ноземе био је статистички веома значајно већи у групи I у односу на све остале групе. Након групе I највећи број спора детектован је у групи I-F6, затим у групи I-F3, док је најмање спора било у групи I-F1. Ови резултати говоре о директној вези између третмана фумагилином и бројности спора ноземе, односно потврђују познати антинозематозни ефекат фумагилина (Furgala и Gochbauer, 1969; Furgala и Boch, 1970; Szabo и Heikel, 1987; Woyke, 1987; Webster, 1994; Cox-Foster и сар., 2007; Martín-Hernández и сар., 2007; Higes и сар., , 2008c, 2009b, 2010a; 2011; Williams и сар., 2008, 2011; Van Engelsdorp и сар., 2009; Fries, 2010; Stevanovic и сар., 2011; Botias и сар., 2012; Martínez, и сар., 2012; Van den Heever и сар., 2014; Giacobino и сар., 2016).

Анализа нивоа експресије гена значајних за имунитет код пчела жртвованих шестог дана (три дана након инфекције спорама *N. ceranae*) показала је да је једина статистички значајна разлика била у експресији абесина и тада је била нешто нижа у групи I-F3 која је добијала препарат од трећег дана, дакле истовремено са инфекцијом спорама ноземе. Прилично стабилни нивои генске експресије при овом жртвовању говоре о томе да је период од три дана, колико је прошло од инфекције, кратак да нозема изазове поремећај експресије ових гена. Наведени налази у складу

су са резултатима одсуства спора у пчелама узоркованим у датом тренутку, али и неким ранијим истраживањима (Glavinic и сар., 2017; Glavinic и сар., 2019). У прилог томе иду и резултати праћења нивоа оксидативног стреса (графици 11-14). Нивои активности CAT и GST били су најнижи у групи F, а највиши у групи I-F1 у односу на остале групе. Оваква активност антиоксидативних ензима говори о синергистички негативном ефекту инфекције ноземом и антибиотика апликованог од првог дана (група I-F1), док исти резултати не указују на значајно повећање праћених параметара у првом жртвовању, код група које су биле само инфициране ноземом (I) или само третиране фумагилином (F). Активност SOD и концентрација MDA били су значајно нижи у неинфицираној групи, што је и очекивано обзиром да ова група није била подвргнута стресу изазваном било инфекцијом било третманом. Међутим, концентрација MDA у групи I (где није било значајног повећања у односу на групе I-F3 и I-F6) такође говори о одсуству оксидативног стреса изазваног ноземом у овако кратком временском периоду.

Посматрајући нивое експресије гена код пчела жртвованих деветог дана издваја се неколико значајних разлика. Експресија гена за абецин, апидецин и вителогенин била је виша у инфицираној (I) групи у односу на остале (графици 32., 35. и 36), за абецин чак виша него у свим осталим групама, а за вителогенин у свим осим у I-F3. Из овога се закључује да је супримирајући утицај фумагилина на експресију гена у овом тренутку био већи него инфекција са *N. ceranae*. Ово може бити објашњено чињеницом да инфекција ноземом није стигла да се развије у пуној мери у овом тренутку, јер према резултатима Higes и сар. (2007), већи део ћелија средњег црева пчела бива захваћен и са присутним симптомима дегенерације тек седмог дана након инфекције. У прилог томе иду и наши резултати о значајно већем броју спора у моменту последњег жртвовања (15. дана након излегања). Друга истраживања такође говоре о значајном расту количине *N. ceranae* тек након шестог (Chaimanee и сар., 2012),

деветог (Glavinic и сар., 2017; Glavinic и сар., 2019), десетог (Higes и сар., 2007; Milbrath и сар. 2015) или чак дванаестог дана (Huang и Solter, 2013). Са друге стране, фумагилин је моћан антибиотик (Van den Heever и сар., 2014) који има потврђен генотоксични потенцијал (Stanimirovic и сар., 2007a; Stevanovic и сар., 2008; Van den Heever и сар., 2016a), негативан утицај на здравље пчела (Liu, 1990; Huang и сар., 2013) али само неколико истраживања је потврдило утицај на морталитет пчела (Rada и сар., 1997; Van den Heever и сар. 2016b). Насупрот томе, активност антиоксидативних ензима (CAT, GST и SOD) у овом тренутку била је најнижа у групи F што указује да употреба фумагилина не изазива оксидативни стрес.

Код пчела жртвованих 15. дана активност антиоксидативних ензима, а пре свега SOD и GST која је била виша у инфицираној групи (I) у односу на групу F, у складу је са ранијим налазима о утицају ноземе на повећање активности GST услед инфекције са *N. ceranae*. (Duscaubat и сар., 2012; Vejnovic и сар., 2018). Насупрот томе, ниже активности CAT, SOD и GST и концентрације MDA (грефици 11-14) у групи F (која је добијала фумагилин све време експеримента) у односу на већину других група говори о одсуству оксидативног стреса индукованог употребом фумагилина, иако је од раније познат утицај неких антиинфламаторних супстанци, као што је кофеин, у повећању антиоксидативне активности (Strachanska и сар., 2014; Balieira и сар., 2018). Такође, нивои експресије гена петнаестог дана (графици 37-41) иду у прилог позитивном ефекту фумагилина. Нивои експресије свих гена за имуне пептиде били су значајно виши код група које су добијале фумагилин пре (I-F1), у истом тренутку (I-F3) или након инфекције (I-F6) спорама *N. ceranae* у односу на инфицирану групу (I). Дакле, супресија гена значајних за имунитет пчела изазвана инфекцијом ноземом потврђена је у овом експерименту и у складу је са ранијим истраживањима (Antúnez и сар., 2009; Chaimanee и сар., 2012; Aufauvre и сар., 2014; Badaoui и сар., 2017; Glavinic и сар., 2017).

Са друге стране, нивои експресије у групама које су поред инфекције ноземом добијале фумагалин били су повишени и говоре о ефекту фумагалина. Фумагалин је код ових пчела спречио супресију коју је *N. ceranae* изазвала у групи I. Позитивни ефекат фумагалина је у нашем истраживању потврђен и анализом нивоа експресије гена кроз време, пратећи ново експресије кроз различите моменте узорковања пчела (6., 9. и 15 дана). У свим групама у којима су пчеле поред инфекције ноземом добијале и фумагалин ниво експресије већине гена био је највиши 15. дана (графици 37-41). Ефикасност фумагалина у контроли нозема инфекције је одавно доказана у третману пчела широм света (Furgala и Gochnauer, 1969; Furgala и Boch, 1970; Szabo и Heikel, 1987; Woyke, 1987; Webster, 1994; Cox-Foster и сар., 2007; Martín-Hernández и сар., 2007; Higes и сар., , 2008c, 2009b, 2010a; 2011; Williams и сар., 2008, 2011; Van Engelsdorp и сар., 2009; Fries, 2010; Stevanovic и сар., 2011; Botias и сар., 2012; Martínez, и сар., 2012; Van den Heever и сар., 2014; Giacobino и сар., 2016). Значајно је рећи да, иако се у пчеларству фумагалин користи више од пола века, још увек није пријављена појава резистенција ноземе на овај антибиотик (Van den Heever и сар., 2016a). Посматрајући детаљније нивое експресије гена за хименоптецин дефензин и апидецин код различитих група у нашем експерименту (графици 38-40) уочава се да је највиши ниво експресије био у групи која је фумагалин добијала пре инфекције ноземом (I-F1), дакле у групи у којој је он био апликован превентивно, што је у складу са неким ранијим истраживањима на овим просторима (Mladjan и сар., 2000). Међутим, превентивну апликацију антибиотика свакако треба избегавати, имајући у виду чињеницу да фумагалин може оставити резидуе у кошници (Furgala и Gochnauer, 1969; Lopez и сар., 2008; Nozal и сар., 2008; Kanda и сар., 2011; Huang и сар., 2013; Van den Heever и сар., 2014, 2015), али и налазе појединих истраживача да, иако има ефекта на количину ноземе, третман фумагалином не повећава приносе друштава (Pajuelo и сар., 2008; Giacobino и сар., 2016). Такође, нижи нивои експресија гена код

пчела које су током нашег експеримента добијале само фумагилин (а нису биле инфициране спорама *N. ceranae*) показују негативан ефекат фумагилина на имуни систем пчела, што је у складу са недавним резултатима утицаја неких других антибиотика на експресију гена за имунепептиде (Li и сар., 2019). Из овога се може закључити да сам фумагилин не повећава експресију гена значајних за имунитет, напротив код неких гена (абецин и дефензин) је 15. дана довео и до веће супресије него *N. ceranae*. Међутим, у групама које су инфициране ноземом фумагилин је смањивао супресивни ефекат овог паразита на експресију праћених гена. Имајући у виду да сам фумагилин снижава експресију гена тј. да самостално апликован нема имунопротективни ефекат, закључујемо да је његов позитивни ефекат забележен у овом истраживању последица редукције количине *N. ceranae* чиме је смањен и супресивни утицај ове микроспориције на имуно гене. Овакви налази су веома значајни јер представљају први доказ утицаја фумагилина на експресију гена за имуне пептиде пчела, и у складу су са раније доказаним антинозематозним ефектима (Furgala и Gochnauer, 1969; Furgala и Boch, 1970; Szabo и Heikel, 1987; Woyke, 1987; Webster, 1994; Cox-Foster и сар., 2007; Martín-Hernández и сар., 2007; Higes и сар., , 2008c, 2009b, 2010a; 2011; Williams и сар., 2008, 2011; Van Engelsdorp и сар., 2009; Fries, 2010; Stevanovic и сар., 2011; Botias и сар., 2012; Martínez, и сар., 2012; Van den Heever и сар., 2014; Giacobino и сар., 2016.). Иако су за фумагилин доказана одређена негативна дејства (Liu, 1990, Rada и сар., 1997; Huang и сар., 2013; Van den Heever и сар. 2016b), генотоксични потенцијал (Stanimirovic и сар., 2007a; Stevanovic и сар., 2008; Van den Heever и сар., 2016a), као и ризик од остављања резидуа у производима (Furgala и Gochnauer, 1969; Lopez и сар., 2008; Nozal и сар., 2008; Kanda и сар., 2011; Huang и сар., 2013; Van den Heever и сар., 2014, 2015) овај антибиотик се и даље сматра јединим ефикасним леком за третман инфекције са *N. ceranae* (Higes и сар., 2011; Williams и сар., 2008, 2011; Van den Heever и сар., 2014) који је у неколико комерцијалних

формулација (Fumagilin-B, Fumidil B, Fumagilin DCH и др.) регистрован у Сједињеним америчким државама, Канади (Higes и сар., 2011) и Аргентини (Sarlo и сар., 2012), док у европским земљама нема регистрованих формулација (Sarlo и сар., 2012). У неколико Европских земаља због великих губитака пчела и високе преваленције *N. ceranae* (Уједињено краљевство, Шпанија, Белгија, Грчка Мађарска, Румунија и др) добијена су привремена одобрења за употребу фумагилина под ветеринарским надзором за лечење ноземе у позитивним друштвима (Higes и сар., 2011). Константно се трага за синтетским компонентама које би биле замена за фумагилин, неке од њих показале су значајну биолошку активност против *N. ceranae*, али ниједна није имала ефикасност као фумагилин (Van den Heever и сар., 2016a).

6. 2. Утицај тимола на праћене параметре

Тимол, енг: Thymol (3-hydroxy-p-cumene), је састојак етеричног уља добијеног од тимијана (лат. *Thymus vulgaris*) и многих других биљних врста. Годинама је познат инхибиторни утицај тимола на раст патогених бактерија и гљивица, као што су *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus flavus* и *Cryptococcus neoformans* (Maistrello и сар., 2008). У пчеларству се већ деценијама употребљава за сузбијање пчелињег кршља *Varroa destructor* (Chiesa, 1991). Почетком 21. века обављена су и прва истраживања потенцијалног ефекта тимола у сузбијању *Nosema* инфекције у кошници (Rice, 2001; Yucel и Dogaroglu, 2005).

Резултати морталитета пчела у нашем експерименту (графици 1-5) показали су да је статистички веома значајно већи број угинулих пчела био у инфицираној (I) групи у односу на контролну неинфицирану (NI) групу, тј. да је инфекција са *N. ceranae* скратила животни век пчела што је у складу и са ранијим истраживањима (Mayack и Naug, 2009; Alaux и сар., 2010; Martín-Hernández и сар., 2011; Dussaubat и сар., 2012; Goblirsch и сар., 2013; Schwarz и Evans, 2013; Aufauvre и сар., 2014; Basualdo и сар., 2014; Roberts и Hughes, 2014a,b; Williams и сар., 2014; Doublet и сар., 2015a; Huang и сар., 2015; Glavinic и сар., 2019). Број угинулих пчела у групама које су храњене тимолом (T, I-T1, I-T3 и I-T6) није био статистички значајно различит у односу на угинућа у инфицираној групи (I). Овај налаз у складу је са резултатима Maistrello и сар. (2008) у чијим истраживањима, такође, није било разлике у преживљавању пчела које су биле инфициране ноземом и оних код којих је у исхрани додаван тимол. Ефекат тимола на угинуће пчела може бити објашњен потенцијалним токсичним ефектом етеричних уља тимијана због којих је тимол класификован као умерено токсични производ (Maistrello и сар., 2008). Осим тога у истраживању Vergougnoux и сар. (2012) тимол је имао негативан утицај и на фототаксично понашање пчела. Са друге стране у

нашем експерименту није било статистички значајне разлике ни у преживљавању пчела храњених тимолом и пчела у нетретираној групи (NI), што говори о томе да је морталитет изазван тимолом умерен и мањи од групе инфициране ноземом. Одсуство токсичног ефекта тимола забележено је у истраживању Costa и сар. (2009) и у коме су пчеле храњене тимолом живеле дуже или у истраживању Vergougnoux и сар., (2012) исто у односу на контролну групу. Такође, Ebert и сар. (2007) доказали су одсуство токсичног ефекта исхране пчела тимолом. Ови и ранији подаци о ниској токсичности тимола (Lenga, 1988) и његовом значају за пчеларство омогућили су да према регулативи Европске уније No. 834/2007 (ЕС, 2007) тимол буде одобрен за контролу пчелињег крпеља *V. destructor* у органском пчеларењу (Maistrello и сар., 2008).

Код пчела жртвованих 6. дана нису детектоване споре ноземе, што је и очекивано имајући у виду кратак постинфективни период који није био довољан да се формира значајан број спора (Higes и сар. (2007). Број спора ноземе код пчела жртвованих 9. дана у нашем експерименту није се статистички значајно разликовао међу контролним и групама које су храњене уз додатак тимола (график 7), за разлику од пчела узоркованих 15. дана када је статистички веома значајно већи број спора детектован у контролној, инфицираној групи (I). Овај налаз у складу је са резултатима Maistrello и сар. (2008) који су овај ефекат тумачили тиме да тимол инхибира развој ноземе што за последицу има нижи број спора ноземе на крају експеримента у поређењу са ранијим узорковањима током експеримента. Такође, Costa и сар. (2009) доказали су сигнификантно нижи ниво инфекције ноземом код пчела храњених сирупом са тимолом као и Van den Heever и сар. (2016) у чијим експериментима је доказано да тимол смањује ниво ноземе у просеку за 40%. У нашем експерименту највећи број спора међу групама третираним тимолом имала је група I-T6 што говори о слабијем постинфективном ефекту тимола у поређењу са

превентивним (I-T1 група) и истовременим (I-T3 група) третманом у односу на *Nosema* инфекцију.

Досада нису обављана испитивања утицаја исхране обogaћене тимолом на експресију гена значајних за имунитет пчела. Имајући у виду опречне резултате о токсичности и преживљавању пчела које су конзумирале тимол (Lenga, 1988; Ebert и сар., 2007; Maistrello и сар., 2008; Costa и сар., 2009; Vergougnoix и сар., 2012) резултати овог рада о ефекту тимола на експресију гена дају значајне податке о његовом утицају на имунитет, а самим тим и здравље пчела уопште. Код пчела жртвованих шестог дана након излегања, углавном није било великих разлика у нивоима експресије гена између експерименталних група. Овај налаз не изненађује, имајући у виду резултат одсуства спора у овим узорцима, али и чињеницу да при оптималним условима, комплетан развој паразита, односно период од ингестије споре до формирања нових спора, траје 48-60 часова (Bailey и Ball, 1991), а узорковање је извршено само три дана након инфекције спорама *N. ceranae* (пчеле су инфициране трећег дана живота). Дакле, период од три дана није био довољно дуг да ендопаразит поремети ниво експресије гена домаћина. Са друге стране, трећи дан живота изабран је за тренутак инфицирања пчела јер је организму новоизлежене пчеле неопходно да створи одређену заштиту, како прерана инфекција не би била фатална по њихов живот (Fries и сар., 2013). Разлика у експресији гена у овом тренутку (шестог дана живота пчела) била је присутна код гена за абецин и дефензин (графици б1. и б2) и то статистички значајно нижа у групама које су у исхрани добијале тимол од првог дана (Т и I-T1). Супресија може бити изазвана конзумирањем тимола од првог дана живота пчела. Овај налаз је последица експерименталног дизајна, јер новоизлежене пчеле у кошници се не хране директно сирупом који би са тимолом био додат у кошницу, храна до њих доспева посредно преко старијих пчела (DeGrandi-Hoffman и сар., 2000) и том приликом бива разређена, па би и утицај саме супстанце додате у храну био избегнут или

умањен у природним условима. Благ негативан ефекат тимола на експресију гена за абецин и дефензин у складу је и са резултатима повећане концентрације MDA који представља маркер оштећења липида, изазваног, у овом тренутку, конзумирањем тимола, односно његовим потенцијалним токсичним ефектом који је и раније доказан у неким истраживањима (Maistrello и сар., 2008; Bergougnoux и сар., 2012). Насупрот томе, активности антиоксидативних ензима (GST, CAT и SOD) као параметара оксидативног стреса не говоре о оваквом ефекту тимола на пчеле, јер је њихова активност била најмања у групи која је конзумирала тимол од првог дана а није инфицирана ноземом (Т). Повишена активност антиоксидативних ензима у инфицираној групи I у односу на групу Т говори о већем оксидативном стресу изазваном од стране ендопаразита *N. ceranae* и последичној реакцији организма у заштити ткива повећањем активности поменутих ензима.

Анализа пчела узоркованих девет дана након излегања открила је да је ниво експресије гена за абецин био највиши у инфицираној групи, односно да је био нижи код свих група које су у неком тренутку (1., 3. или 6 дана) почеле да добијају тимол у исхрани. Дакле, тимол је довео до веће супресије овог гена него сама инфекција *N. ceranae* (графици 64-68). Овакав налаз је и очекиван, имајући на уму чињеницу да је и у другим истраживањима тимол испољио своје најбоље ефекте тек на крају експеримента (Maistrello и сар., 2008; Costa и сар., 2009), док нозема, насупрот томе, све веће последице по пчеле оставља током времена (Bailey и Ball, 1991; Costa и сар., 2009; Glavinic и сар., 2017; Glavinic и сар., 2019). Осим поремећаја у експресији абецина, најочигледнији налаз у пчелама жртвованим у овом тренутку је и супресија гена за дефензин, која је била посебно изражена у групи Т (групи која је добијала тимол и која није инфицирана спорама *N. ceranae*) и то статистички значајно у односу на све остале групе. Ова супресија јавила се као последица ефекта тимола конзумираног током претходних девет дана (све време живота пчела) и

иде у прилог неким ранијим налазима који су показали да тимол конзумиран дуже или у већим концентрацијама може имати негативне ефекте по здравље и понашање пчела (Floris и сар., 2004; Imdorf и сар., 1995; Maistrello и сар., 2008; Mondet и сар., 2011; Bergougnoux и сар., 2012). Осим тога у овом тренутку (9. дана) параметри оксидативног стреса нису показивали јасну правилност у својим концентрацијама (MDA) и активностима (GST, SOD и CAT), односно доста су се разликовали појединачно посматрани. Овај налаз у складу је са резултатом броја спора 9. дана, када није било статистички значајне разлике ($p = 0,102$) у броју спора међу свим групама и може бити објашњен борбом организма да савлада напад ендопаразита (*N. ceranae*) кроз продукцију ROS (непотпуно редукованих кисеоникових продуката) и, са друге стране, активирањем антиоксидативних (заштитних) механизма како би спречио оштећење ткива створеним ROS.

На крају експеримента (петнаестог дана) тимол конзумиран кроз шећерни сируп показао је највећи антинозематозни ефекат посматрано кроз број спора ноземе (график 7). Осим тога резултати активности и концентрације праћених параметара оксидативног стреса показали су далеко повољније ефекте тимола у односу на узорке из претходног жртвовања. Активности свих антиоксидативних ензима (SOD, CAT и GST) и концентрације MDA биле су статистички значајно више у инфицираној групи I у односу на већину других узорака, док су најниже активности поменутих ензима забележене у групама T или I-T1 које су све време експеримента храњене уз додатак тимола. Ови резултати говоре о постигнутом балансу у редокс потенцијалу организама пчела храњених тимолом, односно успеху организма у контроли антиоксидативног одговора код ових пчела, док је у контролној инфицираној (I) групи *N. ceranae* на крају експеримента изазивала оксидативни стрес кроз продукцију ROS, а последично и повећање параметара антиоксидативне заштите (графици 15-18), што је у складу са ранијим истраживањима у којима је забележен сличан ефекат

некох загађивача животне средине на пчеле (Nikolic и сар., 2015; Orcic и сар., 2017) .

Када је реч о експресији гена код пчела жртвованих 15. дана, нивои вителогенина (график 73) су најмање били промењени. Између инфициране групе (I) и групе која је добијала само тимол (T) није било разлике у експресији вителогенина у односу на остале експерименталне групе. Ово указује на то да је ниво вителогенина био исти у групи која је добијала и групама које нису добијале тимол. Дакле, *N. ceranae* као паразит једнако је реметила експресију гена за вителогенин као и сам тимол. Осим тога, није било њиховог синергистичког деловања на експресију гена за вителогенин, јер је исти ниво експресије био и у групама које су и третиране тимолом и инфициране ноземом (I-T1, I-T3 и I-T6). Тимол коришћен у третману пчелињег крпеља у истраживању Boncristiani и сар. (2012) довео је до смањења нивоа експресије гена за вителогенин, али је и реметио експресију неких других гена значајних за детоксификацију и имунитет пчела, који нису праћени у нашем раду. Промене експресије вителогенина под дејством тимола забележене су и у другим истраживањима (Charpentier и сар., 2014) у којима је овај поремећај експресије гена за вителогенин доведен у везу са могућим модификацијама особина карактеристичним за одређену животну доб пчела, а на које вителогенин има значајан утицај (Charpentier и сар., 2014).

Нивои експресије гена за апидецини и хименоптецин били су значајно виши у свим групама које су добијале тимол у односу на инфицирану контролу (I групу). Међутим, код апидецина су нивои били и статистички значајно нижи у групи која је добијала тимол а није имала инфекцију, у односу на инфициране и тимолом третиране пчеле, док код хименоптецина ове разлике није било (гарфици 71. и 72). Осим код апидецина, група T је имала ниже вредности за експресију гена за абецин и дефензин у односу на остале групе које су инфициране и третиране

тимолом од првог (I-T1), трећег (I-T3) и шестог (I-T6) дана. Код дефензина су ове вредности (у групи Т) биле ниже чак и од инфициране (I) групе. Број спора ноземе на крају експеримента говори о евидентном антинозематозном ефекту тимола. У складу са тим, резултати експресије гена показују да овакав ефекат тимола спречава супресијивни ефекат *N. ceranae* на експресију гена значајних за имунитет али и смањење оксидативног стреса о чему говоре активности SOD, CAT и GST и концентрација MDA (график 18). Међутим, супресија појединих гена у групи која је примала тимол без инфекције ноземом (Т) говори о потенцијалном имуносупресивном ефекту тимола на пчеле без ноземозе. О негативном утицају тимола на неке друге врсте инсеката одавно се зна, он има доказану ефикасност у супресији развоја и преживљавања одраслих комараца (Pavela и сар., 2009; Tabanca и сар., 2010) и бубашваба (Phillips и сар., 2010). Уколико посматрамо кретање нивоа експресије гена кроз време, како је експеримент одмицао, примећује се да је у готово свим групама које су инфициране ноземом и третиране тимолом (I-T1, I-T3 и I-T6) за све гене, осим вителогенина, ниво експресије растао (графици 74-88), односно да је тимол код инфицираних пчела имао имунопротективни ефекат. Ови резултати иду у прилог налазима да тимол свој ефекат најбоље показује након дуже примене (Costa и сар., 2009; Maistrello и сар., 2008) и доказују позитиван ефекат код нозематозних пчела.

Прва истраживања ефекта тимола на пчеле инфициране крпељем *V. destructor* (Imdorf и сар., 1995, 1999; Mattila и сар., 2000; Ebert и сар., 2007) нису бележила негативан утицај тимола на пчеле. Међутим, каснија истраживања почела су да извештавају о појединим негативним ефектима тимола и на пчеле и пчелиње заједнице (Mutinelli и Baggio, 2004; Gashout и Guzmán-Novoa, 2009; Boncristiani и сар., 2012; Charpentier и сар., 2014; Al Naggar и сар., 2016; Тоомемаа, 2019). Наше истраживање показало је позитивне ефекте тимола на здравље пчела инфицираних ноземом, али свакако би требало спровести опсежнија истраживања о утицају овог

фитогеног препарата на имунитет неинфицираних пчела. Наиме, уколико је пчела инфицирана ноземом, нису забележени негативни ефекти апликованог тимола (Rice, 2001; Yucel и Dogaroglu, 2005; Maistrello и сар., 2008; Costa и сар., 2009;), јер он у овом случају има терапијски, антизематозни ефекат, који је далеко значајнији од евентуалних пропратних нежељених дејстава. Међутим, и наши резултати указују да код пчела без инфекције ноземом сам тимол може довести до појединих поремећаја, те треба бити обазрив са превентивном, неконтролисаном и прекомерном употребом тимола.

6. 3. Утицај адитива на праћене параметре

Висок квалитет хране представља један од основних фактора који утичу на здравствени статус пчела, и чији недостатак може битно утицати на губитке (EFSA, 2013; Stanimirović и сар., 2019). Глобалне промене у динамици цветања, количини и квалитету полена и нектара (Lipinski и сар., 2018), као и пракса узгоја неких монокултура (нпр. кукуруза), које су извор лошег квалитета хране за пчеле, додатно повећава ризик од мањка протеина у исхрани пчела (Di Pasquale и сар., 2013; Vanbergen и сар., 2013; Asensio и сар., 2016; Stanimirović и сар., 2019). Осим тога, сведоци смо пораста броја кошница услед жеље пчелара за што већом производњом, што је у појединим регионима довело до пренасељености кошницама и, последично, до недостатка хране за друштва. Поред мањег уноса нектара у кошницу, додатни проблем праве пчелари тако што често из друштава узму неадекватно велику количину меда коју компензују додавањем шећерног сирупа, чиме додатно погоршају стање, јер шећер представља само извор енергије који доводи до појаве оксидативног и енергетског стреса, а тиме пријемчивост на патогене, посебно нозему које је пре свега енергетски паразит (ревијално приказано у Stanimirović и сар., 2019). Имајући на уму све ово, као и чињеницу да не постоји адекватан и потпуно безбедан начин за сузбијање ноземе, све чешће се додају адитиви у прихрани пчела. Стога је од огромног значаја проналажење и тестирање нових препарата. Обећавајући ефекат показали су природни екстракти алги и етерична уља биљака (Pohorecka, 2004; Maistrello и сар., 2008; Gajger и сар., 2009а, 2009б; Gajger и сар., 2011; Porrini и сар., 2011; Suwannapong и сар., 2011; Damiani и сар., 2014; Charistos и сар., 2015; Roussel и сар., 2015; Kim и сар., 2016; Michalczyk и сар., 2016; Bravo и сар., 2017; Porrini и сар., 2017; Arismendi и сар., 2018; Lee и сар., 2018). Резултати ових истраживања као потенцијално ефикасне посебно су издвојили екстракте храстове коре (Gajger и сар., 2009а, 2009б; Gajger и сар., 2011; Michalczyk и сар., 2016),

пелена (Pohorecka, 2004; Porrini и сар., 2011; Kim и сар., 2016; Michalczyk и сар., 2016; Lee и сар., 2018) и полисахаридне екстракте алги (Charistos и сар., 2015; Roussel и сар., 2015). У овом истраживању испитали смо потенцијалне ефекте адитива на преживљавање, количину спора, ниво оксидативног стреса и експресију гена значајних за имунитет код пчела инфицираних са *N. ceranae*.

Резултати преживљавања пчела показали су да ниједан од три тестирана адитива: Beewell AminoPlus (BW), Medenko forte (MF) и екстракта *A. blazei* (AB) није утицао на преживљавање незаражених пчела (графици 3-5). Исхрана пчела инфицираних спорама *N. ceranae* уз додатак поменутих препарата од 1. (I-BW1, I-MF1 и I-AB1) и 3. (I-BW3, I-MF3 и I-AB3) дана повећала је преживљавање пчела доказујући протективни ефекат адитива након превентивне (1. дана) и примене истовремено са инфекцијом (3. дана). Међутим, препарат Beewell AminoPlus статистички значајано је повећао преживљавање пчела и у групи у којој је апликован 6. дана - постинфективно (I-BW6).

На основу резултата о бројности спора у овом експерименту утврђено је да је концентрација од 1×10^6 спора/ml изазвала 100% инфекцију пчела изложених спорама *N. ceranae*, док је у контролним групама (NI, BW, MF и AB) забележено одсуство инфекције, што је у складу са сличним истраживањима (Chaimanee и сар., 2012; Glavinic и сар., 2017; 2019) и што је потврда одсуства унакрсних инфекција *N. ceranae* између кавеза током експеримента. Споре *N. ceranae* нису детектоване код пчела жртвованих 6. дана (3 дана након инфицирања спорама *N. ceranae*). Нивои експресије гена значајних за имунитет код пчела храњених уз додатак препарата Beewell AminoPlus, Medenko forte и екстракта *A. blazei* углавном су били уједначени међу свим групама код пчела жртвованих 6. дана и нису се разликовали у односу на контролну инфицирану (I) групу. Овакав налаз је очекиван, имајући на уму податак да је само неколико епителних ћелија

црева пчела заражено 3 дана након *Nosema* инфекције, док је после 7 дана већина ћелија инфицирана и са присутним знаковима дегенерације (Higes и сар., 2007), што је такође потврђено и у нашем експерименту, јер су у свим инфицираним пчелама споре ноземе детектоване тек 9. дана (6 дана након инфекције). У свим групама које су инфициране спорама ноземе и храњене уз додатак препарата Beewell AminoPlus (I-BW1, I-BW3 I-BW6) и Medenko forte (I-MF1, I-MF3 I-MF6) број спора ноземе био је статистички значајно нижи у односу на контролну (I) групу, како код пчела жртвованих 9. дана тако и код оних које су жртвоване 15. дана (график 9). Ови резултати говоре о позитивном утицају тестираних препарата на степен инфекције микроспоридијом *N. ceranae*.

Код пчела које су поред инфекције ноземом у исхрани добијале препарат Medenko forte није било међусобне статистички значајне разлике у броју спора (како 9. тако и 15. дана), што говори о једнако добром ефекту препарата када је примењен пре инфекције (I-MF1), у истом тренутку када су пчеле инфициране (I-MF3) али и након инфекције (I-MF6), и издваја овај препарат као адитив са најбоље испољеним протективним ефектом. Овај ефекат је од изузетног значаја, имајући у виду да се инфекција ноземом константно одржава у кошници и одређени број пчела увек долази у контакт са патогеном (Huang и сар., 2013; Stevanovic и сар., 2013).

Код пчела које су поред инфицирања ноземом храњене уз додатак препарата Beewell AminoPlus, осим статистички значајно нижег броја спора 9. и 15. дана у односу на пчеле из групе I, 9. дана је било статистички веома значајно мање спора у групи I-BW1 у поређењу са групом I-BW6. Овај налаз говори о бољем ефекту препарата када је апликован превентивно (пре инфицирања спорама *N. ceranae*), односно да као аминокиселинска и витаминска мешавина има бољи ефекат након дуже примене.

Када се упореди степен инфекције ноземом између контролне (I) групе и група које су храњене уз додатак екстракта гљиве *A. blazei* (I-AB1, I-AB3 и I-AB6) статистички веома значајно већи број спора је био у групи I у односу на све друге групе, како 9. тако и 15. дана, осим пчела из групе I-AB6 узоркованим 9. дана. Овај налаз говори о значајном ефекту тестираног екстракта на интензитет инфекције. Слабији ефекат 9. дана у групи I-AB6 може бити објашњен кратким временским периодом апликовања (само 3 дана апликовања екстракта пре жртвовања), односно бољем превентивном у односу на постинфективни ефекат тестираног екстракта, што је доказано и за неке друге биљне екстракте (Arismendi и сар., 2018). У прилог томе иде и чињеница да је најмањи број спора у оба жртвовања био управо у групи I-AB1 која је екстракт добијала пре инфекције спорама *N. ceranae*.

Активности свих антиоксидативних ензима (CAT, GST и SOD) код пчела које су у исхрани добијале препарат Medenko forte (графици 23-25) биле су у готово свим случајевима ниже у односу на контролну инфицирану групу (I), нарочито на крају експеримента (15. дана), чиме је доказан утицај *N. ceranae* на изазивање оксидативног стреса код пчела, о коме се говорило и у неким ранијим истраживањима (Morimoto и сар., 2011; Dussaubat и сар., 2012; Vejnovic, 2018). У нашем истраживању изузетак су били нивои активности CAT и GST и концентрације MDA у групи која је препарат добијала превентивно (I-MF1), где су поменути параметри оксидативног стреса у неким случајевима били исти или чак и виши у односу на контролну инфицирану (I) групу. Ови налази говоре о бољем постинфективном ефекту препарата, односно бољем антинозематозном (протективном) у односу на превентивни заштитни антиоксидативни ефекат. Познато је да је екстракт храстове коре, који је један од главних састојака препарата Medenko forte, богат фенолним једињењима названим танини (Gajger и сар., 2011). Ови феноли велике молекуларне масе имају довољан број хидрокси група које формирају комплексе са протеинима,

целулозом и неким минералима и на овај начин спречавају појаву дијареје изазвану ноземом код пчела (Gajger и сар., 2011), што у великој мери има благотворан ефекат по инфициране пчеле. Осим екстракта хростове коре препарат Medenko forte садржи и екстракте пелена који такође има доказани антинозематозни ефекат (Pohorecka, 2004; Porrini и сар., 2011; Michalczyk и сар., 2015; Kim и сар., 2016; Lee и сар., 2018).

Ниво експресије гена за абецин, дефензин, хименоптецин и вителогенин код пчела жртвованих 9. дана били су статистички значајно нижи у групи пчела храњених уз додатак препарата Beewell AminoPlus од првог дана живота, а које нису инфициране ноземом (група BW) у односу на остале групе. Исти налаз супресије генске експресије био је и код дефензина у групи MF и AB. Дефензин је имунопептид који је и препознат као рани актер у имуном одговору пчела (Evans, 2004) те стога и не чуди нарочит поремећај у његовој експресији. Са друге стране доказано је да је за активност дефензина неопходна пост-транскрипциона обрада (Casteels-Josson и сар., 1994), те супресија експресије гена за дефензин не значи нужно смањење количине продукта тј. самог имунопептида и изазивање имуносупресије. Ова супресија експресије гена очигледно је изазвана конзумирањем адитива у исхрани од првог дана живота пчела. Налаз је последица експерименталног дизајна и самих лабораторијских услова, јер новоизлежене пчеле у кошници се не хране директно сирупом који би евентуално био додат у кошницу већ храна до њих доспева посредно преко старијих пчела (DeGrandi-Hoffman и сар., 2000) и том приликом бива прерађена и разређена, па би и утицај саме супстанце додате у храну на новоизлежене пчеле био избегнут у природним условима (Arismendi и сар., 2018). У прилог овоме иде и резултат нивоа експресије гена код пчела жртвованих 15. дана из групе BW и AB у којима су нивои гена за дефензин, хименоптецин, апидецин и вителогенин статистички значајно били виши у поређењу са свим осталим групама, а посебно контролном инфицираном групом I. Осим у односу на ове две групе, ниво експресије

гена за дефензин, хименоптецин и апидецин био је статистички значајно нижи у групи I у односу на групе које су инфициране, али су у исхрани добијале ова два адитива. Ови резултати су у складу са ранијим резултатима супресије гена значајних за имунитет под утицајем *N. ceranae* (Antunez и сар., 2009; Chaimanee и сар., 2012; Aufauvre и сар., 2014; Badaoui и сар., 2017; Glavinic и сар., 2017). Резултати нивоа експресије гена који су показали спречавање супресије индуковане ноземом у групама које су храњене уз додатак адитива говоре о постизању равнотеже између брзине активирања одбрамбених механизма и способности очувања енергије (Glavinic и сар., 2017). Код пчела храњених уз додатак препарата Medenko forte у већини случајева је доказана повећана експресија у односу на инфицирану групу (I). Међутим, за разлику од група BW и AB где је експресија била виша у односу на све групе (поред групе I и група инфицираних и храњених уз додатак адитива), ниво експресије већине анализираних гена у групи MF био је нижи у односу на групе које су поред инфекције добијале препарат (I-MF1, I-MF3 и I-MF6), односно нивои експресије у групи MF били су између нивоа у овим групама и групи I (инфицираној контроли). Овај налаз указује на мањи имуностимулативни ефекат препарата Medenko forte у поређењу са друга два тестирана адитива (Beewell AminoPlus и екстракт гљиве *A. blazei*), односно доказује значајнији антинозематозни него имуностимулативни ефекат што се може видети и на основу резултата броја спора *N. ceranae* на крају експеримента (график 10) али и резултата о нивоима оксидативног стреса. Антинозематозни ефекат екстракта храстове коре који се налази у препарату Medenko forte доказан је и у ранијим истраживањима (Gajger и сар., 2009а, 2009б, 2011), у којима је он објашњен ефектом стимулисања продукције и секреције слузи у епителним ћелијама чиме се облаже перитрофна мембрана и формира заштитни слој (Gajger и сар., 2011). На овај начин смањује се број инфицираних ћелија средњег црева пчеле, редукујући количину ноземе у пчелама, а самим тим и њен штетни

ефекат. Како је препарат Medenko forte показао најбољу ефикасност када је апликован истовремено са нозема инфекцијом, као најпогоднији период за његову примену препоручује се рано пролеће јер је количина ноземе у кошници највиша у овом периоду (Stevanović и сар., 2013; Glavinic и сар., 2017).

Beewell AminoPlus је препарат веома је богата аминокиселинама и витаминима те је његов већи имуностимулативни него антинозематозни ефекат очекиван. Препорука произвођача је да се овај препарат као допуна исхрани даје почетком зиме у циљу побољшања здравља друштва током зиме. Међутим, ово може изазвати нежељене ефекте, као што је у експериментима у којима је природни полен додаван као прихрана пчела у јесен изазвао продужени узгој легла који није природан и може бити проблематичан за друштва (Mattila и Otis, 2006). Слични нежељени ефекти могу се десити и када се додају други адитиви, на пример дохрана пчела комерцијалним пробиотицима нпр. *Lactobacillus rhamnosus* (пробиотик) сам или у комбинацији са инулином (пребиотицом) изазвао је значајно повећање нивоа инфекције *N. ceranae*, повећање смртности пчела као смањење имунолошког одговора пчела (Ptaszynska и сар., 2016). Резултати других истраживања доказали су утицај исхране на здравље пчела, посебно на везу између исхране и нивоа имуно пептида, дуге вечности, преживљавање пчела и њихове одбране од патогена (Alaux и сар., 2010; Alaux и сар., 2011; Basualdo и сар., 2014; Wang и сар., 2014; Antunez и сар., 2015). Резултати активности GST и CAT и концентрација MDA као антиоксидативних параметара код пчела које су храњене уз додатак препарата Beewell AminoPlus доста су били неконзистентни (графици 19-22). Овај налаз може се објаснити као покушај организма да савлада инфекцију *N. ceranae* продукцијом ROS, а затим уласком у ситуацију оштећења сопственог ткива, активирањем антиоксидативних (заштитних) механизма како би се оштећење ткива спречило. Међутим, активност SOD имала је хомогене вредности из којих се јасно види највиши ниво

оксидативног стреса у групи I, као и најнижи у групи BW што указује на антиоксидативни потенцијал препарата Beewell AminoPlus код нозематозних пчела. Осим тога, добијени резултати имунопротективног ефекта овог адитива веома богатог аминокиселинама и витаминима које се лако апсорбују, говоре да он омогућава постизање сличних ефеката као ферментисана полифлорна исхрана или перга (природна високо протеинска храна за пчеле), односно има боље ефекте у односу на друге вештачки синтетисане протеинске адитиве (Alaux и сар., 2010; Di Pasquale и сар., 2013; Basualdo и сар., 2014; Antunez и сар., 2015).

Нивои експресије гена значајних за имунитет код пчела жртвованих 15. дана показали су изражени имуностимулативни ефекат екстракта гљиве *A. blazei* у групи АВ односно, пчелама које су њиме храњене, а нису биле инфициране спорама *N. ceranae* (графици 147-150). Нивои експресије гена за хименоптецин, дефензин и апидецин код група које су осим инфекције ноземом храњене уз додатак екстракта (I-AB1, I-AB3 и I-AB6) указују на његов позитиван утицај у спречавању супресије изазване ноземом. Нивои наведених гена били су између супримираних вредности забележених код пчела из групе I и забележених високих вредности у групи АВ. Осим тога, активности антиоксидативних ензима (SOD, GST и CAT) углавном су биле најниже у овој (AB) групи, што указује на одсуство оксидативног стреса, који је насупрот томе забележен у контролној инфицираној (I) групи (нарочито активност SOD и CAT). Водени екстракт гљиве *A. blazei* који је коришћен у овом експерименту богат је полисахаридима и има доказан антиоксидативни ефекат (Wei и Griensven, 2008). Истраживања у којима су коришћени екстракти алги за третман нозематозних пчела, такође богати полисахаридима, показала су позитиван ефекат на ноземом инфициране пчеле (Roussel и сар., 2015). Овај ефекат објашњен је инхибицијом адхезије микроспоридија за циљне ћелије (Hauman и сар., 2005). Наиме, сулфатни гликани из екстраката (нпр. хепарин, хондроитин сулфат, муцин,

декстран сулфат и др) инхибирају адхезију микроспоридија за ћелије домаћина и на овај начин смањују количину инфицираних ћелија, а самим тим и степен инфекције (Науман и сар., 2005; Roussel и сар., 2015). Међутим, посматрајући број спора у групама које су третиране фумагагилином и групама које су добијале екстракт *A. blazei* увиђа се нешто мањи степен инфекције након третмана фумагагилином. Сличан налаз имали су и Roussel и сар., (2015) који то објашњавају чињеницом да блокада адхезије ноземе сулфатним гликанима не спречава аутоинфекцију која се јавља секундарно између ноземом инфицираних ћелија и суседних ћелија средњег црева пчела (Higes и сар., 2007), односно да је поменута блокада нешто мање ефикасна у односу на инхибицију раста ноземе фумагагилином (Roussel и сар., 2015). Међутим, имајући у виду све штетне ефекте које употреба антибиотика фумагагилина са собом носи, у овом раду доказани протективни ефекат екстракта гљиве *A. blazei* представља огроман потенцијал који треба додатно истражити и радити на креирању комерцијалних препарата за контролу ноземе.

7. ЗАКЉУЧЦИ

1. Инфекција пчела микроспоридијом *N. ceranae* изазвала је статистички значајно: повећање морталитета пчела, снижавање експресије већине гена значајних за имунитет и повећање оксидативног стреса.
2. Третман антибиотиком фумагагилином код неинфицираних пчела није имао статистички значајан утицај на морталитет и појаву оксидативног стреса, али је имао благ имуносупресивни ефекат што оправдава напоре у проналажењу алтернативних препарата за контролу *Nosema* инфекција.
3. Третман фумагагилином код пчела инфицираних спорама *N. ceranae* статистички значајно је: смањио степен инфекције, повећао преживљавање пчела и смањио супресију гена за имуне пептиде, чиме је доказан његов антинозематозни ефекат.
4. Третман тимолом код неинфицираних пчела није статистички значајно утицао на: морталитет и појаву оксидативног стреса, нити је битно пореметио већину гена значајних за имунитет пчела.
5. Третман тимолом показао је значајан антинозематозни ефекат код пчела инфицираних спорама *N. ceranae* доказан кроз статистички значајно: смањење степена инфекције, повећање преживљавања пчела, смањење оксидативног стреса и смањење супресије гена значајних за имунитет.

6. Третман пчела витаминско-аминокиселиним препаратом Beewell AminoPlus код неинфицираних пчела није статистички значајно утицао на морталитет и појаву оксидативног стреса, а изазвао статистички значајан стимулативни ефекат на експресију гена значајних за имунитет.

7. Исхрана уз додатак препарата Beewell AminoPlus код пчела инфицираних са *N. ceranae* довела је до статистички значајног смањења: морталитета, оксидативног стреса, степена инфекције *N. ceranae* и имуносупресије изазване инфекцијом, чиме је доказан његов имунопротективни ефекат.

8. Исхрана пчела уз додатак препарата Medenko forte богатог екстрактима храстове коре, пелена и жалфије код неинфицираних пчела није статистички значајно утицала на морталитет и оксидативни стрес, нити је довела до ремећења гена значајних за имунитет.

9. Исхрана уз додатак препарата Medenko forte код пчела инфицираних спорама *N. ceranae* довела је до статистички значајног смањења морталитета, количине спора, вредности параметара оксидативног стреса и супресије већине гена значајних за имунитет пчела, доказујући његов антинозематозни ефекат.

10. Исхрана неинфицираних пчела сирупом коме је додат екстракт гљиве *A. blazei* богат полисахаридима, није статистички значајно утицала на морталитет и појаву оксидативног стреса, а постигла је статистички значајан имуностимулативни ефекат.

11. Исхрана уз додатак екстракта гљиве *A. blazei* код пчела инфицираних *N. ceranae* довела је до статистички значајног смањења: морталитета пчела, количине спора *N. ceranae*, вредности одређених параметара оксидативног стреса и снижавања експресије гена значајних за имунитет инфицираних пчела.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Aebi H (1984) Catalase in vitro. In: Packer, L. Methods in Enzymology, vol. 105. Academic Press, Orlando: 121–126.
2. Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, Mondet F, Tchamitchan S, Cousin M, Brillard J, Baldy A, Belzunces LP, Le Conte Y (2010a) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). Environmental Microbiology 12: 774–782.
3. Alaux C, Ducloz F, Crauser D, Conte YL (2010b) Diet effects on honeybee immunocompetence. Biology Letters 6: 562–565.
4. Alaux C, Folschweiller M, McDonnell C, Beslay D, Cousin M, Dussaubat C, Brunet JL, Le Conte Y (2011a) Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). Journal of Invertebrate Pathology 106(3): 380–385.
5. Alaux C, Dantec C, Parrinello H, Le Conte Y (2011b) Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. BMC Genomics 12: 496
6. Aliferis KA, Copley T, Jabaji S (2012) Gas chromatography–mass spectrometry metabolite profiling of worker honey bee (*Apis mellifera* L.) hemolymph for the study of *Nosema ceranae* infection. Journal of Insect Physiology 58(10): 1349–1359.
7. Al Naggar Y, Tan Y, Rutherford C, Connor W, Griebel P, Giesy JP, Robertson AJ (2015) Effects of treatments with Apivar® and Thymovar® on *V. destructor* populations, virus infections and indoor winter survival of Canadian honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies. Journal of Apicultural Research 54(5): 548–554.
8. Amdam GV, Omholt SW (2003) The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. Journal of Theoretical Biology 223(4): 451–464.

9. Amdam GV, Norberg K, Hagen A, Omholt SW (2003) Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100(4): 1799-1802.
10. Amdam GV, Simões ZLP, Hagen A, Norberg K, Schröder K, Mikkelsen Ø, Kirkwood TB, Omholt SW (2004) Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology* 39(5): 767-773.
11. Arismendi N, Vargas M, López MD, Barría Y, Zapata N (2018) Promising antimicrobial activity against the honey bee parasite *Nosema ceranae* by methanolic extracts from Chilean native plants and propolis. *Journal of Apicultural Research* 57(4): 522-535.
12. Asensio I, Vicente-Rubiano M, Muñoz MJ, Fernández-Carrión E, Sánchez-Vizcaíno JM, Carballo M (2016) Importance of ecological factors and colony handling for optimizing health status of apiaries in Mediterranean ecosystems. *PLoS ONE* 11: e0164205.
13. Antunez K, Harriet J, Gende L, Maggi M, Eguaras M, Zunino P (2008) Efficacy of natural propolis extract in the control of American foulbrood. *Veterinary Microbiology* 131(3-4): 324-331.
14. Antunez K, Martín-Hernández R, Prieto L, Meana A, Zunino P, Higes M (2009) Immune-suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Environmental Microbiology* 11(9): 2284-2290.
15. Antunez K, Mendoza Y, Santos E, Invernizzi C (2013) Differential expression of vitellogenin in honey bees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Apicultural Research* 52(5): 227-234.
16. Antunez K, Anido M, Branchiccela B, Harriet J, Campa J, Invernizzi C, Santos E, Higes M, Martín-Hernández R, Zunino P (2015) Seasonal variation of honeybee pathogens and its association with pollen diversity in Uruguay. *Microbial Ecology* 70(2): 522-533.

17. Aufauvre J, Biron DG, Vidau C, Fontbonne R, Roudel M, Diogon M, Viguès B, Belzunces LP, Delbac F, Blot N (2012) Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Scientific Reports* 2: 326.
18. Aufauvre J, Misme-Aucouturier B, Viguès B, Texier C, Delbac F, Blot N (2014) Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS One* 9(3): e91686.
19. Bravo J, Carbonell V, Sepúlveda B, Delporte C, Valdovinos CE, Martín-Hernández R, Higes M (2017) Antifungal activity of the essential oil obtained from *Cryptocarya alba* against infection in honey bees by *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 149: 141–147.
20. Balieira KVB, Mazzo M, Bizerra PFV, Guimarães ARDJS, Nicodemo D, Mingatto FE (2018). Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie* 49(5): 562-572.
21. Badaoui B, Fougeroux A, Petit F, Anselmo A, Gorni C, Cucurachi M, Cersini A, Granato A, Cardeti G, Formato G, Mutinelli F, Giuffra E, Williams JL, Botti S (2017) RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *PLoS One* 12(3): e0173438.
22. Bailey L (1953) Effect of fumagillin upon *Nosema apis* (Zander). *Nature* 171: 212–213.
23. Bailey L (1967) *Nosema apis* and dysentery of the honey bee. *Journal of Apicultural Research* 6(3): 121-125.
24. Bailey L, Ball B, 1991, *Honey Bee Pathology*, 2nd Edition. Academic Press, London.
25. Basualdo M, Barragán S, Antúnez K (2014) Bee bread increases honeybee haemolymph protein and promote better survival despite of causing higher *Nosema ceranae* abundance in honeybees. *Environmental Microbiology Reports* 6(4): 396–400.

26. Bergougnoux M, Treilhou M, Armengaud C (2012) Exposure to thymol decreased phototactic behaviour in the honeybee (*Apis mellifera*) in laboratory conditions. *Apidologie* 44(1): 82-89.
27. BenVau LR, Nieh JC (2017) Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults. *Scientific Reports* 7: 14144 | DOI:10.1038/s41598-017-14702-4 .
28. Boecking O, Rath W, Drescher W (1993) Grooming and removal behaviour – strategies of *Apis mellifera* and *Apis cerana* bees against *Varroa jacobsoni*. *American Bee Journal* 133: 117-119.
29. Boecking O, Spivak M (1999) Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* 30(2-3): 141-158.
30. Boncristiani H, Underwood R, Schwarz R, Evans JD, Pettis J, vanEngelsdorp D (2012) Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* 58(5): 613-620.
31. Borneck R, Viry A, Martín-Hernández R, Higes M (2010) Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. *Journal of Apicultural Research* 49(4): 334-336.
32. Botias C, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto A, Martínez-Salvador A, De La Rúa P, Meana A, Higes M 2012 The growing prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees in Spain, an emerging problem for the last decade. *Research in Veterinary Science* 93(1): 150-155.
33. 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: 248-254.
34. Brodschneider R, Crailsheim K 2010 Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* 41: 278-294.

35. 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, MartínHernández 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) Multicountry loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research* 57 (3) 452-457
36. Buha AA (2015) Toksični efekti produžene izloženosti kadmijumu i/ili polihlorovanim bifenilima u pacova (Doctoral dissertation, Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet).
37. Cantwell GE 1970 Standard methods for counting *Nosema* spores. *American Bee Journal* 110: 222-223.
38. Casteels-Josson K, Zhang W, Capaci T, Casteels P, Tempst P (1994) Acute transcriptional response of the honeybee peptideantibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry* 269(46): 28569-28575.
39. Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD, Pettis JS (2012) Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology* 58(8): 1090-1095.
40. Chaimanee V, Chantawannakul P, Chen Y, Evans JD, Pettis JS (2014) Effects of host age on susceptibility to infection and immune gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) inoculated with *Nosema ceranae*. *Apidologie* 45(4): 451-463.
41. Chan WQ, Howes CG, Foster LJ (2006) Quantitative comparison of caste differences in honeybee hemolymph. *Molecular and Cellular Proteomics* 5(12): 2252-62.
42. Charistos L, Parashos N, Hatjina F (2015) Long term effects of a food supplement HiveAlive™ on honey bee colony strength and *Nosema ceranae* spore counts. *Journal of Apicultural Research* 54(5) 420-426.

43. Charpentier G, Vidau C, Ferdy JB, Tabart J and Vetillard A (2014) Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared in vitro. *Pest Management Science* 70(1): 140-147.
44. Chauzat MP, Higes M, Martín-Hernández R, Meana A, Cougoule N, Faucon JP (2007) Presence of *Nosema ceranae* in French honeybee colonies. *Journal of Apicultural Research* 46(2): 127-128.
45. Chen Y, Evans JD, Smith IB, Pettis JS (2008) *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidean infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(2): 186-188.
46. Chen YP, Evans JD, Murphy C, Gutell R, Zuker M, Gundersen-Rindal D, Pettis JS 2009 Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56(2): 142-147.
47. Chiesa F, d'Agaro M (1991) Effective control of varroaosis using powdered thymol. *Apidologie* 22(1): 135-145.
48. Cirkovic D, Stevanovic J, Glavinic U, Aleksic N, Djuric S, Aleksic J, Stanimirovic Z (2018) Honey bee viruses in Serbian colonies of different strength. *Peer Journal* 6, p.e5887.
49. Corona M, Velarde RA, Remolina S, Moran-Lauter A, Wang Y, Hughes KA, Robinson GE (2007) Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104(17): 7128-7133.
50. Costa C, Lodesani M, Maistrello L (2010) Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of *Nosema ceranae* and on the longevity of honeybees (*Apis mellifera* L.) in laboratory conditions. *Apidologie* 41(2): 141-150.

51. Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, Palacios G, Evans JD, Moran NA, Quan PL, Briese T, Hornig M, Geiser DM, Martinson V, vanEngelsdorp D, Kalkstein AL, Drysdale A, Hui J, Zhai J, Cui L, Hutchison SK, Simons JF, Egholm M, Pettis JS, Lipkin WI (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* 318: 283–287.
52. Crailsheim K, Schneider LHW, Hrassnigg N, Bühlmann G, Brosch U, Gmeinbauer R, Schöffmann B (1992) Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology* 38: 409–419.
53. Cremer S, Armitage SA, Schmid-Hempel P (2007) Social immunity. *Current Biology* 17(16): R693–R702.
54. Czekonska K, Chuda-Mickiewicz B, Samborski J (2015) Quality of honeybee drones reared in colonies with limited and unlimited access to pollen. *Apidologie* 46: 1–9.
55. Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P (2012a) Predictive markers of honey bee colony collapse. *PLoS one* 7(2): p.e32151.
56. Dainat B, Evans JD, Chen YP, Gauthier L, Neumann P (2012b) Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* 78(4): 981–987.
57. Damiani N, Fernández N, Porrini MP, Gende LB, Álvarez E, Buffa F, Brasesco C, Maggi MD, Marcangeli JA, Eguaras MJ (2014) Laurel leaf extracts for honey bee pest and disease management: Antimicrobial, microsporidicidal, and acaricidal activity. *Parasitology Research* 113(2): 701–709.
58. 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 and Bee World* 47(4): 265–270.

59. DeGrandi-Hoffman G, Hagler J (2000) The flow of incoming nectar through a honey bee (*Apis mellifera* L.) colony as revealed by a protein marker. *Insectes Sociaux* 47(4): 302-306.
60. DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Huang E, Huang MH (2010) The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* 56(9): 1184-1191.
61. DeGrandi-Hoffman G, Chen Y (2015) Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science* 10: 170-176.
62. DeGrandi-Hoffman G, Chen Y, Rivera R, Carroll M, Chambers M, Hidalgo G, Watkins de Jong E (2016) Honey bee colonies provided with natural forage have lower pathogen loads and higher overwinter survival than those fed protein supplements. *Apidologie* 47(2): 186-196.
63. De Jong D, da Silva EJ, Kevan PG, Atkinson JL (2009) Pollen substitutes increase honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen. *Journal of Apicultural Research* 48: 34-37.
64. Del Aguila C, Izquierdo F, Granja AG, Hurtado C, Fenoy, S, Fresno M, and Revilla Y (2006) Encephalitozoon microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *International Journal for Parasitology* 36(8): 869-876.
65. Di Pasquale G, Salignon M, Le Conte Y, Belzunces LP, Decourtye A, Kretzschmar A, Suchail S, Brunet JL, Alaux C (2013) Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE* 8: e72016.
66. Doublet V, Labarussias M, de Miranda JR, Moritz RF, Paxton RJ (2015a). Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology* 17(4): 969-983.

67. Dubovskiy IM, Martemyanov VV, Vorontsova YL, Rantala MJ, Gryzanova EV, Glupov VV (2008) Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP* 148(1): 1-5.
68. Dussaubat C, Maisonnasse A, Alaux C, Tchamitchan S, Brunet JL, Plettner E, Belzunces LP, Le Conte Y (2010) *Nosema spp.* Infection Alters pheromone production in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* 36(5): 522-525.
69. Dussaubat C, Brunet JL, Higes M, Colbourne JK, Lopez J, Choi JH, Martín-Hernández R, Botías C, Cousin M, McDonnell C, Bonnet M, Belzunces LP, Moritz RF, Le Conte Y, Alaux C (2012) Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7(5): e37017.
70. Dustmann JH (1993) Natural defense mechanisms of a honey bee colony against diseases and parasites. *American Bee Journal* 133: 431-434.
71. Ebert TA, Kevan PG, Bishop BL, Kevan SD, Downer RA (2007) Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*) *Journal of Apicultural Research* 46(4): 220-224.
72. EC - Council Regulation No. 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No. 2092/91. *Official Journal of the European Union* L189, 20.07.2007: 1-23.
73. EFSA (European Food Safety Authority): Towards holistic approaches to the risk assessment of multiple stressors in bees. EFSA Scientific Colloquium Summary Report, 15-16 May 2013, Parma, Italy
74. Evans JD (2004) Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 85(2): 105-111.

75. Evans JD, Aronstein K, Chen YP, Hetru C, Imler JL, Jiang H, Kanost M, Thompson GJ, Zou Z, Hultmark D (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* 15: 645–656.
76. Evans JD, Spivak M (2010) Socialized medicine: Individual communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 103: S62–S72.
77. Feldhaar H, Gross R (2008) Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes Infection* 10(9) 1082–1088.
78. Fernandez JM, Puerta F, Cousinou M, Dios-Palomares R, Campano F, Redondo L (2012) Asymptomatic presence *Nosema* spp. in Spanish commercial apiaries. *Journal of invertebrate Pathology* 111(2): 106–110.
79. Floris I, Satta A, Cabras P, Garau VL, Angioni A (2004) Comparison between two thymol formulations in the control of *Varroa destructor*: effectiveness, persistence, and residues. *Journal of Economic Entomology* 97(2): 187–191.
80. Fries I 1988 Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. *Apidologie* 19(3): 319–328.
81. Fries I, Feng F, da Silva A, Slemenda SB, Pieniazek J (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: 356–365.
82. Fries I (2010) *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 103(Suppl 1): 73–79.
83. Fries I, Chauzat MP, Chen YP, Doublet V, Genersch E, Gisder S, Higes M, McMahon DP, Martín-Hernández R, Natsopoulou M, Paxton R, Tanner G, Webster TC, Williams GR (2013) Standard methods for *Nosema* research. In Dietemann V; Ellis JD, Neumann P (Eds.) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research* 52(1): 1–28.

84. Freitas DR, Rosa RM, Moraes J, Campos E, Logullo C, Da Silva Vaz I, Masuda A (2007) Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 146(4): 688-694.
85. Furgala, B.; Gochnauer, T. A. (1969) Chemotherapy of nosema disease. Effect of treatment method with Fumidil-B. *Am. Bee J.* 109, 380–381; 392.
86. Furgala B, Boch R (1970) The effect of Fumidil B, Nosemack and Humatin on *Nosema apis*. *Journal of Apicultural Research* 9 (2): 79–85.
87. Gajger IT, Kozaric Z, Berta D, Nejedli S, Petrinc Z (2011). Effect of the herbal preparation Nozevit on the mid-gut structure of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema* sp. spores. *Veterinární medicína* 56(7): 343–350.
88. Gajger IT, Petrinc Z, Pinter L, Kozaric Z (2009a) Experimental treatment of nosema disease with “Nozevit” phyto-pharmacological preparation. *American Bee Journal* 149(5): 485-490.
89. Gajger IT, Vugrek O, Pinter L, Petrinc Z (2009b) Nozevit patties™ treatment of honey bees (*Apis mellifera*) for the control of *Nosema ceranae* disease. *Apicultural Research* 149: 1053-1056.
90. Garcia-Palencia P, Martín-Hernández R, González-Porto AV, Marín P, Meana A, Higes, M (2010). Natural infection by *Nosema ceranae* causes similar lesions as in experimentally infected caged-worker honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* 49: 278-283.
91. Garrido PM, Porrini MP, Antúnez K, Branchiccela B, Martínez-Noël GM, Zunino P, Salerno G, Eguaras MJ, Ieno E (2016) Sublethal effects of acaricides and *Nosema ceranae* infection on immune related gene expression in honeybees. *Veterinary Research* 47(1): 51.

92. Gashout HA, Guzmán-Novoa E (2009) Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research and Bee World* 48(4): 263-269.
93. Gatschenberger H, Azzami K, Tautz J, Beier H (2013). Antibacterial immune competence of honey bees (*Apis mellifera*) is adapted to different life stages and environmental risks. *PloS one*, 8(6), e66415
94. 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.
95. Giacobino A, Rivero R, Molineri AI, Cagnolo NB, Merke J, Orellano E, Salto C, Signorini M (2016) Fumagillin control of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) infection in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies in Argentina. *Veterinaria italiana* 52(2): 145-151.
96. Giersch T, Berg T, Galea F, Hornitzky M (2009) *Nosema ceranae* infects honey bees (*Apis mellifera*) and contaminates honey in Australia. *Apidologie* 40(2): 117-123.
97. Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42: 611-643.
98. Gilliam M, Taber S III, Lorenz BJ, Prest DB (1988) Factors affecting development of chalkbrood disease in colonies of honey bees, *Apis mellifera*, fed pollen contaminated with *Ascosphaera apis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52(2): 314-325.
99. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA (1991) Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *Journal of Trauma, Injury, Infection and Critical Care* 31(1): 32-35.

100. Gisder S, Hedtke K, Möckel N, Frielitz MC, 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.
101. Glavinić U, Stanković A, Stevanović J, Simeunović P, Aleksić N, Stanimirović Z (2013) Comparison of methods for detection of microsporidia species of the genus *Nosema* in honey bees (*Apis mellifera*). *Arhiv veterinarske medicine* 6(1): 19-27.
102. Glavinic U, Stevanovic J, Gajic B, Simeunovic P, Đuric S, Vejnovic B, Stanimirovic Z (2014) *Nosema ceranae* DNA in honey bee haemolymph and honey bee mite *Varroa destructor*. *Acta Veterinaria-Beograd* 64: 349-357.
103. Glavinic U, Stankovic B, Draskovic V, Stevanovic J, Petrovic T, Lakic N, Stanimirovic Z (2017) Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 12(11): e0187726.
104. Glavinic U, Tesovnik T, Stevanovic J, Zorc M, Cizelj I, Stanimirovic Z, Narat M (2019) Response of adult honey bees treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae*. *Peer Journal* 7, p.e6325.
105. Glinski Z, Jarosz J (1995a) Cellular and humoral defences in honey bees. *Bee World* 76: 195-205.
106. Glinski Z, Jarosz J (1995b) Mechanical and biochemical defences of honey bees. *Bee World* 76: 110-118.
107. Goblirsch, M., Huang, Z.Y., and Spivak, M. (2013) Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. *PLoS One* 8: e58165.
108. 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.

109. Granato A, Caldon M, Falcaro C, Mutinelli F, (2009) Presence of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in Italian apiaries. In Proc. Workshop “*Nosema* disease: lack of knowledge and work standardization” (COST Action FA0803) Guadalajara, <http://www.coloss.org/news/nosema-workshop-proceedings-online> (accessed on 20 Nov. 2009).
110. Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB (1974) Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249(22): 7130-7139.
111. Hanson FR, Eble TE (1949) An antiphage agent isolated from *Aspergillus* sp. *Journal of Bacteriology* 58(4): 527-529.
112. Hedtke K, Jensen PM, Jensen AB, Genersch E (2011) Evidence for emerging parasites and pathogens influencing outbreaks of stress-related diseases like chalkbrood. *Journal of Invertebrate Pathology* 108 (3): 167-173.
113. Higes M, Martín R, Meana A (2006) *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *Journal of Invertebrate Pathology* 92(2): 93-95.
114. Higes M, Garcia-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.
115. Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, García-Palencia P, Meana A (2008a) Detection of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(1): 76-78.
116. Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, Botias C, García-Palencia P, Meana A (2008b) Regurgitated pellets of *Merops apiaster* as fomites of infective *Nosema ceranae* (Microsporidia) spores. *Environmental Microbiology* 10(5): 1374-1379.

117. Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Barrios L, Del Nozal MJ, Bernal JL, Jiménez JJ, García-Palencia P, Meana A (2008c) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* 10(10): 2659–2669.
118. Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, Botías C, Meana A (2009a) First detection of *Nosema ceranae* (Microsporidia) in African Honey bees (*Apis mellifera intermissa*). *Journal of Apicultural Research* 48: 217–219.
119. Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, Del Nozal MJ, Mayo R, Bernal JL (2009b) Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports* 1: 110–113.
120. Higes M, Martín-Hernández R, Meana A (2010a) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosemosis. *Apidologie* 41: 375–392.
121. Higes M, Martín-Hernández R, Martínez-Salvador A, Garrido-Bailón E, González-Porto AV, Meana A, Bernal JL, Del Nozal MJ, Bernal J (2010b) A preliminary study of the epidemiological factors related to honey bee colony loss in Spain. *Environmental Microbiology Reports* 2(2): 243–250.
122. Higes M, Nozal MJ, Alvaro A, Barrios L, Meana A, Martín-Hernández R, Bernal JL (2011) The stability and effectiveness of fumagillin in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infection in honey bees (*Apis mellifera*) under laboratory and field conditions. *Apidologie* 42 (3): 364–377.
123. 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.
124. Huang Q, Kryger P, Le Conte Y, Moritz RF (2012) Survival and immune response of drones of a Nosemosis tolerant honey bee strain towards *N. ceranae* infections. *Journal of Invertebrate Pathology* 109(3): 297–302.

125. Huang Q, Chen YP, Wang RW, Cheng S, Evans JD (2016) Host-Parasite Interactions and Purifying Selection in a Microsporidian Parasite of Honey Bees. *PLoS One* 11(2): e0147549.
126. Huang WF, Jiang JH, Chen YW, Wang CH (2007) A *Nosema ceranae* isolate from the honeybee *Apis mellifera*. *Apidologie* 38(1): 30–37.
127. Huang WF, Solter LF, Yau PM, Imai BS (2013a) *Nosema ceranae* escapes fumagillin control in honey bees. *PLoS pathogens* 9(3): p.e1003185.
128. Huang WF, Solter LF (2013b) Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 113(1): 35–41.
129. Huang WF, Solter L, Aronstein K, Huang Z (2015) Infectivity and virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in commercially available North American honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* 124: 107–113.
130. Imdorf A, Kilchenmann V, Bogdanov S, Bachofen B, Beretta C (1995). Toxic effects of thymol, camphor, menthol and eucalyptol on *Varroa jacobsoni* Oud and *Apis mellifera* L in a laboratory test. *Apidologie* 26(1): 27–31.
131. Imdorf A, Bogdanov S, Ochoa RI, Calderone NW (1999) Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie* 30(2-3): 209–228.
132. Kanda M, Sasamoto T, Takeba K, Hayashi H, Kusano T, Matsushima Y, Nakajima T, Kanai S, Takano I (2011) Rapid determination of fumagillin residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using the QuEChERS method. *Journal of AOAC International* 94(3): 878–885.
133. Katznelson H, Jamieson CA (1952) Control of *Nosema* disease of honeybees with fumagillin. *Science* 115: 70–71.

134. Kim JH, Park JK, Lee JK (2016) Evaluation of antimicrosporidian activity of plant extracts on *Nosema ceranae*. *Journal of Apicultural Science* 60: 167–178.
135. Klee J, Besana AM, Genersch E, Gisder S, Nanetti A, Tam DQ, Chinh TX, Puerta F, Ruz JM, Kryger P, Message D, Hatjina F, Korpela S, Fries I, Paxton RJ (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.
136. Klowden, M.J. (2002) *Physiological Systems in Insects*. Academic Press (eds). San Diego, California, 696 pp.
137. Kunieda T, Fujiyuki T, Kucharski R, Foret S, Ament SA, Toth AL, Ohashi K, Takeuchi H, Kamikouchi A, Kage E, Morioka M, Beye M, Kubo T, Robinson GE, Maleszka R (2006) Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. *Insect Molecular Biology* 15(5): 563–576.
138. Kurze C, Le Conte Y, Dussaubat C, Erler S, Kryger P, Lewkowski O, Müller T, Widder M, Moritz RFA (2015) *Nosema* Tolerant Honeybees (*Apis mellifera*) Escape Parasitic Manipulation of Apoptosis. *PLoS One* 10: e0140174.
139. Lavine MD, Strand MR (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32(10): 1295–1309.
140. Larsson R 1986 Ultrastructure, function, and classification of Microsporidia. *Progr. Protistol.* 1: 325–390.
141. Lee JK, Kim JH, Jo M, Rangachari B, Park JK (2018) Anti-Nosemosis Activity of *Aster scaber* and *Artemisia dubia* Aqueous Extracts. *Journal of Apicultural Science* 62(1): 27-38.
142. Lenga RE (1988) *The Sigma-Aldrich library of chemical safety data*, Sigma-Aldrich Corporation 35.

143. Leoncini I, Crauser D, Robinson GE, Le Conte Y (2004) Worker-worker inhibition of honey bee behavioural development independent of queen and brood. *Insectes Sociaux* 51(4): 392–394.
144. Li J, Heerman MC, Evans JD, Rose R, Li W, Rodríguez-García C, DeGrandi-Hoffman G, Zhao Y, Huang S, Li Z, Hamilton M, Chen Y (2019) Pollen reverses decreased lifespan, altered nutritional metabolism, and suppressed immunity in honey bees (*Apis mellifera*) treated with antibiotics. *Journal of Experimental Biology* 222(Pt 7): pii:jeb-202077.
145. Li W, Chen Y, Cook SC (2018) Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. *International Journal for Parasitology* 48(6): 433–444.
146. Lipinski Z (2018) Honey bee nutrition and feeding, in the temperate/continental climate of the northern hemisphere, OZGraf S.A., Olsztyn - A.D., 1-430.
147. Liu TP (1990) Ultrastructural changes in the secretion granules of the hypopharyngeal glands of the honeybee infected by *Nosema apis* and after treatment with fumagillin. *Tissue and Cell* 22(4): 523–531.
148. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402–408.
149. Lopez MI, Pettis JS, Smith IB, Chu PS (2008) Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(5): 1553–1559.
150. Maistrello L, Lodesani M, Costa C, Leonardi F, Marani G, Caldon M, Mutinelli F, Granato A (2008) Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 39(4): 436–444.
151. Malone LA, Gatehouse HS (1998) Effects of *Nosema apis* infection on honey bee (*Apis mellifera*) digestive proteolytic enzyme activity. *Journal of Invertebrate Pathology* 71(2): 169–174.

152. Martín-Hernandez 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.
153. Martín-Hernandez R, Meana A, García-Palencia P, Marín P, Botías C, Garrido-Bailón E, Barrios L, Higes M (2009) Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. *Applied and Environmental Microbiology* 75(8): 2554-2557.
154. Martín-Hernandez 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.
155. Martín-Hernandez R, Higes M, Sagastume S, Juarranz A, Dias-Almeida J, Budge GE, Meana A, Boonham N (2017) Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis. *PLoS One* 12: 1-17.
156. Martín-Hernandez R, Bartolomé C, Chejanovsky N, Le Conte Y, Dalmon A, Dussaubat C, García-Palencia P, Meana A, Pinto MA, Soroker V, Higes M (2018) *Nosema ceranae* in *Apis mellifera*: a 12 years postdetection perspective. *Environmental microbiology* 20(4): 1302-1329.
157. Martinez J, Leal G, Conget P (2012). *Nosema ceranae* an emergent pathogen of *Apis mellifera* in Chile. *Parasitology Research* 111(2): 601-607.
158. Mattila HR, Otis G, Daley J, Schulz T (2000) Trials of apiguard, a thymol-based miticide part 2. Non-target effects on honey bees. *American Bee Journal* 140(1): 68-70.
159. Mattila HR, Otis GW (2006) Influence of pollen diet in spring on development of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology* 99(3): 604-613.
160. Mayack C, Naug D (2009) Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 100(3): 185-188.

161. Mayack C, Naug D (2010) Parasitic infection leads to decline in hemolymph sugar levels in honeybee foragers. *Journal of Insect Physiology* 56(11): 1572–1575.
162. Mayack C, Naug D (2013) Individual energetic state can prevail over social regulation of foraging in honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67(6): 929–936.
163. Mayack C, Natsopoulou ME, McMahon DP (2015) *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. *Insect Molecular Biology* 24(6): 662–70.
164. McDonnell CM, Alaux C, Parrinello H, Desvignes JP, Crauser D, Durbesson E, Beslay D, Le Conte Y (2013) Ecto- and endoparasite induce similar chemical and brain neurogenomic responses in the honey bee (*Apis mellifera*). *BMC Ecology* 13: 25.
165. Mehlhorn H, 2008, *Encyclopedia of Parasitology: AM (Ed.) (Vol. 1)*. Springer
166. Milbrath MO, Xie X, Huang ZY (2013) *Nosema ceranae* induced mortality in honey bees (*Apis mellifera*) depends on infection methods. *Journal of Invertebrate Pathology* 114(1): 42–44.
167. Milbrath MO, van Tran T, Huang WF, Solter LF, Tarpy DR, Lawrence F, Huang ZY (2015) Comparative virulence and competition between *Nosema apis* and *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* 125: 9–15.
168. 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 (Beograd)* 66(1): 115–124.
169. 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.

170. Mladjan V, Todorovic D, Lolin M (2000) Preventive action of fumagillin on the degree of infection with *Nosema apis* in the digestive tract of bees. *Acta Veterinaria (Beograd)* 50(4): 241-252.
171. Mondet F, Goodwin M, Mercer A (2011) Age-related changes in the behavioural response of honeybees to Apiguard®, a thymol-based treatment used to control the mite *Varroa destructor*. *Journal of Comparative Physiology* 197(11): 1055-1062.
172. Morais MM, Turcatto AP, Francoy TM, Gonçalves LS, Cappelari FA, Jong DD (2013) Evaluation of inexpensive pollen substitute diets through quantification of haemolymph proteins. *Journal of Apicultural Research* 52(3): 119-121.
173. Mutinelli F, Baggio A (2004) Use of medical drugs against varroosis. *Apiacta* 39: 53-62.
174. Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page JE Jr, Amdam GV (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology* 5(3): e62.
175. Nikolic T, Purac J, Orcic S, Kojic D, Vujanovic D, Stanimirovic Z, Grzetic I, Ilijevic K, Sikoparija B, Blagojević PD (2015) Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 90(4), 181-194.
176. Nikolic, T (2017). Molekularne osnove odgovora medonosne pčele (*Apis mellifera*, L.) na stres izazvan jonima teških metala (Doctoral dissertation, Univerzitet u Novom Sadu).
177. Nozal MJ, Bernal JL, Martin MT, Bernal J, Alvaro A, Martín R, Higes M (2008) Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography-diode array-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1190(1-2): 224-231.
178. OIE-Office International Des Epizooties. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.2.4. Nosemosis of honey bees. 2013;

179. Orcic S, Nikolic T, Purac J, Sikoparija B, Blagojević DP, Vukasinovic E, Plavska N, Stevanovic J, Kojic D (2017) Seasonal variations in the activity of selected antioxidant enzymes and malondialdehyde level in worker honey bees. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 165 (2-3): 120–128.
180. Pajuelo AG, Torres C, Bermejo FJO (2008) Colony losses: a double blind trial on the influence of supplementary protein nutrition and preventative treatment with fumagillin against *Nosema ceranae*. *Journal of Apicultural Research*, 47(1): 84-86.
181. Pavela R, Vrchotová N, Tríska, J (2009) Mosquitocidal activities of thyme oils (*Thymus vulgaris* L.) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 105(5): 1365-1370.
182. 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.
183. Pejovic D, Vucicevic M, Stanimirovic Z (2002) Grooming behaviour in varoosis resistance in two honeybee ecogeographic varieties (*Apis mellifera carnica*) from Serbia. *Apiacta* 37(1) 65-70.
184. Phillips AK, Appel AG, Sims SR (2010) Topical toxicity of essential oils to the German cockroach (Diptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* 103(2): 448-459.
185. Pohorecka K (2004) Laboratory studies on the effect of standardized *Artemisia absinthium* L. extract on *Nosema apis* infection in the worker *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Science* 48(2): 131-136.
186. Porrini MP, Audisio MC, Sabaté DC, Ibarguren C, Medici SK, Sarlo EG, Garrido PM, Eguaras MJ (2010) Effect of bacterial metabolites on microsporidian *Nosema ceranae* and on its host *Apis mellifera*. *Parasitology Research* 107(2): 381–388.
187. Porrini MP, Fernández NJ, Garrido PM, Gende LB, Medici SK, Eguaras MJ (2011) In vivo evaluation of antiparasitic activity of plant extracts on *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Apidologie* 42(6): 700–707.

188. Porrini MP, Garrido PM, Gende LB, Rossini C, Hermidac L, Marcangeli J, Eguaras M.J. (2017). Oral administration of essential oils and main components: Study on honey bee survival and *Nosema ceranae* development. *Journal of Apicultural Research*, 56(5): 616–624.
189. Ptasińska AA, Borsuk G, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M, Małek W (2016) Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee noseosis C? *Parasitology Research* 115: 397-406.
190. Rada V, Machova M, Huk J, Marounek M, Dušková D (1997) Microflora in the honeybee digestive tract: counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. *Apidologie* 28(6): 357-365.
191. Retschnig G, Neumann P, Williams GR (2014) Thioclopid-*Nosema ceranae* interactions in honey bees: host survivorship but not parasite reproduction is dependent on pesticide dose. *Journal of Invertebrate Pathology* 118: 18–19.
192. Rice RN (2001) *Nosema* disease in honeybees. Genetic variation and control. Report n. 01/46, Australian Government, Rural Industries Research and Development Corporation.
193. Richard F-J, Aubert A, Grozinger CM (2008) Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology* 6: 50.
194. Richard FJ, Holt HL, Grozinger CM (2012) Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* 13: 558.
195. Roberts KE, Hughes WO (2014a) Immunosenescence and resistance to parasite infection in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology* 121: 1–6.
196. Roberts KE, Hughes WO (2014b) Horizontal transmission of a parasite is influenced by infected host phenotype and density. *Parasitology* 142(2): 395–405.

197. Robinson GE, Vargo EL (1997) Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 35(4): 559–583.
198. Roussel M, Villay A, Delbac F, Michaud P, Laroche C, Roriz D, El Alaoui H, Diogon M (2015) Antimicrosporidian activity of sulphated polysaccharides from algae and their potential to control honeybee nose-mosis. *Carbohydrate polymers* 133: 213–220.
199. Rummyantsev SN (1998) Constitutional and non-specific immunity to infection. *Revue scientifique et technique / Office international des épizooties* 17(1): 26–42.
200. Saffari A, Keva PG, Atkinson JL (2010) Palatability and consumption of patty-formulated pollen and pollen substitutes and their effects on honeybee colony performance. *Journal of Apicultural Science* 54: 63–71.
201. Schmid MR, Brockmann A, Pirk CW, Stanley DW, Tautz J (2008) Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology* 54(2): 439–444.
202. Schmid-Hempel P (1998) *Parasites in Social Insects*. Princeton, NJ: Princeton Univ. Press. insect systems. 409 pp.
203. Schmid-Hempel P (2005) Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annual Review of Entomology* 50: 529–551.
204. Schulz DJ, Huang Z, Robinson GE (1998) Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 42(5): 295–303.
205. Schwarz RS, Evans JD (2013) Single and mixed-species trypanosome and microsporidia infections elicit distinct, ephemeral cellular and humoral immune responses in honey bees. *Developmental and Comparative Immunology* 40(3–4): 300–310.

206. Seehuus SC, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(4): 962-967.
207. 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 Apiculture Research* 53(5): 545-554.
208. Sokolov VP, Grobov OF (1963) *Nosema* spores in the hemolymph of the bee. *Pchelovodstvo* 7: 39.
209. Soroker V, Hetzroni A, Yakobson B, David D, David A, Voet H, Slabezki Y, Efrat H, Levski S, Kamer Y, Klinberg E (2010) Evaluation of colony losses in Israel in relation to the incidence of pathogens and pests. *Apidologie* 42: 192-199.
210. Spivak M, Gilliam M (1993) Facultative expression of hygienic behaviour of honey bees in relation to disease resistance. *Journal of Apicultural Research* 32(3-4): 147-157.
211. Stanimirović Z, Soldatović B, Vučinić M (2000) *Biologija pčela. Medonosna pčela*. Fakultet veterinarske medicine, Medicinska knjiga-Medicinske komunikacije, Beograd. s. 375.
212. Stanimirović Z, Pejović D, Stevanović J, Vučinić M, Mirilović M (2002) Investigations of hygienic behaviour and disease resistance in organic beekeeping of two honeybee ecogeographic varieties from Serbia. *Acta Vet* 52 (2-3): 169-180.
213. Stanimirović Z, Stevanović J, Ćirković D (2003) Investigations of reproductive, productive, hygienic and grooming features of Syenichko-Peshterski honey bee ecotype. *Apidologie* 34 (5): 487-488.
214. Stanimirović Z, Stevanovic J, Ćirković D (2005) Behavioural defenses of the honey bee ecotype from Sjenica - Pester against *Varroa destructor*. *Acta Veterinaria* 55(1): 69-82.

215. Stanimirovic Z, Stevanovic J, Bajic V, Radovic I (2007a) Evaluation of genotoxic effects of fumagillin (dicyclohexylamine) by citogenetic tests in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 628: 1-10.
216. Stanimirovic Z, Pejin II, Kulisic Z, Djiporovic M (2007b) Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by sister chromatide exchange and chromosomal aberration tests in human cell cultures. *Acta Veterinaria* 57(2-3): 257-273.
217. Stanimirovic Z, Glavinic U, Djelic N, Stevanovic J (2015) *Praktikum iz Zoologije*. Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, Beograd, s. 184.
218. Stanimirovic Z, Glavinic U, Ristanic M, Aleksic N, Jovanovic N, Vejnovic B, Stevanovic J (2019) Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses. *Acta veterinaria-beograd* 69(1): 1-31.
219. Steche W (1960) A etiologie und therapie der nosematose der honigbiene. *Zeitung Bienenfarsche* 5: 49-52.
220. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Radakovic M, Stojic V (2008) In vitro evaluation of the clastogenicity of fumagillin. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49(8): 594-601.
221. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic RS, 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: 49-58.
222. 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.

223. 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.
224. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Simeunovic P, Lakic N, Radovic I, Sokovic M, Van Griensven JLD (2018) The effect of *Agaricus brasiliensis* extract supplementation on honey bee colonies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 90 (1): 219-229.
225. Strachecka A, Krauze M, Olszewski K, Borsuk G, Paleolog J, Merska M, Chobotow J, Bajda M, Grzywnowicz K (2014) Unexpectedly strong effect of caffeine on the vitality of western honeybees (*Apis mellifera*). *Biochemistry (Mosc)* 79(11): 1192-1201.
226. Suwannapong G, Maksong S, Benbow ME (2011) Stingless bee propolis effects on experimental infection of *Apis florea* with *Nosema ceranae*. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 1: 818-825.
227. Szabo TI, Heikel DT (1987) Effect of fumagillin treatment on *Nosema* infection, survival and populations of overwintering honeybee colonies. *Journal of Apicultural Research* 26(3): 186-190.
228. Szumowski SC, Troemel ER (2015) Microsporidia-host interactions. *Current Opinion in Microbiology* 26: 10-16.
229. Tabanca N, Bernier UR, Tsilokia M, Becnel JJ, Sampson B, Werle C, Demirci B, Baser KHC, Blythe E.K, Pounders C, Wedge DE (2010) *Eupatorium capillifolium* essential oil: chemical composition, antifungal activity, and insecticidal activity. *Natural Products Communications* 5(9).
230. Tapaszti Z, Forgách P, Kovágó C, Békési L, Bakonyi T, Rusvai M (2009) First detection and dominance of *Nosema ceranae* in Hungarian honeybee colonies. *Acta Veterinaria Hungarica* 57: 383-388.

231. Taric E, Glavinic U, Stevanovic J, Vejnovic B, Aleksic N, Dimitrijevic V, Stanimirovic Z (2019) Occurrence of honey bee (*Apis mellifera* L.) pathogens in commercial and traditional hives. *Journal of Apicultural Research* 58:(3) 433-443.
232. Tay WT, O'Mahony EM, Paxton RJ (2005) Complete rRNA gene sequences reveal that the microsporidium *Nosema bombi* infects diverse bumblebee (*Bombus* spp.) hosts and contains multiple polymorphic sites. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52(6): 505-513.
233. Toomemaa K (2019) The synergistic effect of weak oxalic acid and thymol aqueous solutions on *Varroa mites* and honey bees. *Journal of Apicultural Research* 58(1): 37-52.
234. Toth AL, Kantarovich S, Meisel AF, Robinson GE (2005) Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *Journal of Experimental Biology* 208(Pt 24): 4641-4649.
235. Vanbergen AJ, the Insect Pollinators (2013) Initiative Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment* 11(5): 251-259.
236. Van der Zee R (2010) Colony losses in the Netherlands. *Journal of Apicultural Research* 49(1): 121-123.
237. Van den Heever JP, Thompson TS, Curtis JM, Ibrahim A, Pernal SF (2014) Fumagillin: an overview of recent scientific advances and their significance for apiculture. *Journal of agricultural and food chemistry* 62(13): 2728-2737.
238. Van den Heever JP, Thompson TS, Curtis JM, Pernal SF (2015) Determination of dicyclohexylamine and fumagillin in honey by LC-MS/MS. *Food and Analytical Methods* 8(3): 767-777.
239. Van den Heever JP, Thompson TS, Otto SJG, Curtis JM, Ibrahim AA, Pernal SF (2016a) Evaluation of Fumagilin-B® and other potential alternative chemotherapies against *Nosema ceranae*-infected honeybees (*Apis mellifera*) in cage trial assays. *Apidologie* 47(5): 617-630.

240. Van den Heever JP, Thompson TS, Otto SJ, Curtis JM, Ibrahim A, Pernal SF (2016b) The effect of dicyclohexylamine and fumagillin on *Nosema ceranae*-infected honey bee (*Apis mellifera*) mortality in cage trial assays. *Apidologie* 47(5): 663-670.
241. VanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, Mullin C, Haubruge E, Nguyen BK, Frazier M, Cox-Foster D, Chen Y, Underwood R, Tarpay DR, Pettis JS (2009) Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE* 4: e6481.
242. Vejnovic BS (2018) Molekularno-genetička identifikacija tripanozome *Lotmaria passim Schwarz, 2014* i analiza njenih efekata na zdravlje pčelinjih zajednica i ekonomske efekte u pčelarstvu (Doctoral dissertation, Univerzitet u Beogradu-Fakultet veterinarske medicine).
243. Vidau C, Diogon M, Aufauvre J, Fontbonne R, Viguès B, Brunet JL, Texier C, Biron DG, Blot N, Alaoui HE, Belzunces LP, Delbac F (2011) Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiadiazid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 6: e21550.
244. Vidau C, Panek J, Texier C, Biron DG, Belzunces LP, Le Gall M, Broussard C, Delbac F, El Alaoui H (2014) Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. *Journal of Invertebrate Pathology* 121: 89-96.
245. Wei S, Van Griensven L (2008) Pro- and antioxidative properties of medicinal mushroom extracts. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10: 315-324.
246. Wang H, Zhang SW, Zeng ZJ, Yan WY (2014) Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie* 45(5): 618-625.
247. Webster TC (1994) Fumagillin affects *Nosema apis* and honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* 87: 601-604.

248. Wheeler MM, Robinson GE (2014) Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Scientific Reports* 4.
249. Williams GR, Shafer AB, Rogers RE, Shutler D, Stewart DT (2008a) First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 189–192.
250. Williams GR, Sampson MA, Shutler D, Rogers RE (2008b) Does fumagillin control the recently detected invasive parasite *Nosema ceranae* in Western honey bees (*Apis mellifera*)? *Journal of Invertebrate Pathology* 99(3): 342–344.
251. Williams GR, Shutler D, Little C, Burgher-MacLellan K, Rogers R (2011) The microsporidian *Nosema ceranae*, the antibiotic Fumagilin-B®, and Western honey bee (*Apis mellifera*) colony strength. *Apidologie* 42(1): 15–22.
252. Williams GR, Alaux C, Costa C, Csaki T, Doublet V, Eisenhardt D, Fries I, Kuhn R, McMahon DP, Medrzycki P, Murray TE (2013) Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. In V Dietemann; J D Ellis, P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK: Volume II: Standard methods for Apis mellifera pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research* 52(1): 1-28.
253. Williams GR, Shutler D, Burgher-MacLellan KL, Rogers REL (2014) Infrapopulation and -community dynamics of the parasites *Nosema apis* and *Nosema ceranae*, and consequences for honey bee (*Apis mellifera*) hosts. *PLoS One* 9: 5–10.

254. Wilson-Rich N, Spivak M, Fefferman NH, Starks PT (2009) Genetic, individual, group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual Review of Entomology* 54: 405–423.
255. Woyke J (1984) Increase in life-span, unit honey productivity and honey surplus with fumagillin treatment of honeybees. *Journal of Apicultural Research* 23(4): 209–212.
256. Yücel B, Doğaroğlu M (2005) The impact of *Nosema apis* Z. infestation of honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies after using different treatment methods and their effects on the population levels of workers and honey production on consecutive years. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8: 1142–1145.
257. Zander E (1909) Tierische Parasiten als Krankheitserreger bei der Biene, *Münchener Bienenzeitung* 31: 196–204.

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Уриш Главинић је рођен 7. јула 1988. године. Одрастао је и основну школу и гимназију завршио у Ивањици. Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду (ФВМ УБ) је уписао 2007. године, а дипломирао 2013. године. Исте године уписао је докторске академске студије на ФВМ УБ. Положио је све испите предвиене планом и програмом последипломских студија са просечном оценом 9,56. За време основних студија био је стипендиста Министарства просвете Републике Србије и Општине Ивањица и активиста у студентском организовању. Био је у четири мандата студент продекан и оснивач Центра за научно истраживачки рад студената ФВМ УБ.

У септембру 2013. године ангажован је као истраживач сарадник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије под називом „Молекуларно-генетичка и еколошка истраживања у заштити аутохтоних анималних генетичких ресурса, очувања добробити, здравља и репродукције гајених животиња и производње безбедне хране“ (ев. бр. ИИИ 46002) којим руководи проф. др Зоран Станимировић. У септембру 2014. године изабран је, а у септембру 2017. реизабран у звање асистента на Катедри за биологију Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду.

У оквиру TEMPUS програма 2016. године боравио је на стручном усавршавању на Универзитету у Болоњи (Италија), а у оквиру HORIZON 2020 и ИАЕА пројеката током 2017. и 2019. године на Универзитету у Цириху (Швајцарска).

Учествовао је на 8 међународних и домаћих научних и 8 иновационих пројеката. Као аутор или коаутор објавио је преко 60 научних и стручних радова, од којих је 20 у међународним часописима на SCI листи са укупним IF 30,52, има преко 90 цитата и h index 7. депоновано је 35 секвенци у генској банци и објавио је универзитетски практикум за предмет Зоологија на ФВМ УБ.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: _____ Урош Главинић _____

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај различитих антимикуробних препарата и адитива на експресију гена значајних за имунитет, оксидативни стрес и преживљавање пчела

Apis mellifera инфицираних микроспоридијом *Nosema ceranae*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Урош Главинић

Број уписа _____

Студијски програм: Докторске академске студије Факултета ветеринарске
медицине Универзитета у
Београду _____

Наслов рада: Утицај различитих антимикробних препарата и адитива на
експресију гена значајних за имунитет, оксидативни стрес и преживљавање
пчела *Apis mellifera* инфицираних микроспоридијом *Nosema
ceranae*

Ментор 1: Др Зоран Станимировић, редовни професор

Ментор 2: Др Тамаш Петровић, научни саветник

Потписани Урош Главинић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај различитих антимикуробних препарата и адитива на експресију гена значајних за имунитет, оксидативни стрес и преживљавање пчела *Apis mellifera* инфицираних _____ микроспоридијом _____ *Nosema ceranae*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____
