



- Javni razpis za (so)financiranje raziskovalnih projektov za leto 2012 razpis v letu 2011 – začetek financiranja avgust 2013
- Tip projekta: **Aplikativni projekt – manjši**
- Primarno raziskovalno področje: **BIOTEHNIKA - Živalska produkcija in predelava**
- Raziskovalna skupina: **0481501 UL-BF- Inštitut za živinorejo na Oddelku za zootehniko**
- Vodja raziskovalnega projekta: **prof. dr. Narat Mojca**

Sodelujoče raziskovalne organizacije	Raziskovalne ure
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta	2000
Kmetijski inštitut Slovenije	250
BIA podjetje za laboratorijsko in procesno opremo d.o.o.	255

Sestava raziskovalne skupine

Štev. raz.	Ime in priimek	RO-	Vloga
5008	Mojca Narat	0481-501 BF-zoot	V
29430	Ivanka Cizelj	0481-501	R
5098	Peter Dovč	0481-501	R
24298	Irena Oven	0481-501	R
27547	Zala Prevorsek	0481-501	R
06537	Dragomir Kompan	0481-501	R
11169	Janko Božič	0481-213 BF-biol	R
18324	Gordana Glavan	0481-213	R
24503	Peter Kozmus	0401-008 KIS	R
25530	Petra Draškovič	0158-002 BIA	R

fppt.com



Finančni obseg projekta

- **134.300 EUR/leto**
- Začetek financiranja: **avgust 2013**
- Trajanje projekta: **3 leta**

Financerji	%
ARRS	75%
Čebelarstva zveza Slovenije	1 %
Bia podjetje za lab. in procesno opremo d.o.o.	4 %
Ministerstvo za gozdarstvo, kmetijstvo in prehrano	20 %

fppt.com

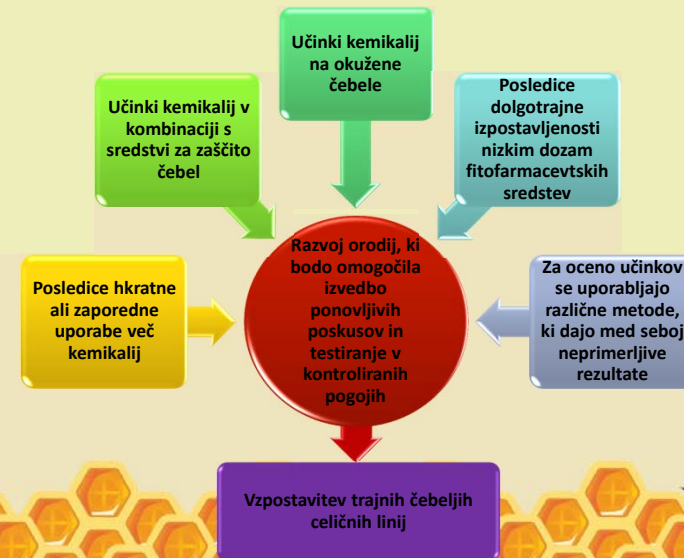


Izhodišča projekta

- Gojenje celic *in vitro* je nepogrešljiva tehnologija, ki omogoča proučevanje mehanizmov, ki potekajo *in vivo*
- Razviti so številni citotoksični testi, ki so v primerjavi s testi na živalih, cenejši, hitrejši in bolj standardizirani
- V svetu in pri nas se srečujemo z obsežno problematiko poginov čebel.
 - Vzroke iščemo med čebeljimi patogeni in predvsem med kemikalijami, s katerimi prihajajo čebele v stik: zaščitna kmetijska sredstva (FFS), zaščitna sredstva proti čebeljim škodljivcem, okoljski polutanti.
- Da bi uspešno in pravočasno rešili problem propadanja čebel, moramo razumeti vzroke poginov čebel.
 - Proučiti moramo motnje v celičnih metabolnih poteh ter molekularne mehanizme delovanja kemikalij in patogenov na celičnem in genetskem nivoju.
 - Za to potrebujemo ustrezno metodologijo in vzpostavitev trajnih celičnih kultur iz različnih čebeljih tkiv kar je prvi korak, pomemben tudi za vzpostavitev standardiziranih *in vitro* testov

fppt.com

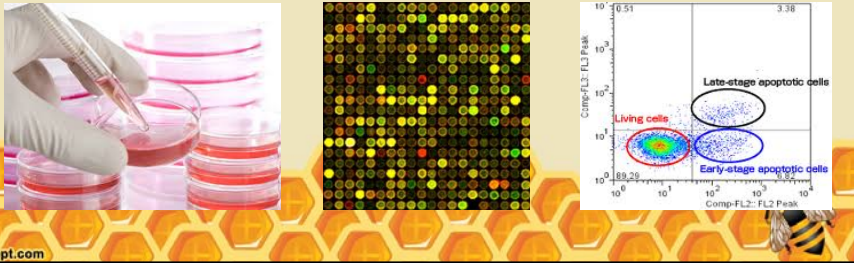
Predstavitev problema



fppt.com

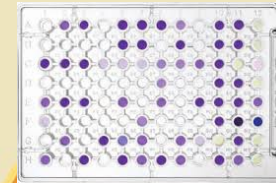
Cilji in pričakovani rezultati I

- Vzpostavitev primarnih in trajnih celičnih linij iz različnih tkiv čebel in iz različnih razvojnih stopenj
- Identifikacija sprememb v izražanju genov ob prisotnosti kemikalij in/ali patogenov
- Identifikacija mehanizmov, ki vodijo v celično smrt ob prisotnosti kemikalij in/ali patogenov



Cilji in pričakovani rezultati II

- Identifikacija sprememb v metabolnih poteh, ki jih povzroči prisotnost kemikalij in/ali patogenov
- Definirati značilne spremembe (markerske gene, metabolne poti) in na podlagi teh vpeljati *in vitro* teste na celičnih kulturah
- Izdelati posebno fenotipsko mikromrežo, specifično za čebele in razviti test za oceno škodljivih učinkov kemikalij



Relevantnost rezultatov

- Vzpostavitev čebeljih celičnih linij je v skladu s pozivi in direktivami EU in bo pomenila prispevek in napredek v mednarodnem merilu in omogočila povezovanje z mednarodnimi projekti (COLOSS network, IBRA, itd).
- Raziskava bi pomenila doprinos k razumevanju delovanja kemikalij in omogočila realne ocene nevarnosti uporabe insekticidov v različnih pogojih in kombinacijah.



fppt.com

Plan dela

Sistematično proučiti možnosti za vzpostavitev čebeljih celičnih kultur iz različnih organov.

Uporaba fenotipskih mikromrež za optimizacijo gojitvenega medija, ki doslej predstavlja omejitveni faktor.

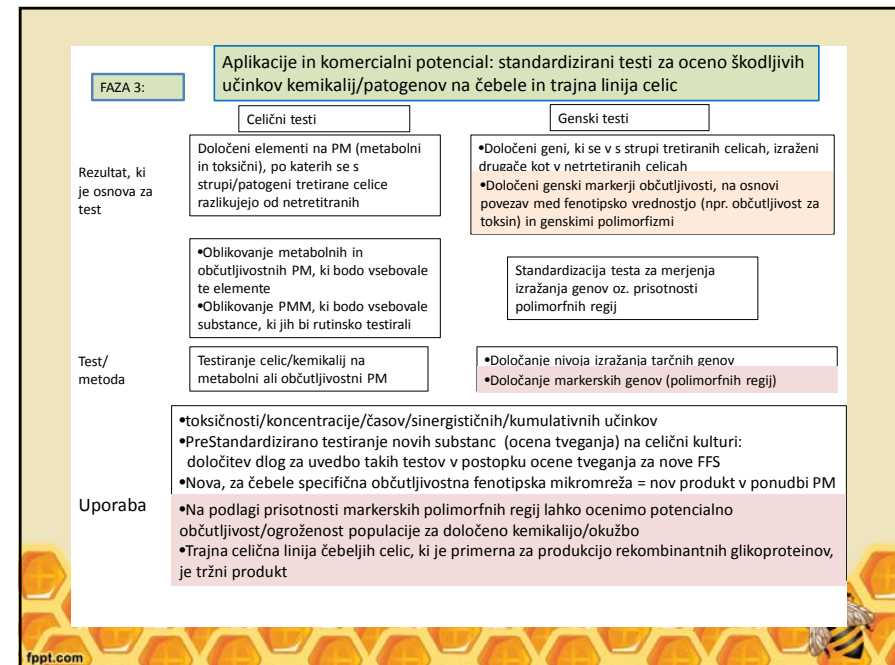
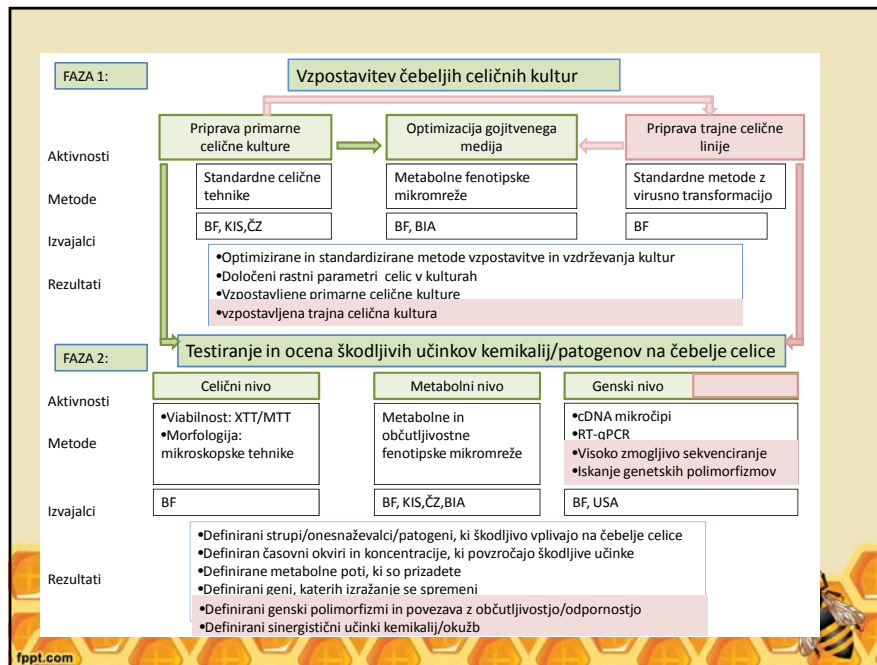
Z lentivirusno transdukcijo bomo vnesli v celice onkogene in tako pripravili trajne celične kulture.

Na primarnih in trajnih celičnih kulturah bomo testirali učinke izbranih kemikalij na celičnem nivoju ter na nivoju metabolizma in izražanja genov.

Enake poskuse bomo izvedli s kombinacijami kemikalij, ki se pojavljajo v naravnem okolju in ocenili skupne učinke.



fppt.com



Sklop 1: Vzpostavitev primarnih čebeljih celičnih kultur

Vzpostavitev primarnih celičnih kultur

- različni mediji za gojenje
- različni pogoji
- različna tkiva

Optimizacija gojitvenega medija

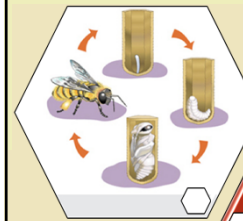
- uporaba fenotipskih mikromrež

Vzpostavitev trajne celične kulture

- spontana celična transformacija
- transformacija z vnosom onkogenov

fppt.com

Priprava primarnih kultur

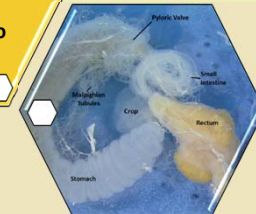


Različni razvojni stadiji

- jajčece
- ličinka
- Buba
- čebela delavka

Različna tkiva

- živčni sistem
- črevesje
- maščobno telo



fppt.com

Priprava primarnih kultur

- Celice bomo gojili v vseh do sedaj znanih medijih za čebelje celice
- Dodali jim bomo različne dodatke
- Spremljali bomo dinamiko rasti (štetje celic) in stopnjo metabolizma (XTT/MTT) v odvisnosti od gojitvenih pogojev (mediji, dodatki, pH, in T).



Izbor celic in pogojev, kjer celice hitreje rastejo oz. dlje časa in bolje preživijo pogoje presajanja in zamrzovanja

Gojišče	Tip celic, kjer je bilo gojišče uporabljeno	Dodatki h gojišču
Grace insect medium	Embrionalne celice, celice iz črevesja	FBS, antibiotiki, vitaminov, kvasni hidrolizat in lactalbumin hidrolizat
Lebovitz L-15	primarna kultura živčnih celic	glukoza, fruktoza, sukroza, prolin, L-glutamin, FCS/FBS
WH2		kvasni hidrolizat, antibiotiki
		Schneiderjev medij za insektske celice, Hanksove soli, L-Histidin, FBS, CMRL medij 1066, antibiotiki

Prve raziskave...

- Zaključuje se magistrsko delo **Tjaše Jakomin** na temo PRIPRAVA PRIMARNE KULTURE ČEBELJIH CELIC

Shema priprave celične kulture



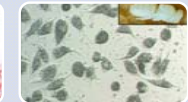
Pobiranje 2-3 in 9-10 dni starih ličink



Sejanje celic ličink skozi najlonska sita



Nasaditev celic na ustrezno gojišče

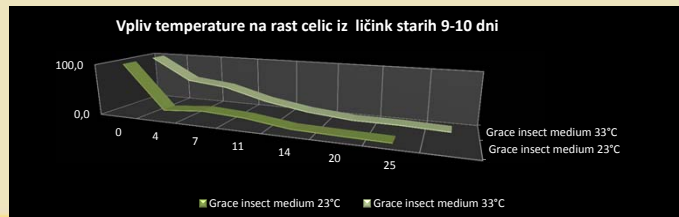
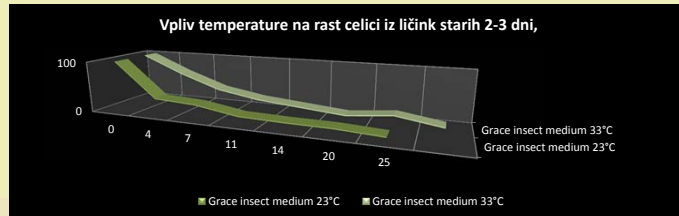


Spremljanje rasti celic pri različnih pogojih



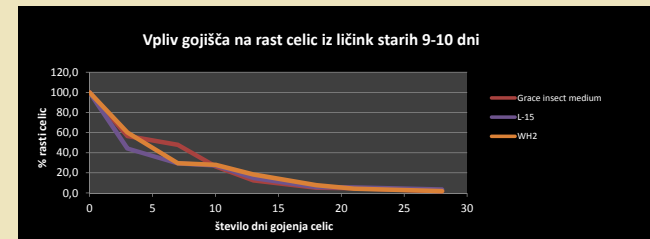
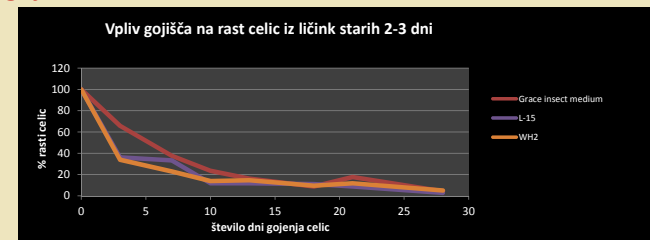
...in rezultati

Vpliv temperature (23°C in 33°C)



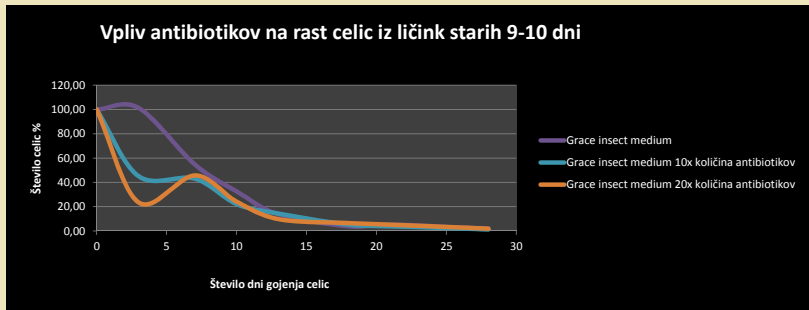
Boljša rast celic pri 33°C!

Vpliv gojišča



Najboljša rast in preživetje v Grace insect mediju!

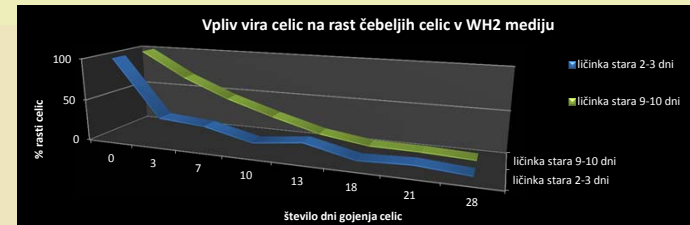
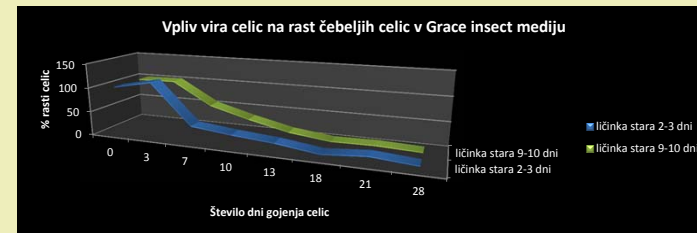
Vpliv antibiotikov



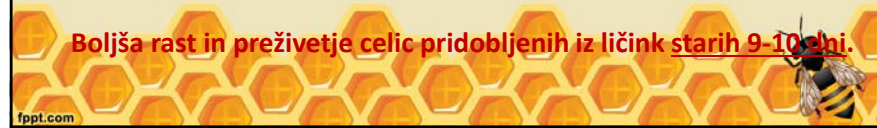
Povečana koncentracija antibiotikov zmanjša preživetje celic takoj po nasaditvi.



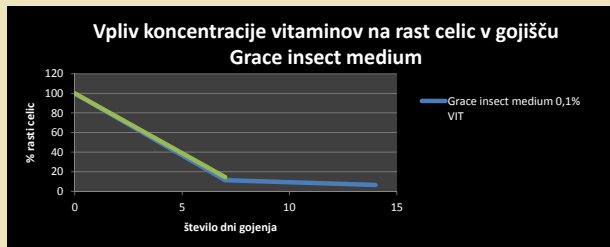
Vir celic



Boljša rast in preživetje celic pridobljenih iz ličink starih 9-10 dni.



Vpliv dodatkov: Vitamini

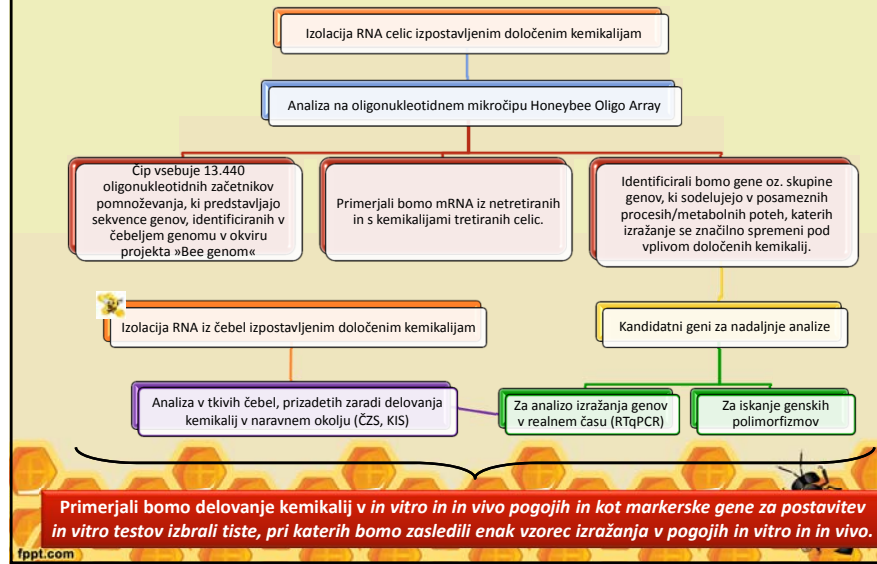


Dodatek vitaminov v koncentraciji 0.1 in 1% ne vpliva na preživetje!

**Optimalno za čebelje celice pridobljene iz ličink:
Grace insect medij, 33°C, standardna koncentracija
antibiotikov in vitaminov**



Sklop 2: Testiranje in ocena škodljivih učinkov kemikalij/patogenov na čebelje celice



Sklop 2: Testiranje in ocena škodljivih učinkov kemikalij/patogenov na čebelar celice

	Skupina	Način delovanja	Imena sredstev oz. aktivnih spojin/snovi
Insekticidi	Klorirani ogljikovodiki	-Blokirajo napetostno odvisne natrijeve kanalčke v odprtem stanju blokirajo receptor za živčni prenešalec γ -amino maslena kislina (GABA) -motijo transport elektronov v dihalni verigi in s tem preskrbo organizma z uporabno energijo	Endosulfan,Toksafen,Tiametoksam,Fipronil
	Organski fosforjevi estri	zavirajo delovanje encima acetilholin esteraze, kar povzroči splošne motnje v delovanju vseh organskih sistemov	Diazinon,Malation,Foksim,Klorpirifos Oksidemeton,Sulfotep,Diklorvos
	Karbamati		Karbofuran,Karbaril,Metomil
	piretroidi	Delujejo na napetostno odvisne natrijeve kanalčke v membranah živčnih celic	Metomil,Cipermetrin,Deltametrin, Efenvalerat, Permetrin,Piretrin
	nerieistoksini		Bensultap,Cartop
	neonikotinoidi	Delujejo kot agonisti na nikotinske holinergične receptorje (nAChR), ki jih odpira acetilholin in povzročajo njihovo dolgotrajno aktivacijo	Imidakloprid, Klotianidin, Tiakloprid
Fungicidi	azoli		Ciram, Cineb, Kaptan,Tiram, Mankozeb Fludioksonil, Folpet, Dimetomorf, Pirimetanil Prochloraz, Trilumizol, Propikonazol
Herbicidi			Imazapir, Dikvat, Diklorprop, Izoksaf lutol, Metolaklor
Akaricidi		- α -adrenergični agonisti na oktopaminske receptorje C ₂ S -ihibira monoamin oksidazo in sintezo prostoglandina.	Amitraz, Klorfentezin, Bromopropilat
Zaščitna sredstva proti varoju			kumafos, sintetični piretroid t-fluvalinat , organske kisline (oksalna in mravljična kislina)

Naslednji korak...



Analiza izražanja genov povezanih z imunskim odgovorom pri čebelah – **Vpliv fungicida in akaricida**

Shema poskusa

(Biotehniška fakulteta, prof. Janko Božič in dr. Gordana Glavan)



KONTROLA / FUNGICID / AKARICID / FUNGICID + AKARICID
 [Kontrolna, Fungicid, Akaricid, Fungicid + Akaricid]



Izolacija RNA in qPCR analize

