

Redovisning av resultat från medel sökta hos jordbruksverket från det nationella programmet 2011 för att förbättra villkoren för produktion och saluföring av honung

Statens Jordbruksverk har i beslut 2010-11-11 (Dnr 36-706/10) beviljat Sveriges lantbruksuniversitet 472 500:- till tre olika delprojekt (1. Varroa – orsaker till överlevnad, 2. Fältnässig provtagning för virusanalyser, 3. *Nosema ceranae*), med möjlighet att beviljade medel fördelas inom delprojekten. Projekten har drivits helt i linje med intentionerna i ansökan.

1. Varroa - fältförsök

Mekanismer för kvalstertolerans

Arbetet med projektet har följt planen i ansökan. I korthet har vi kunnat dokumentera och beskriva två faktorer som sannolikt har stor betydelse för den relativt långsammare kvalstertillväxt vi tidigare kunnat belägga i gotländska samhällen där varroalvalster inte bekämpats på 10 år. Binas populationsdynamik är annorlunda med mindre samhällen än i jämförbara kontrollsamhällen. Dessutom är kvalstrens reproduktion inte lika effektiv med ett tydligt lägre antal cellangrepp som leder till nya fertila honkvalster. Resultaten har nyligen publicerats vetenskapligt (Bilaga 1- av copywright-skäl ej publicerad på Jordbruksverkets webb) och resultaten kommer att sammanfattas populärt i bipressen.

I enlighet med ansökan har det odlats drottningar som fått para sig med drönare från de samhällen där ingen varroabekämpning skett sedan 1999. Dessa drottningar har satts i avläggare för att säkerställa vidare tillgång på materialet. Totalt har vi vintrat in 18 samhällen på den isolerade uppställningsplatsen längst ute på Näsudden. Dessutom har vi vintrat in 5?? samhällen i Uppsala med motsvarande genetiska bakgrund.

Vidare har vi genom insemination (med hjälp av Bert Thrybom) gjort olika kombinationer av Bondbin och Kontrollbin (inklusive reciproka korsningar mellan desamma), för att testa samtliga kombinationer för den egenskap som verkar mest särskiljande mellan bin som utsatts för, resp. inte utsatts för det selektionstryck avsaknad av varroabekämpning innebär, nämligen reproduktionen hos varroakvalster i enskilda celler. Genom ett sådant upplägg ska vi kunna särskilja genetisk och maternellt inflytande på egenskapen och få en bild av hur egenskapen nedärvs. Av Tabell 1 framgår vilka kombinationer som gjorts som sedan installerats i bisamhällen och där vi senare kunnat undersöka kvalstrens reproduktion. Vi har haft betydande svårigheter med drottningar som inte blivit äggläggande, inte blivit antagna vid tillsättning, eller som av andra skäl inte kunnat undersökas. I de flesta fall har reproduktionen i 30 celler med ett moderkvalster undersökts per samhälle.

Av Tabell 1 framgår den genomsnittliga reproduktionsframgången hos varroakvalster i de olika kombinationerna. Tabellen är en preliminär sammanställning som bygger på olika antal observationer i de olika kombinationerna. Materialet är inte färdiganalyserat och har inte bearbetats statistiskt. För metodbeskrivning för registreringarna, se bilaga 1 (ej publicerad på www.jordbruksverket.se).

Tabell 1. Antal undersökta samhällen och moderkvalstrens reproduktionsframgång i celler med ett moderdjur. Siffrorna anger andel moderkvalster med fullgod avkomma (medelvärde)

	N	<i>Bond drönare</i>	N	<i>Kontroll drönare</i>
<i>Bond drottning</i>	4	0,58	1	0,33
<i>Kontroll drottning</i>	3	0,50	2	0,87

Av Tabell 2 framgår att egenskapen att reducera kvalstrens reproduktionsframgång är en ärftlig egenskap. I det hittills analyserade materialet är kvalstrens reproduktion avgjort bäst i Kontrollgruppen, där reproduktionen stämmer väl med vad som är normalt och som vi registrerat i andra sammanhang. Det ser dessutom ut som om reducerad reproduktion hos kvalstren finns kvar också hos de reciproka korsningarna. I det material som så långt analyserats finns ingen tendens till könsbunden nedärvning men observationerna är ännu för få för att dra definitiva slutsatser.

2. Varroa och virus

Fältnässig provtagning för virusanalyser

I takt med att analysmetoderna utvecklats är det nu relativt enkelt att kvantitativt bestämma virusmängder med kvantitativ PCR. Tidigare kvalitativa PCR-metoder har kunnat fastställa om ett virus förekommer eller ej, men inte varit lämpade för kvantitativa analyser. Eftersom förekomst – icke förekomst av ett bivirus säger väldigt lite om deras betydelse har de kvantitativa metoderna öppnat helt nya möjligheter att förstå när och om specifika virusinfektioner är skadliga. För ett korrekt resultat kräver kvantitativa metoder emellertid att materialet inte degraderas före analys. Utan kunskap om hur virusmaterial behandlat på olika vis påverkas kvantitativt blir det av begränsat värde att jämföra kvantiteten virus i olika prover. För att kunna utnyttja biodlare och bitillsynsmän för att skicka in prover till SLU även för kvantitativa virusanalyser, har vi därför undersökt hur olika bivirus påverkas av olika sorts provtagning. Nedan finns listat vilka behandlingar vi utsatt prover av levande bin för, och vilka virustyper vi undersökt för, efter att proverna utsatts för dessa behandlingar.

Resultaten från försöken har sammanställts i bilaga 2.

3. *Nosema ceranae*

Förändring av parasitsammansättning över tid

I enlighet med ansökan har vi fortsatt monitorera för förändringar i parasitsammansättning i en del av de bigårdar vi redan har data från sedan 2007 och 2009. Vi har åter kontaktat biodlare som var positiva för *Nosema ceranae* 2007 och åter fått in prover från en del av dessa. Proverna har undersökts för parasitsammansättning på samma sätt som redovisats i Bitidningen efter undersökningen 2007 och som genomfördes på motsvarande material insamlat 2009. Proverna i Tabell 2 kommer i vissa fall från olika biodlare mellan åren, men i samtliga fall från samma område mellan åren. Inte i något fall har rena infektioner av *N. ceranae* påträffats i det insamlade materialet

Tabell 2. Antal provtagna biodlare (Biodlare), antal prover (N) antal prover positiva för *Nosema* spp. Infektion i ljusmikroskopi (+), andel prover med blandinfektion med *N. apis* och *N. ceranae* (Mix) och andel *N. ceranae* DNA i blandinfektioner (Prop) for tre år (2007, 2009 and 2011) i samtliga analyserade prover.

	2007	2009	2011
Biodlare	29	18	41
N	39	110	81
+	30	29	18
Mix	0,77	0,63	0,56
Prop	0,29	0,12	0,14

Som framgår av Tabell 2 finns ingen tendens till att andelen blandinfektioner ökar, eller att andelen *N. ceranae* DNA ökar i blandinfektioner.

I Tabell 3 är listat motsvarande data som i Tabell 2, men nu för prover från biodlare som varit desamma alla tre åren.

Tabell 3. Antal provtagna biodlare (Biodlare), antal prover (N) antal prover positiva för *Nosema* spp. infektion i ljusmikroskopi (+), andel prover med blandinfektion med *N. apis* och *N. ceranae* (Mix) och andel *N. ceranae* DNA i blandinfektioner (Prop) for tre år (2007, 2009 and 2011) från samma biodlare mellan åren. Antal prover från varje biodlare kan skilja mellan åren

	2007	2009	2011
Biodlare	20	20	10
N	28	50	26
+	20	45	15
Mix	0,71	0,62	0
Prop	0,24	0,12	0

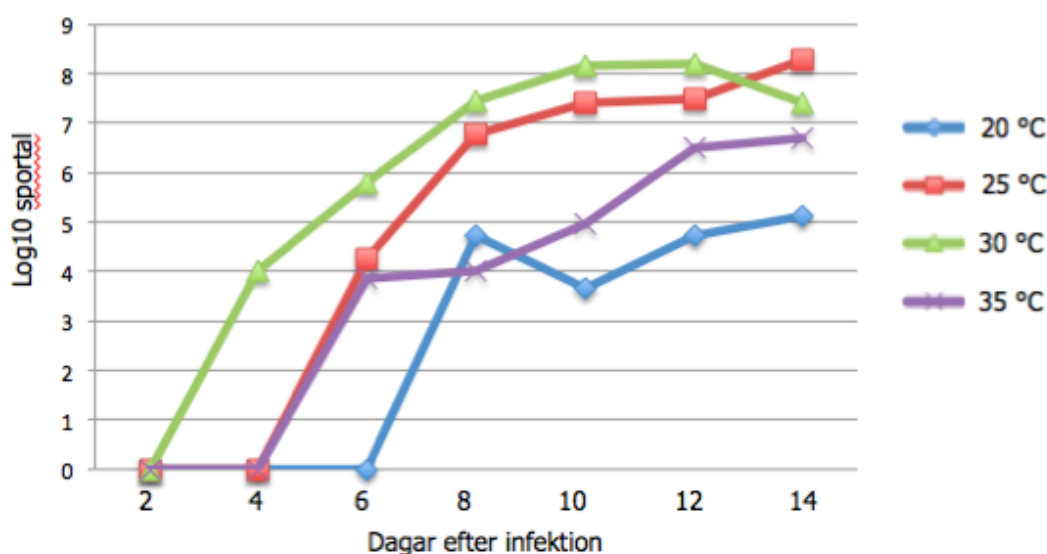
Som framgår av Tabell 3 finns ingen tendens till att andelen blandinfektioner ökar, eller att andelen *N. ceranae* DNA ökar i blandinfektioner när prover tagits hos samma biodlare. I de fall vi kunnat ta prover från samma biodlare påvisas inte ens *N. ceranae* 2011 trots att parasiten påträffats tidigare hos dessa biodlare.

De data som samlats in ger entydigt en bild som måste tolkas så att den undanträngning av *N. apis* som bevisligen skett på många håll i världen, faktiskt inte sker i Sverige. Den slutsatsen kan man också dra för nord-tyska förhållanden. I södra Tyskland verkar *N. ceranae* helt dominera, men längre norrut är bilden inte densamma då man också fortfarande påträffar *N. apis* där (P. Rosenkranz, 2011, personl. info). I t.ex. Italien och Spanien är det numera svårt att påvisa *N. apis* överhuvudtaget (F. Mutinelli, 2011, personl. info).

Temperatur och parasittillväxt

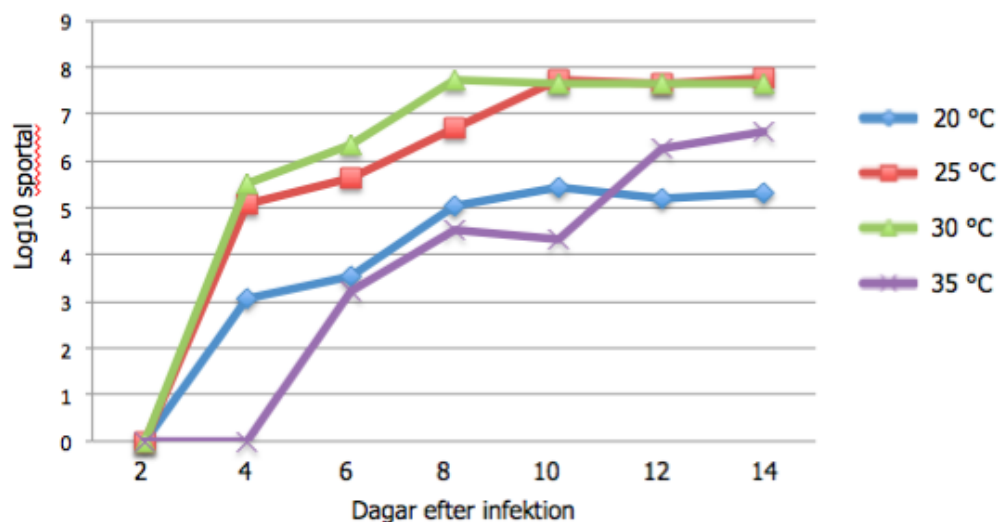
För att utröna vad olika klimatbetingelser kan betyda för utvecklingen hos *N. ceranae* har vi undersökt hur den parasiten utvecklas i enskilda bin i jämförelse med *N. apis*, när bin utsätts för olika temperaturbehandlingar. Bin har infekterats individuellt med 10 000 sporer var av *N. apis* eller *N. ceranae* och inkuberats i burar med 15-30 bin i varje bur i olika temperaturer (+20, 25, 30 och 35 °C). Provtagning har skett av tre bin varannan dag efter infektion med bestämning av spormängd (mikroskopering) i prover under två veckor. Upplägget har replikerats tre gånger för att få pålitliga resultat.

Av figur 1 framgår sportillväxten för *N. ceranae* vid olika temperaturer. Av figur 2 framgår samma data för *N. apis*. Varje datapunkt representerar medelvärdet för nio undersökta bin (tre bin i tre upprepade försök).



Figur 1. Utveckling av sportal (*Nosema ceranae*) i biets mellantarm vid olika temperaturer. Notera att skalan är logaritmisk.

Av figur 1 och 2 framgår att *N. apis* troligen utvecklas bättre vid +20 °C jämfört med *N. ceranae*. Samma tendens, om än mindre tydlig, ser ut att gälla för 25 °C. Vid 30 °C utvecklas båda parasiterna optimalt och redan vid 35 °C reduceras tillväxten för båda parasiterna, möjligen med en tendens för en något snabbare utveckling hos *N. ceranae*. Det återstår att statistiskt bearbeta materialet. Resultaten kan spegla att *N. ceranae* troligen är anpassad till ett varmare klimat jämfört med *N. apis*. Även om bina i hög utsträckning reglerar temperaturen i bisamhället, gäller den mest uttalade temperaturregleringen bara yngelklotet. I övrigt kan temperaturen för enskilda bin variera inom vida gränser, och påverkas markant av yttertemperaturen. Det faktum att vi tidigare visat att sporer av *N. ceranae* inte tål att frysas, emedan sporer av *N. apis* tål samma behandling, tyder också på att *N. ceranae* är bättre anpassad till ett klimat som är varmare än det svenska.



Figur 2. Utveckling av sportal (*Nosema apis*) i biets mellantarm vid olika temperaturer. Notera att skalan är logaritmisk.

Uppsala 30 september 2011,

Ingemar Fries
Professor

Bilagor

Bilaga 1. Publicering om faktorer kring varroatolerans.(ej publicerad p g a
copyright)

Bilaga 2. Sammanställning av försök med RNA degradering vid provinsamling

Bilaga 2

Jordbruksverket Report

Sampling Strategies for RNA analysis in honeybees

Joachim de Miranda

21 september 2011

1. BACKGROUND

Despite enormous progress in the development of molecular nucleic acid-based assays for honeybee virus diagnosis, very little research has gone into optimizing the collection of bee samples from the field for subsequent RNA analysis. Tentcheva *et al.* (2004) looked at the variability in yield and RT-qPCR performance in duplicate RNA extractions from the same raw material; Chen *et al.* (2007) investigated the effect of different storage conditions and length of storage on RNA yield and integrity, supplemented by qualitative RT-PCR of several common bee viruses and Dainat *et al.* (2011) assessed the impact of RNA degradation on the quantification by RT-qPCR of both viral and honeybee reference gene targets. The rules for RNA preservation are simple. RNA can be preserved by:

- 1.1. Cold temperatures
- 1.2. Desiccation
- 1.3. Chemical preservatives or stabilizers to inactivate RNAses
- 1.4. Rapid processing

2. DESIGN

The following sampling-transport scenarios were investigated, using different combinations of temperature control and RNA stabilizers.

Regime	Description
#1	10 Live bees transported in queen cages with candy, ambient temperature
#2	10 Live bees, frozen in -80 freezer
#3	10 Live bees, transported on ice
#4	10 crushed bees in 10ml RNAlater, transported on ice
#5	10 crushed bees in 10ml RNAlater, transported at ambient temperature
#6	10 crushed bees in 10ml saturated ammonium sulphate, transported on ice
#7	5 Bee guts in 2,5ml RNAlater, transported on ice
#8	5 Bee guts in 2,5ml RNAlater, transported at ambient temperature
#9	10 bees in 10ml 100% ethanol, transported on ice
#10	5 Bee guts dried on FTA cards, transported on ice
#11	5 Bee guts dried on FTA cards, transported at ambient temperature

10 identical samples were taken for each regime, to be analyzed in duplicate at five different time points representing different durations of transport: 12 hours, 24 hours, 2 days, 4 days and 7 days after collection. The time and cost of each sampling regime was also estimated.

3. ANALYSES

The RNA samples were analyzed for the following parameters:

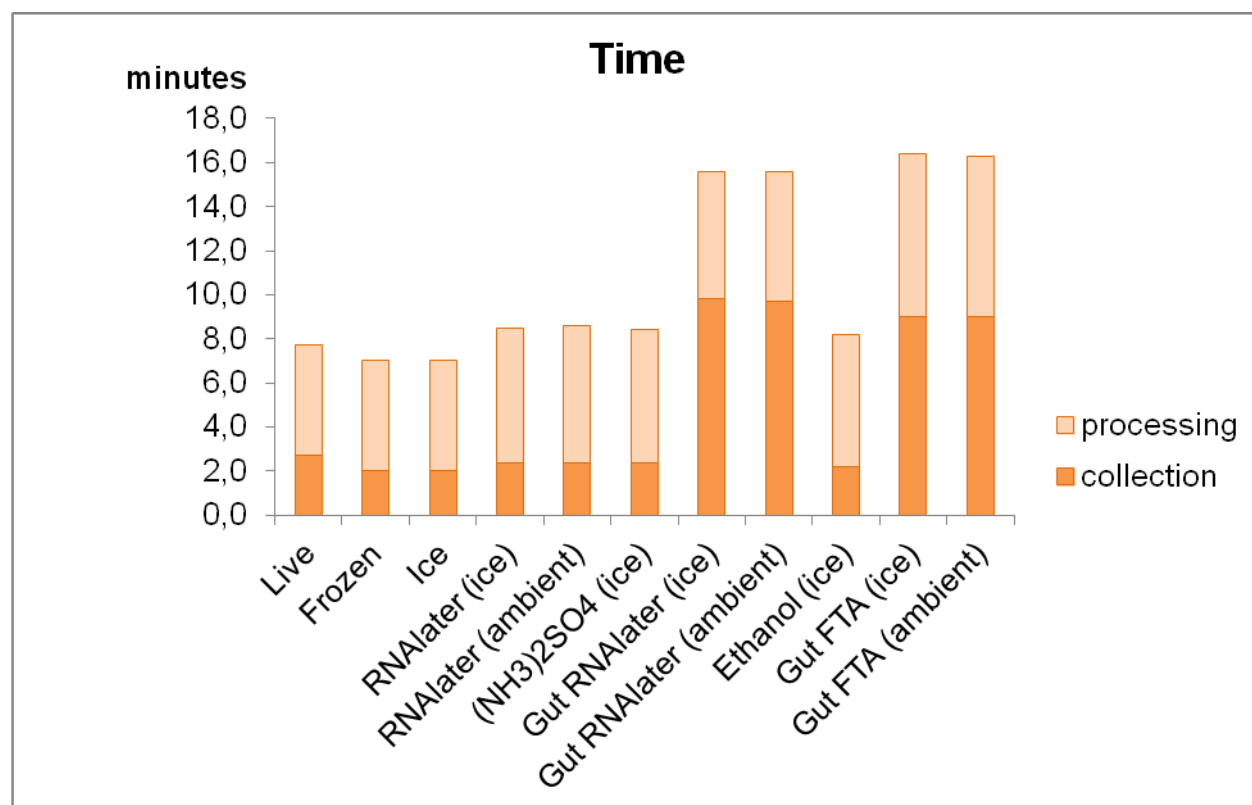
Analysis	Description
Yield	Total RNA yield as determined by spectrophotometry at 260nm (NanoDrop)

Purity	RNA purity as determined by 260nm/280nm spectrophotometry ratio (NanoDrop)
Integrity	RNA Integrity Number (RIN) as determined by microelectrophoresis (Agilent Bioanalyzer)
Inhibition	RT-qPCR amplification of passive exogenous reference RNA (RNA250; Ambion)
Sensitivity	RT-qPCR amplification of two internal reference genes (B-actin & RP49)
Quantification	RT-qPCR amplification of two honeybee virus targets (BQCV & DWV)

4. RESULTS

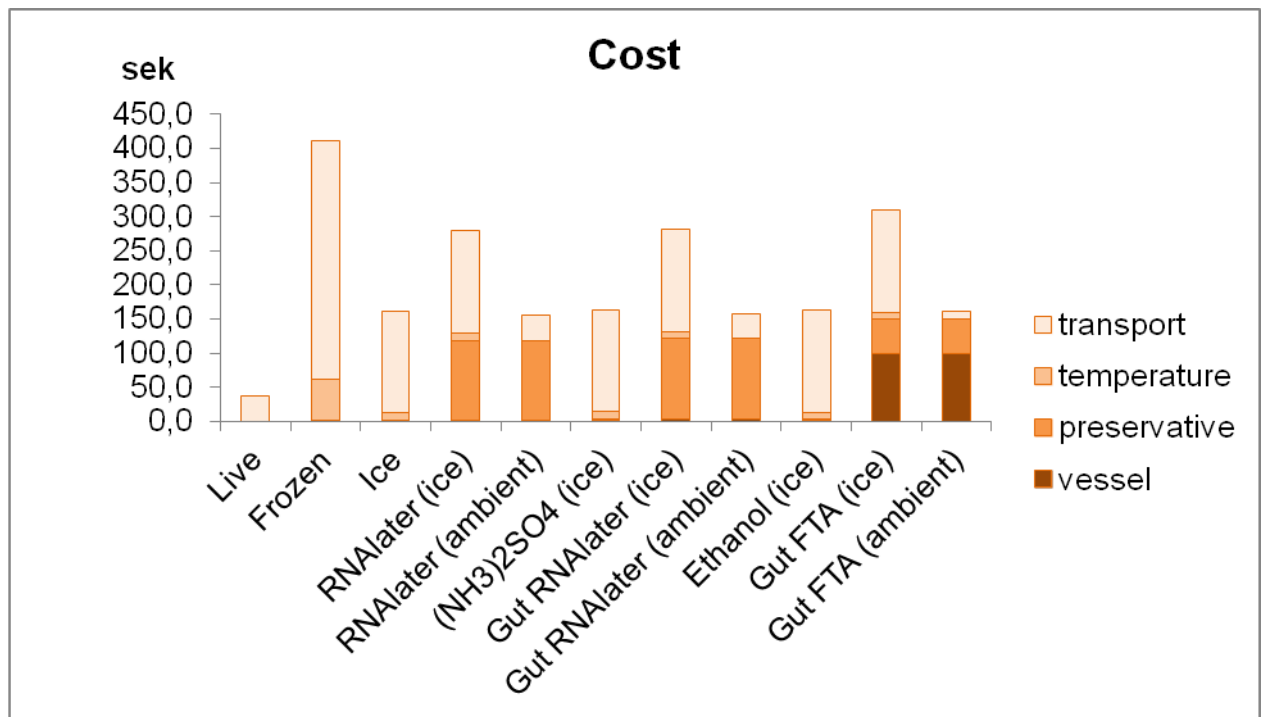
4.1. TIME

Time and cost are important factors when deciding among alternative sampling strategies. The quickest collection (including preparing the collection vessels) is whole live bees, followed by crushed bees. Extracting guts from individual bees takes five times as long. There is less difference between sampling regimes in processing the samples prior to robotic RNA extraction. Ultimately, the biggest time-expenditure for sample collection will be for getting to the colonies, while for sample processing it is the labeling of RNA storage tubes and the molecular assays after RNA extraction.



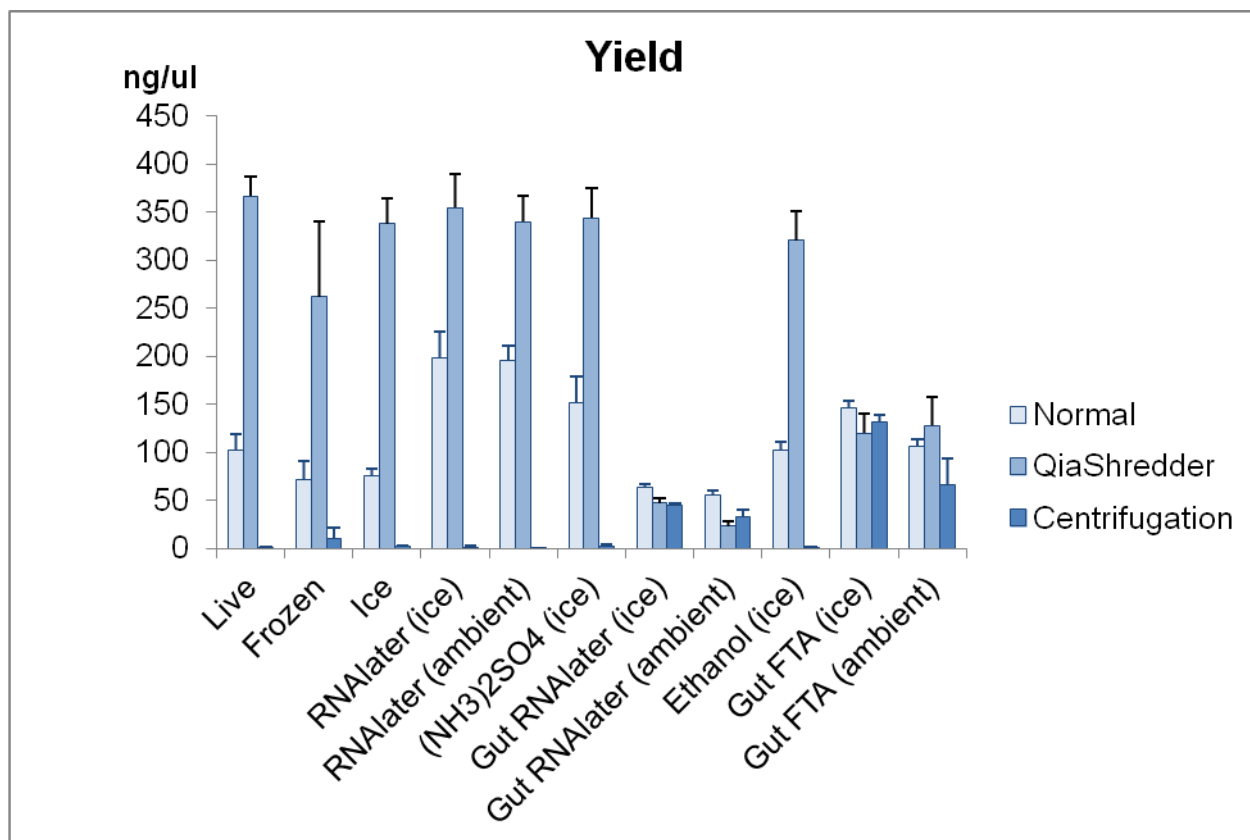
4.2. COST

Different sampling-transport-storage methods have different costs, which can be significant in large surveys. The major costs are the commercial chemical preservatives and the transportation costs for samples sent on ice or dry ice, although these costs can be spread over many samples. Transport of dry-ice is especially costly, due to transport restrictions. Generic versions of the stabilizers are much cheaper than the commercial ones. Since they apply to each sample individually, they can make enormous difference to the overall cost of surveying.



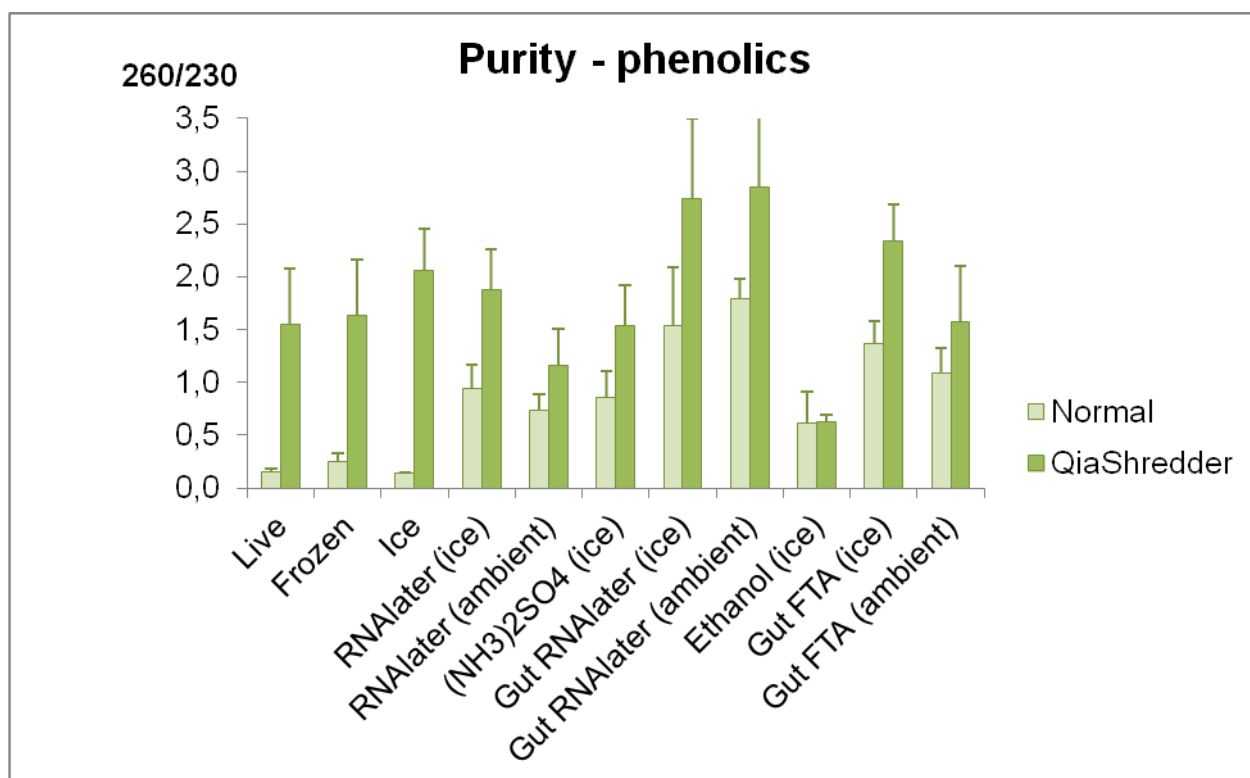
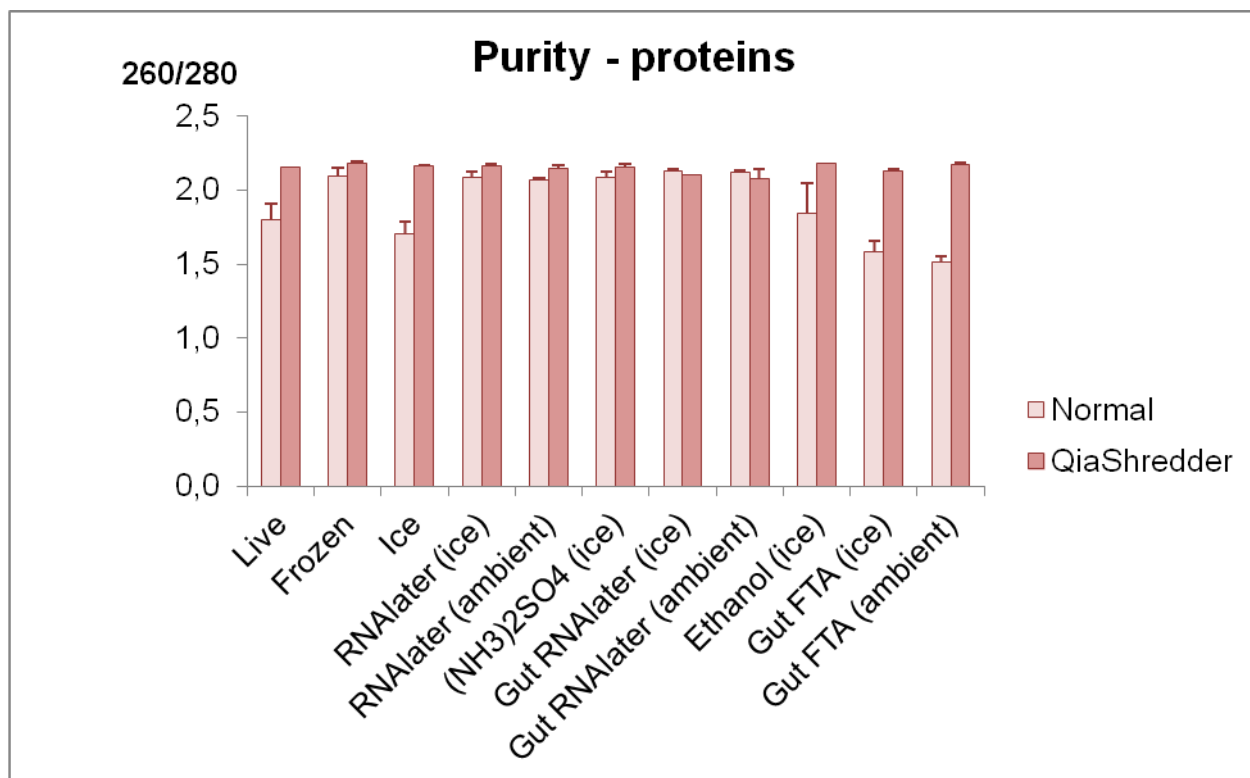
4.3. YIELD

RNA yield was most significantly affected by changes to the RNA extraction protocol. The primary whole-bee homogenate has a lot of particulate matter which clogs the RNA purification columns and is a potential source of RNAses. This particulate matter can be removed by an extra column (Qia-shredder) prior to the RNA purification column, which improves the RNA yield significantly. This is especially so for whole bee samples; less for the crushed bee samples preserved in RNAlater or ammonium sulphate. Removing the particulate matter through centrifugation after adding the RNA extraction buffer causes a massive reduction in RNA yield for whole bee extracts. The RNA yield of gut tissues is not affected by either the QiaShredder or centrifugation. Guts stored on FTA cards yield considerably more RNA than similar guts stored in RNAlater.



4.4. PURITY

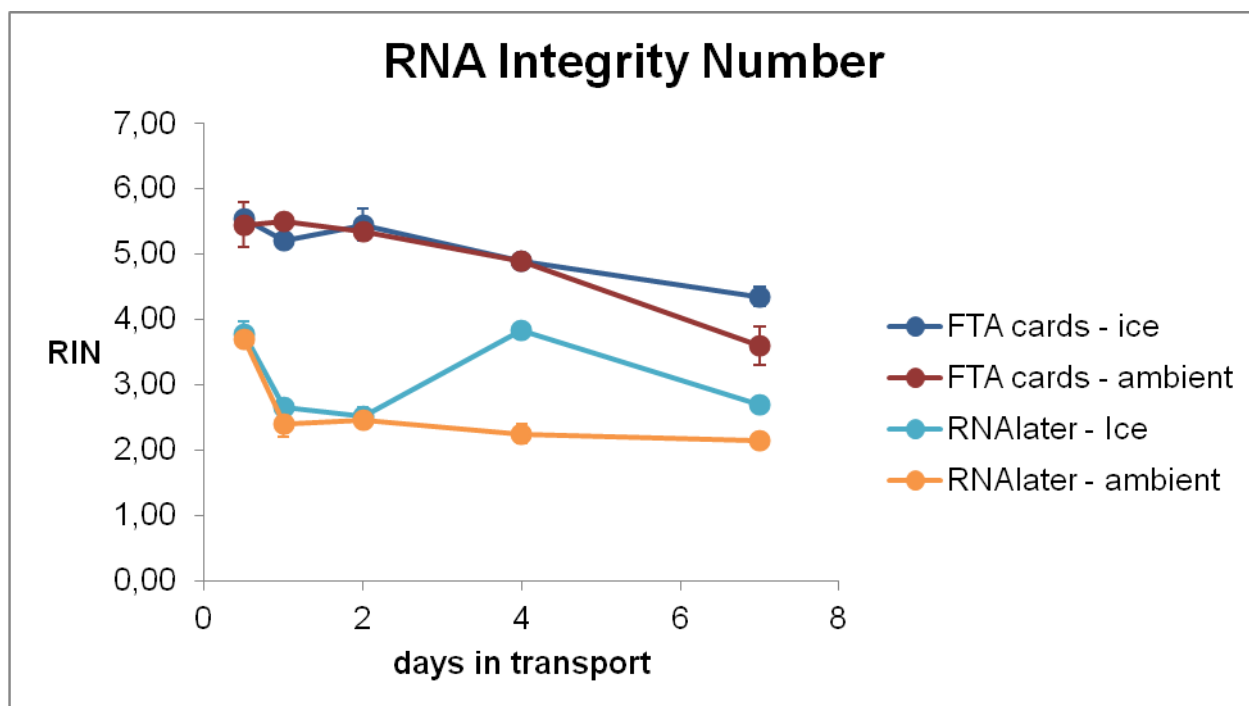
Nucleic acids have maximum absorbance at 260nm, proteins absorb maximally at 280nm and phenolics maximally at 230nm. The 260/280 and 260/230 ratios are therefore indicators of the purity of a nucleic acid sample, with a ratio of 2,0 or higher regarded as highly pure. Extraction including the QiaShredder consistently yields purer nucleic acid for all sampling-storage procedures. This is particularly evident with respect to the 260/230 ratios, i.e. the purity from secondary metabolites and phenolics. RNA from extracted guts contains fewer phenolics than RNA from whole bee samples and storage in RNAlater, may also remove some contaminants. The QiaShredder has little effect on RNA purity from bees stored in ethanol.



4.5. INTEGRITY

The integrity of the RNA was determined by the Agilent Bioanalyzer. RNA degradation results in shorter fragments which the Bioanalyzer quantifies in an index called the RNA Integrity Number (RIN) that ranges from 10 (intact) to 0 (degraded). However, the RNAs extracted from whole bee samples did not return any RIN value. This included our 'gold-standard' RNA extractions, from liquid-nitrogen frozen honeybees. The problem lies in a high intensity band near the 18S and 28S ribosomal bands that interferes with the algorithm. Chen *et al.* (2007) and Dainat *et al.* (2011)

also reported relatively low RIN of around 5 for their highest quality RNA, which should have yielded RIN close to 10. Only the bee gut RNAs, where this peak is less prominent, returned usable RIN values, although these were still affected by this peak. The guts preserved on FTA cards produced much higher RIN than those preserved in RNAlater; for both preservation methods preserving on ice gave only minimally higher RIN than preserving at ambient temperature and for both preservation methods and temperature regimes there was a significant decrease in RIN with an increase in the duration of transportation.



4.6. INHIBITION

These assays still have to be conducted.

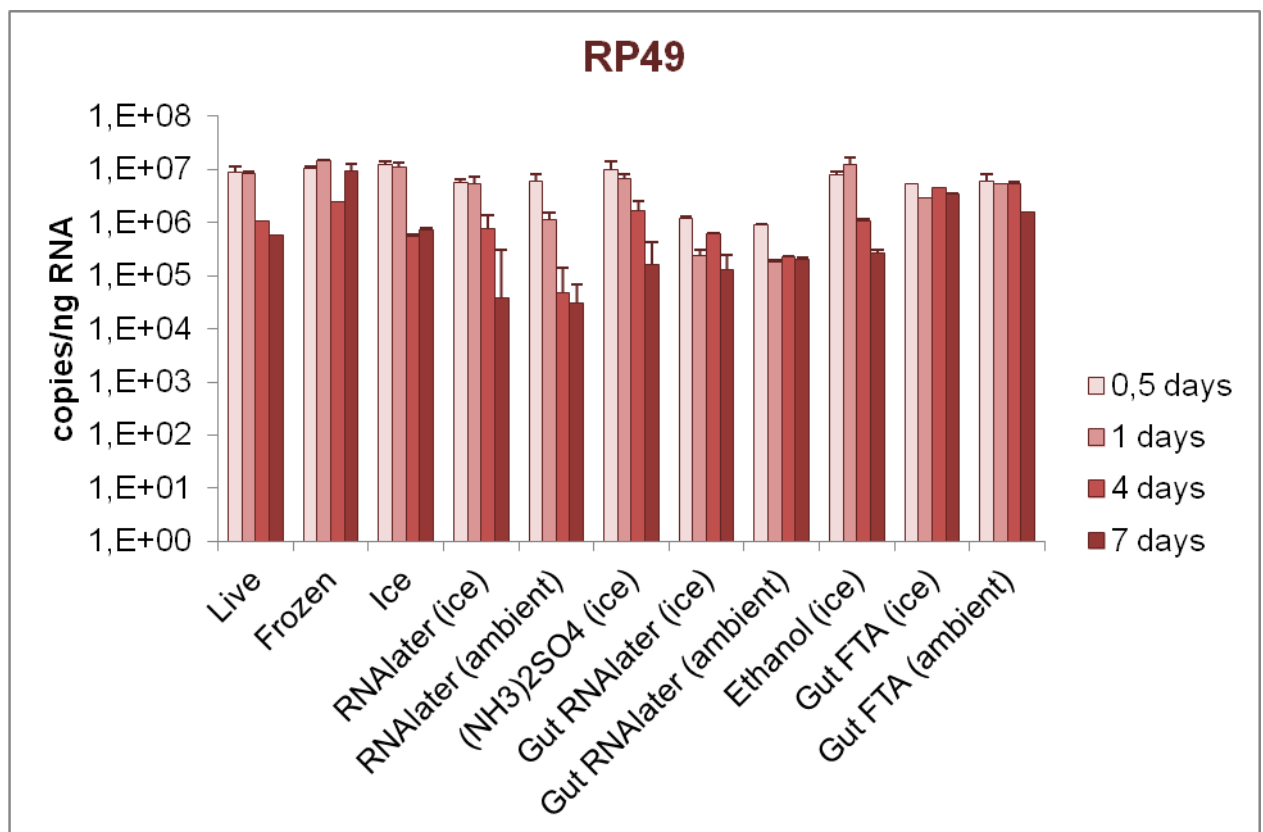
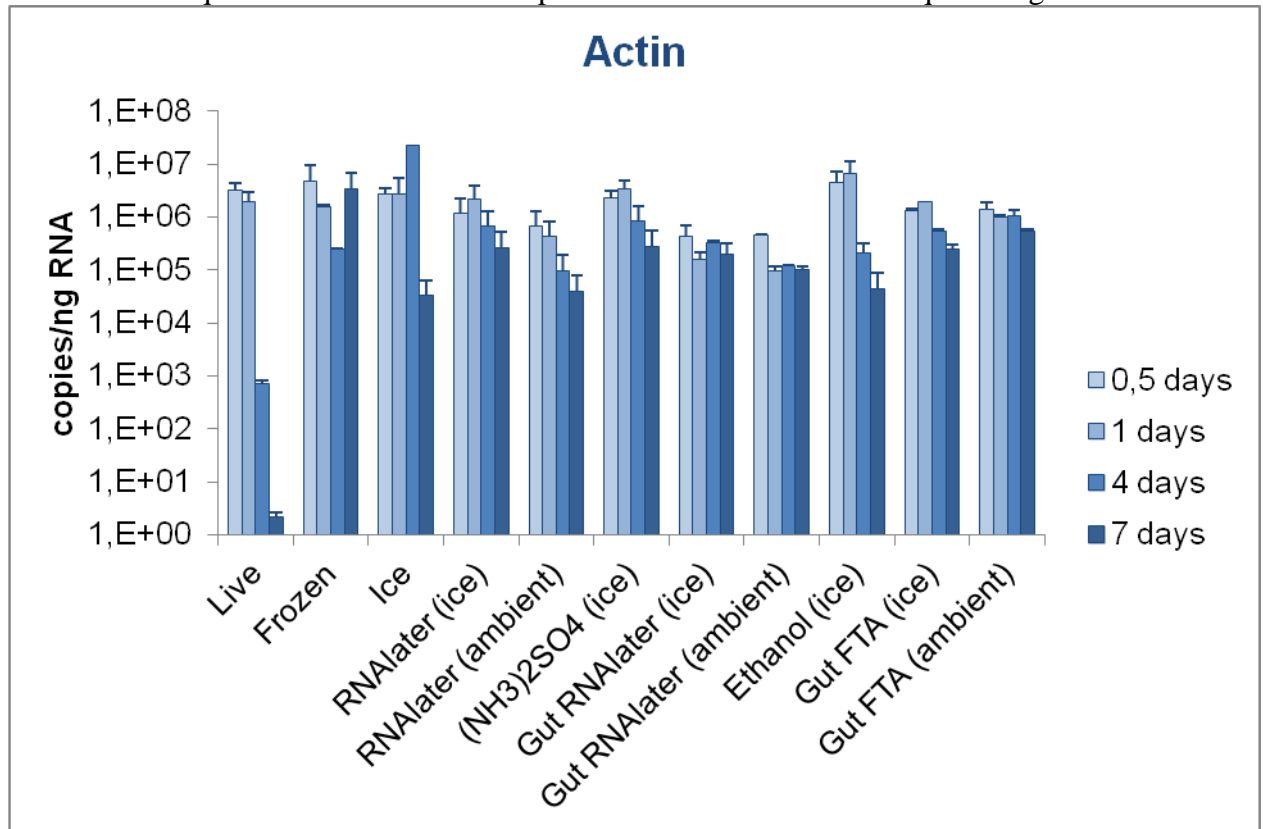
4.7. SENSITIVITY

The effect of RNA degradation on the sensitivity of RT-qPCR assays was determined by estimating the amounts of mRNA of two internal reference genes, β -actin and RP49, relative to the amount of total RNA added to the RT-qPCR reaction. If the RNA is degraded, then fewer molecules of RP49 or β -actin will be detected per microgram RNA. The expression of β -actin and RP49 is relatively constant and abundant across tissues, life stages and time.

For most sampling regimes there is a large decrease in the ability to detect both these internal reference mRNAs with increasing duration of transport, often covering several orders of magnitude by the end of 7 days storage prior to processing. The stabilizers (RNAlater, ethanol) did not improve the stability over time of the RNA in whole or crushed bees and saturated ammonium sulphate behaved identical to RNAlater. There was no difference between ice and ambient temperature for RNA stability over time. The regimes least affected by time were frozen transport at -80°C and isolated bee guts in either RNAlater or on FTA cards. For all methods were stable for at least 24 hours, *i.e.* most of the RNA degradation that affects RT-qPCR sensitivity takes place after 24 hours.

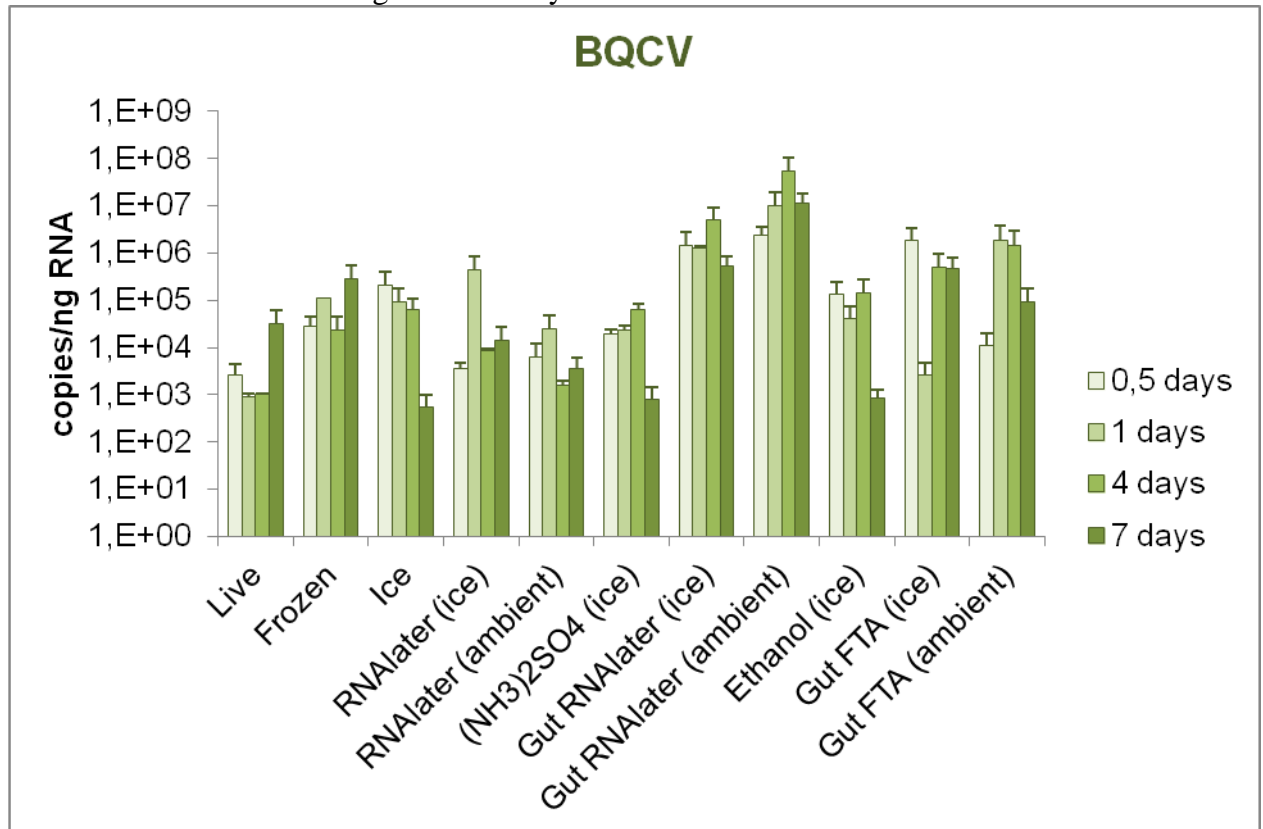
Of special interest is the loss of RT-qPCR signal for bees transported live in queen cages, especially that of β -actin. This loss of signal cannot be due to RNA

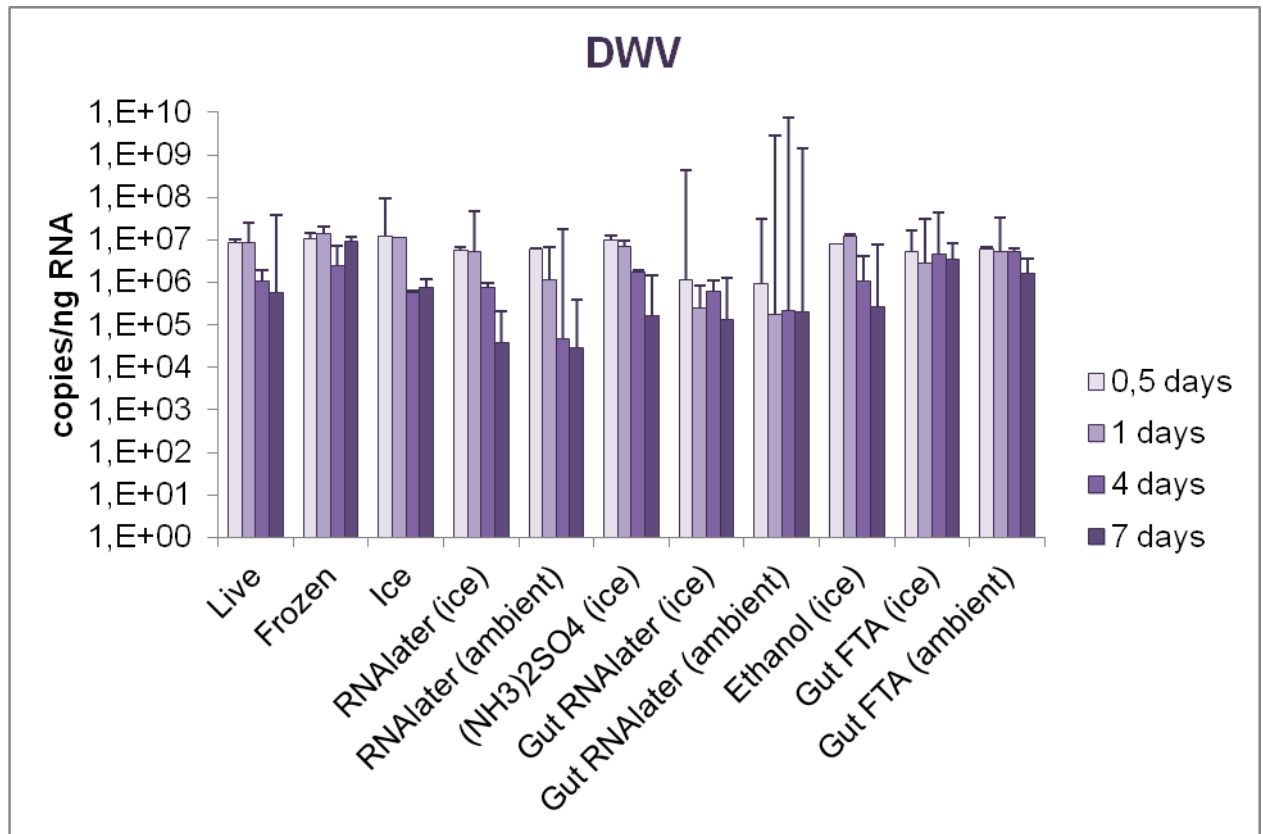
degradation, since these bees are alive throughout transport, and must have a biological origin. The RP49 assay is less affected but still also shows a significant decrease with time. This means that these particular assays should not be used to normalize RT-qPCR data from bees transported more than 24 hours in queen cages.



4.8. VIRUS QUANTIFICATION

The viral RNA targets were stable for slightly longer than the internal reference gene targets, with respect to RT-qPCR detection. Most regimes were reasonably stable up to 4 days for BQCV detection, but less so for DWV detection which behaves more like the reference RNAs. Viral RNAs are encapsidated in a protective virus particle, enhancing their stability relative to host mRNAs, and the DWV particle is known to be much less stable than that of other honeybee viruses. As before, the most stable regimes over time are frozen transport and isolated guts in RNAlater or on FTA cards. Of special interest is the highly elevated signal for BQCV from isolated guts compared to that of whole bees. This may indicate a concentration of BQCV in gut tissues relative to the rest of the bee. For DWV there is no such increase, suggesting a more even distribution throughout the body.





5. REFERENCES

- Tentcheva *et al.* (2006) *Apidologie* **37**: 1-7
Chen *et al.* (2007) *J Apic Res* **46**: 81-87
Dainat *et al.* (2011) *J Virol Meth (in press)*