Utjecaj dobi i spola na biokemijske značajke hemolimfe medonosne pčele (Apis mellifera L.)

Horvatinec, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:588441

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Utjecaj dobi i spola na biokemijske značajke hemolimfe medonosne pčele (*Apis mellifera* L.)

DIPLOMSKI RAD

Jelena Horvatinec

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet
University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Biljne znanosti

Utjecaj dobi i spola na biokemijske značajke hemolimfe medonosne pčele (*Apis mellifera* L.)

DIPLOMSKI RAD

Jelena Horvatinec

Mentor:

doc. dr. sc. Lidija Svečnjak

Zagreb, rujan, 2019.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Jelena Horvatinec**, JMBAG 00581993710, rođen/a 18.12.1991. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

Utjecaj dobi i spola na biokemijske značajke hemolimfe medonosne pčele (*Apis mellifera* L.)

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

_____

Potpis studenta / studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Jelena Horvatinec**, JMBAG 00581993710, naslova

Utjecaj dobi i spola na biokemijske značajke hemolimfe medonosne pčele (*Apis mellifera* L.).

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	doc. dr. sc. Lidija Svečnjak	mentor	_____
2.	prof. dr. sc. Dragan Bubalo	član	_____
3.	izv. prof. dr. sc. Marko Vinceković	član	_____

Zahvala

Ovime zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Lidiji Svečnjak na pomoći tijekom istraživanja i pisanja ovog rada. Hvala puno na strpljenju, konstruktivnim kritikama, otvorenosti i susretljivosti.

Naravno hvala roditeljima na razumijevanju koji su s veseljem dočekali ovaj dan.

Najveću zahvalu ipak dugujem bratu Marku, koji je bio velika potpora tokom školovanja, no i uvelike doprinio tome kako sam se izgradila kao osoba.

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj istraživanja 2

2. Razrada literature 3

2.1. Pčelinja zajednica 3

2.2. Krvotok pčela 4

2.3. Hemolimfa 4

2.3.1. Stanična i humoralna imunost pčela 5

2.3.2. Istraživanja kemijskog sastava hemolimfe 7
2.3.3. Metode ekstrakcije hemolimfe 10

2.5. Infracrvena (IR) spektorskopija 11

2.5.1. FTIR-ATR- spektroskopija 12

3. Materijali i metode 13

3.1. Odabir pokusnih pčelinjih zajednica 13

3.2. Inkubacija poklopljenog legla 13

3.3. Markiranje i uzorkovanje pčela 14

3.4. Ekstrakcija hemolimfe pčela 15

3.5. Analiza uzoraka hemolimfe metodom FTIR - ATR spektroskopije 17

4. Rezultati i rasprava 20

4.1. Rezultati analize hemolimfe metodom FTIR - ATR spektroskopije 20

4.1.1. Karakterističan IR spektar hemolimfe pčela 20

4.2.2. Spektralna analiza hemolimfe dobnih skupina pčela 23
4.2.2. Spektralna analiza hemolimfe pčela iste dobi iz različitih zajednica 27
4.2.3. Komparativne spektralne varijacije između hemolimfe trutova i radilica 31
4.2.4. Spektralne značajke atipičnih uzoraka hemolimfe 36

5. Zaključak 39
6. Popis literature 40
Životopis 45

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Jelena Horvatinec**, naslova

Utjecaj dobi i spola na biokemijske značajke hemolimfe medonosne pčele (*Apis mellifera* L.)

Hemolimfa je tekućina otvorenog sustava cirkulacije medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) koja predstavlja funkcionalni ekvivalent krvi i limfe sisavaca. Složenog je kemijskog sastava te uz šećere i lipidne komponente, sadrži preko 300 različitih proteina. Dosadašnjim su istraživanjima utvrđene određene razlike u sastavu hemolimfe između kasti pčela, različitih razvojnih stadija te dobnih skupina pčela. Međutim, detaljna kemijska karakterizacija sastava hemolimfe nije provedena. Stoga je cilj ovog rada bio utvrditi biokemijske značajke i razlike u sastavu hemolimfe pčela u ovisnosti o dobi i spolu temeljem kemijskog *fingerprintinga* hemolimfe. Istraživanje je provedeno na 3 pokusne pčelinje zajednice. Ekstrakcijom iz područja prsišta iz svake su pokusne zajednice prikupljeni uzorci hemolimfe pet dobnih skupina radilica (1, 7, 14, 24 i 42 dana; n=338) i trutova (n=8) te su analizirani metodom FTIR-ATR spektroskopije. Rezultati istraživanja pokazali su kako hemolimfa pčela daje karakterističan IR spektar, a temeljem spektralnih varijacija utvrđeno je kako se hemolimfa pčela ovisno o dobi i spolu ne razlikuje kvalitativno, već postoje razlike u udjelu pojedinih komponenata sastava.

Ključne riječi: medonosna pčela, hemolimfa, FTIR-ATR spektroskopija, kemijska karakterizacija, dobne i spolne razlike

Summary

Of the master's thesis – student **Jelena Horvatinec,** entitled

Influence of age and gender on the biochemical properties of the honey bee hemolymph (*Apis mellifera* L.)

Hemolymph is a liquid of the open circulation system of the honey bee (*Apis mellifera* L.), which representes a functional equivalent of mammalian blood and lymph. It has a complex chemical composition and contains over 300 different proteins along with sugars and lipid components. Previous studies have revealed certain differences in the hemolymph composition between the honey bee castes, different developmental stages and age groups of bees. However, a detailed chemical characterization of the hemolymph composition has not been performed. Therefore, the aim of this study was to determine the biochemical characteristics and differences in honey bee hemolymph composition depending on the age and gender based on the hemolymph chemical fingerprinting. The study was conducted on 3 experimental honey bee colonies. Hemolymph samples of five age groups of workers (1, 7, 14, 24 and 42 days old; n = 338) and drones (n=8) were collected by thorax extraction from each experimental colony, and analysed by FTIR-ATR spectroscopy. The results showed that honey bee hemolymph provides a characteristic IR spectrum, and based on spectral variations it was determined that the hemolymph of the honey bee does not differ qualitatively depending on age and gender, but there are differences in the proportion of individual compositional components.

Key words: honey bee, hemolymph, FTIR- ATR spectroscopy, chemical characterization, age and gender differences

1. Uvod

Jednu od važnijih uloga u ekosustavu imaju pčele, a sve veći gubici pčelinjih zajednica posljednjeg destljeća potaknuli su brojne rasprave o njihovoj ekološkoj i ekonomskoj važnosti, doprinosu u poljoprivrednoj proizvodnji i važnosti za ekosustav. Na normalno funkcioniranje pčelinje zajednice i posljedične obrambene mehanizme posebice u vidu imunološkog odgovora pčela utječu različiti abiotički i biotički čimbenici, kao što su promjena klime, varijabilnost u izvorima hrane za pčele, dodatan stres u pčelinjoj zajednici nastao migracijskim pčelarenjem koji doprinosi širenju bolesti, različiti nametnici kao što je *Varroa destructor* (ektoparazit), vrste roda *Nosema* (crijevni paraziti), patogeni mikroorganizmi (virusi, bakterije, gljivice) primjena ksenobiotika u zaštiti poljoprivrednih kultura (herbicidi, fungicidi, insekticidi - neonikotionidi) (Evans i sur., 2006.). Spomenuti štetni učinci su jedan od brojnih uzroka CCD sindroma (engl. *Colony Collapse Disorder*) – poremećaja propadanja pčelinjih zajednica, koji ukazuje na narušavanje imuniteta pčela, te se zasigurno odražavaju i na „krvnu sliku“ pčela, koja je kao i u drugih organizama, pokazatelj općeg stanja organizma (van Engelsdorp i Pettis 2014.). Stoga je razumijevanje biokemijskih značajki hemolimfe medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) od izuzetnog značaja, posebice danas kada zbog spomenutih štetnih čimbenika te sve većeg zagađenja okoliša, dolazi do smanjenja broja pčelinjih zajednica diljem svijeta.

Hemolimfa je bezbojna tekućina otvorenog sustava cirkulacije pčela koja predstavlja funkcionalni ekvivalent krvi i limfi sisavaca, a sastoji se od vodene plazme (~90%) i hemocita (~10%). Hemolimfa ima i zaštitnu ulogu, odnosno sudjeluje u mehanizmima obrane putem urođene stanične i humoralne imunosti, koja je posredovana stanicama i antimikrobnim peptidima (AMP) koji sudjeluju u mehanizmima imunološkog odgovora pčela na različite unutarnje i vanjske faktore, te u obrani organizma od patogenih mikroorganizama. Hemolimfa također sudjeluje u transportu i skladištenju hranjivih tvari i koagulaciji. Dosadašnjim su istraživanjima utvrđene određene razlike u sastavu hemolimfe (uglavnom proteina) između kasti pčela (matica, radilica, trutova), različitih razvojnih stadija te dobnih skupina pčela obzirom da je mehanizam metaboličkih procesa vezan za dob pčela radilica i pripadnost pojedinoj kasti (Cremonez i sur., 1998.; Blatt, 2001.; Chan i sur., 2006.; Zakaria, 2007.; Kezić i sur., 2011.). Međutim, detaljna kemijska karakterizacija sastava hemolimfe u ovisnosti o dobi i spolu nije provedena, a definiranje graničnih fizioloških vrijednosti hemolimfe koje, kao i u viših organizama, opisuju normalnu „krvnu sliku“ pčela, moglo bi poslužiti za

praćenje fizioloških, patoloških i metaboličkih stanja pčelinjih zajednica i doprinijeti boljem razumijevanju pozadinskih mehanizama imunog odgovora pčela na različite štetne čimbenike.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj je ovog rada utvrditi biokemijske značajke i razlike u sastavu hemolimfe pčela u ovisnosti o dobi i spolu temeljem kemijskog fingerprintinga hemolimfe primjenom infracrvene (IR) spektroskopije.

2. Razrada literature

2.1. Pčelinja zajednica

Medonosna je pčela prema svom načinu života socijalni kukac koji živi u velikim zajednicama gdje svaka jedinka ima određnu ulogu ovisno o dobi i spolu. Pčelinja se zajednica prema strukturi sastoji od jedne matice, nekoliko desetaka tisuća radilica i nekoliko stotina trutova. Na slici 1. prikazane su morfološke odlike članova pčelinje zajednice. Zajednicom upravlja matica koja je jedino spolno razvijena ženska jedinka. Njezina uloga je reproduktivna-održavanje zajednice brojnom. Radilice su ženske jedinke sa zakržljalim jajnicima (nisu spolno zrele), najbrojniji su članovi zajednice te obavljaju sve poslove. Ovisno o dobi, razlikuju se u podjeli posla, pa tako razlikujemo:

čistačice (0-3 dana starosti) - čiste košnicu;

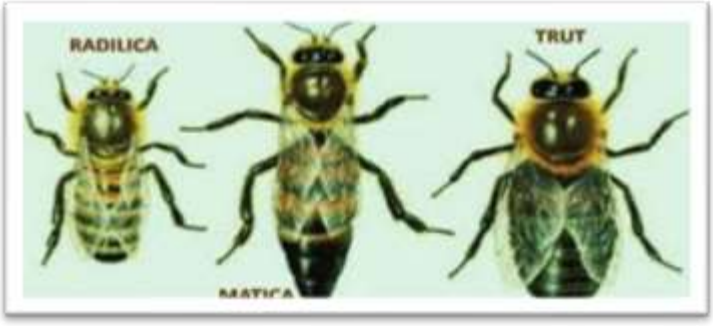
hraniteljice (3-10 dana starosti) - hrane leglo i maticu;

graditeljice (10-18 dana starosti) - izlučuju vosak i grade saće te obavljaju i druge poslove u košnici (spremanje rezervne hrane, čišćenje košnice);

stražarice (18-21 dana starosti) - nalaze se na ulazu u košnicu i spriječavaju ulaz neprijateljima;

skupljačice (od 21 dan starosti do kraja života) - skupljaju propolis, nektar, pelud, vodu i donose u košnicu.

Trutovi su muški članovi zajednice, spolno razvijeni i njihova je uloga oplodnja matice. Također, griju leglo te pozitivno utječu na radno raspoloženje (radnu euforiju) radilica. Haploidne su jedinke koje se razvijaju iz neoplođenih jajašca, odnosno nasljeđuju samo majčinske kromosome (Kezić i sur., 2011.).

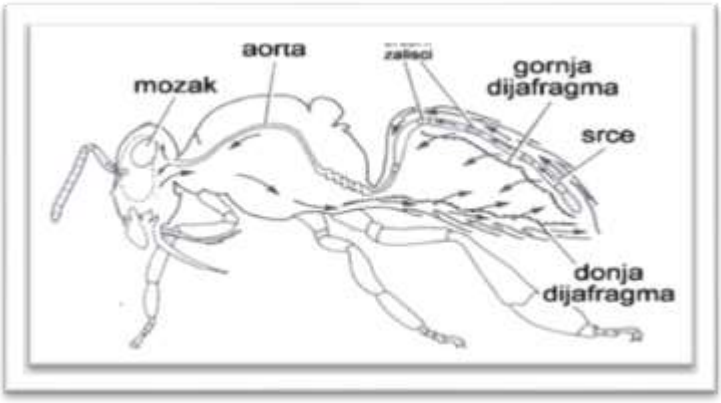


Slika 1. Članovi pčelinje zajednice

(https://pcelinaskolica.wordpress.com/ucionica/strucna-predavanja)

2.2. Krvotok pčela

Kretanje krvi u tijelu pčela nije strogo ograničeno na krvožilni sustav, već ona slobodno oplakuje organe, odnosno pčele imaju otvoreni krvotok. Ekstrakcija čiste hemolimfe iz pčele nije jednostavna kao kod sisavaca, s obzirom da se sustav sastoji od jedne dorzalne ili leđne žile koja se sastoji od prednjeg dijela koji nazivamo aortom i stražnjeg dijela - srca.
Srce se nalazi u zatku pčele, oblika je duge cilindrične cijevi koja je podjeljena u pet komorica i straga završava slijepo. Na srce nastavlja se aorta koja prolazi kroz šupljinu prsišta prema glavi i završava slobodno u glavi u visini mozga, gdje slobodno oplakuje organe donoseći hranjive tvari (Locke, 1997; Kezić i sur., 2011.). Prolazeći kroz prsište snabdjeva hranjivim tvarima mišiće lokomotornog sustava te odnosi produkte metabolizma. Cirkulira kroz noge, krila i antene, zatim prelazi u zadak gdje se pomoću donje i gornje dijafragme omogućava tok cirkulacije. Hemolimfa se tako obogaćuje hranjivim tvarima, a oslobađa otpadne produkte, te obogaćena novom količinom hranjivih tvari ulazi kroz zaliske u srce, kontrakcijama se potiskuje prema glavi i time se pokreće novi krug (Svečnjak, 2016.). Na slici 2. prikazani su dijelovi krvotoka medonosne pčele.



Slika 2. Krvotok pčele

(Izvor: Svečnjak, 2016.).

2.3. Hemolimfa

Hemolimfa je bezbojna do blago žućkasta tekućina otvorenog sustava cirkulacije najbrojnije skupine beskralješnjaka - člankonožaca (*Arthropoda*) u koju se svrstava i medonosna pčela (Svečnjak, 2016.). Većinski sadržaj hemolimfe čini voda (~90%) u kojoj su otopljene razne tvari: proteini, lipidi, ugljikohidrati, hormoni, enzimi, mokraćna kiselina i anorganski ioni (K, Ca, Na) (Locke, 1997.). Važne sastavnice hemolimfe su hemociti, krvne

stanice, koje čine ~10%, a morfološki i funkcionalno su podijeljene na prohemocite, plazmatocite, granuliocite, koagulocite, i enocite (El Mohandes i sur., 2010.). Hemolimfa je složenog kemijskog sastava te sadrži preko 300 različitih sastojaka od kojih su najznačajnije komponente sastava proteini (Zillikens, 1985.; Trenczek i sur., 1989.; Wheeler i Kawooya, 1990.; Michelette i Engels, 1995.; Herbert, 1992.), 18 aminokiselina (Wang and Moeller, 1970; Crailsheimi Leonhard, 1997.), lipidne komponentne (masne kiseline, fosfolipidi, diacilgliceroli i triacilgliceroli) (Bounias, 1986.) i ugljikohidrati (glukoza, fruktoza, trehaloza, saharoza) (Bounias and Morgan, 1984.; Arslan i sur. 1986.; Abou-Seif i sur., 1993.; Bozic and Woodring, 1997.; Fell, 1990.; Leta i sur. 1996.). Uloga hemolimfe je raznošenje hranjivih i hormonalnih tvari, odnošenje otpadnih produkata metabolizma do organa za izlučivanje, zacjeljivanje oštećenog tkiva (rana) zgrušavanjem hemolimfe, fagocitoza te termoregulacija (Evans i sur., 2006.). U hemolimfi pčela za prijenos kisika ne nalazimo transportne molekule (metaloproteine) kao što je to slučaj u viših životinja, s obzirom da pčele imaju izravni oblik disanja gdje se kisikom opskrbljuju sve stanice i tkiva u tijelu neposredno preko sustava dušnika. Hemolimfa, „krv“ pčele, ustvari predstavlja funkcionalni ekvivalent krvi i limfi sisavaca (viših životinja i čovjeka); sudjeluje u mehanizmima imunog odgovora organizma na različite vanjske i unutarnje štetne čimbenike, a njezin sastav odražava opće stanje organizma (Svečnjak, 2016.).

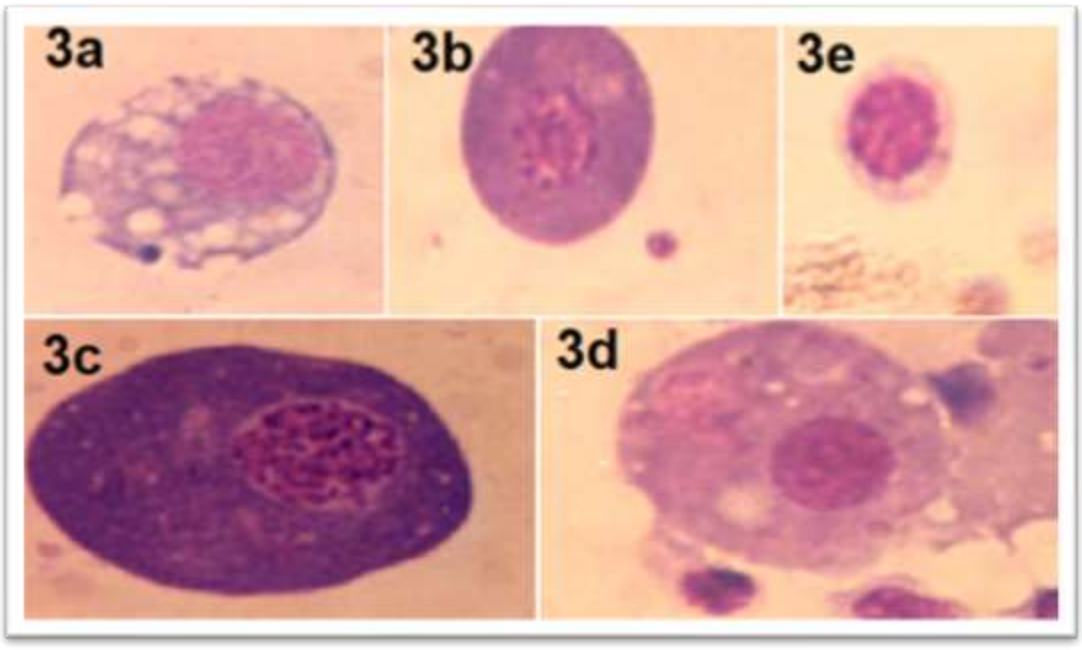
2.3.1. Stanična i humoralna imunost pčela

Stanična imunost je imunost koja obuhvaća djelovanje krvnih stanica, hemocita koji obavljaju inkapsulaciju, melanizaciju, nodulaciju i fagocitozu patogenih mikroorganizama (Marringa i sur., 2014; Schmidt, 2008; Evans i sur., 2006.). Javlja se prilikom ulaska unutar staničnih virusa, bakterija ili razvoja tvorbi (Locke, 1997; Bulet i Stocklin, 2005.). U hemolimfi pčela prisutna su tjelešca, odnosno krvne stanice – hemociti, koji sudjeluju u obrambenom sustavu, odnosno stvaranju stanične imunosti, a imaju sličnu funkciju kao leukociti i trombociti kralježnjaka (Marringa i sur., 2014.). Nastaju u hematopoetskim organima, odnosno u limfnim žlijezdama (Locke, 1997.). Postoji nekoliko vrsta hemocita (plazmatociti, granulociti enociti, koagulociti, proehemociti) koji se razlikuju morfološki i funkcionalno, odnosno obavljaju različite funkcije: fagocitoza patogenih mikroorganizama, inkapsulacija, nodulacija, melanizacija (Marringa i sur., 2014; Schmidt, 2008; Evans i sur., 2006.).

Vrste hemocita i njihova uloga:

Hemociti pčela međusobno se razlikuju po svojoj morfologiji i funkciji. S obzirom na to postoje:

- **Plazmatociti** su stanice velikog promjenjivog oblika koje sadrže puno citoplazme. Inkapsuliranjem i fagocitiranjem stranih čestica u tijelu pčele izravno sudjeluju u obrani organizma od patogenih mikroorganizama (slika 3a).
- **Granulociti** jednako kao plazmatociti sudjeluju u obrani organizma od patogenih mikroorganizama procesom fagocitoze i inkapsulacije stranih čestica u tijelu pčele. Sadrže granule po kojima ih plazmociti prepoznaju (slika 3b).
- **Enociti** su stanice u kojima se sintetiziraju kemijski spojevi i biokemijski prekursori važni za imunosni odgovor pčela (slika 3c).
- **Koagulociti** sudjeluju u procesima zgrušavanja krvi i zacjeljivanju rana. Funkcionalno su slični trombocitima u čovjeka (slika 3d).
- **Prohemociti** su male stanice okruglog oblika a nekada mogu biti i ovalne iz kojih nastaju sve predhodno navedene krvne stanice. Sadrže jezgru koju pozicioniranu u centru okružuje citoplazma, male granule i vakuola (slika 3e) (Marringa i sur**.,** 2014; Papadopoulou-Karabela i sur., 1993.).



Slika 3. Hemociti pčela: plazmatociti (3a), granulociti (3b), enociti (3c), koagulociti (3d), prohemociti (3e)

(Izvor: modificirano prema Mohandes i sur., 2010.).

Humoralna imunost poznata je kod kukaca već duže vrijeme kao humorlani antibakterijski imunitet koji je posredovan antitijelima. Istraživanjima je utvrđeno da nakon ulaska bakterije ili drugog antigena u organizam pčele, isti bude uništen, a razlog tomu su molekule proteina (Locke, 1997.). Isto je daljnim istraživanjima i potvrđeno (Marringa i sur., 2014.; Mohandes i sur., 2010). Nositelji humoralne imunosti pčela su skupine molekula tzv. antimikrobni peptidi (AMP). To su cirkulirajući proteini koji mogu blokirati razmnožavanje patogenih mikroorganizama (bakterija, virusa i gljivica), no uglavnom bakterija (Casteels i sur., 1993; Bulet i Stocklin, 2005.). Razlikujemo četiri vrste (tipa) AMP-a: abaecin, apidaecin, defenzin i himenoptecin. Princip sprječavanja razmnožavanja bakterija djeluje na način da AMP razgrađuju peptidoglikan, koji je važan sastavni dio stanične stijenke, te na taj način sprječavaju njezinu sintezu (Casteels i sur., 1993.).

2.3.2. Istraživanja kemijskog sastava hemolimfe

Istraživanja hemolimfe medonosne pčele obuhvaćena su sa 40-ak relevantnih znanstvenih publikacija, a dosadašnja su istraživanja bila usmjerena uglavnom na analizu pojedinačnih skupina organskih spojeva ili molekulskih blokova iz hemolimfe - sadržaj jednostavnih šećera, masti, proteina, AMP-a i drugih sastavnica (Svečnjak, 2016.).

Ugljikohidrati su glavni izvor energije u pčele koje koriste isključivo kao „gorivo“ za let. U hemolimfi su opisana tri šećera: glukoza, fruktoza i trehaloza (Leta i sur., 1996; Blatt, 2001.), a neki autori navode i saharozu, no nije jasno je li ona stvarno vezana za metaboličku aktivnost ili je uzrokovana kontaminacijom prilikom ekstrakcije hemolimfe (Abou-Seif i sur., 1993; Bounias i Morgan 1984; Geisler i Steche 1963; Leta i sur., 1996; Maurizio 1965.). Trehaloza je glavni šećer u hemolimfi pčele, prirodni je alfa vezani disaharid formiran putem α,α-1,1 - glikozidne veze između dvije α - glukozne jedinice (Higashiyama 2002.). Prednosti trehaloze u odnosu na glukozu su što je osmotski efekt upola manji, te ne reagira s nekim proteinima i aminokiselinama kao glukoza (Blatt, 2001.). Glukoza i fruktoza ulaze u hemolimfu cijepanjem saharoze, a nadalje se glukoza transformira u trehalozu, a fruktoza najprije u glukozu pa zatim u trehalozu. Koncentracija trehaloze varira od 2 mg/mL (Bounias i Morgan, 1984.) do 40mg/mL (Bozic i Woodring, 1997.), a glukoze i fruktoze od 2 mg/mL (Abou-Seif i sur., 1993.) do 15 mg/mL (Fell, 1990; Leta i sur., 1996.). Prosječna razina šećera u hemolimfi radilica je oko 2%, a skupljačica 2,6%. Koncentracije glukoze i fruktoze se povećavaju s povećanjem brzine metabolizma, a koncentracija trehaloze smanjuje, što dovodi

do stabilne ukupne koncentracije šećera u hemolimfi (Blatt, 2001.). Također, utvrđeno je da je sastav hemolimfe odnosno šećera u njoj ovisan o prehrani (Blatt, 2001.).

U hemolimfi pčela utvrđeno je preko 300 različitih proteina koji imaju važnu ulogu u metabolizmu i tijekom razvoja pčela. Proteini su zaslužni za otpornost pčela na bolesti, dugovječnost, proizvodnju meda i veličinu legla (Herbert 1992.). Pčele proteine unose u organizam u obliku „pčelinjeg kruha“ što predstavlja fermentirani oblik peludi pomješan s medom, izlučevinama žlijezdi pčela te enzimima (Cremonez i sur., 1998.). U hemolimfi kukaca razlikujemo transportne proteine (lipoforin), antibakterijske i antifunginalne proteine, ženski specifini protein (vitelogenin), enzime, inhibitore proteaze i lecitine (Cremonez i sur., 1998.).

Sastav proteina između razvojnih stadija pčela, posebice ličinki i odraslih pčela se značajno razlikuje. Utvrđene su razlike između muških i ženskih članova zajednice, ali i unutar ženskih članova tj. matice i radilica (Chan i sur., 2006.). Preklapanja između proteina u matica, radilica i trutova je 42% (Cremonez i sur., 1998.). Također, utvrđeno je da različita ishrana utječe na razinu proteina u hemolimfi (Cremonez i sur., 1998; El Mohandes i sur., 2010; Zakaria 2007.).

Ključni proteini koji su utvrđeni u hemolimfi odraslih pčela su:

apolipoforin - jedan od glavnih vrsta lipoproteina u hemolimfi, prenosi lipide i vitelogenin (Chan i sur., 2006.) ;

vitelogenin - ženski specifični protein (Wyatt i Davey, 1996.) - rezerva hranjivih tvari i uključen u transport lipida, šećera, vitamina, hormona i fosfata (Piulachs i sur., 2003.).

transferin - veže željezo (Chan i sur., 2006.).

Prema Engels i sur. (1990.), ovisno o dobi pčele i njezinoj ulozi u zajednici, kao i ishrani, mijenja se razina vitelogenina u hemolimfi. U ranijim fazama života ga ima više, a starenjem se smanjuje. Aminokiseline čine bitnu sastavnicu hemolimfe pčela. Utvrđeno ih je 18, a one su: prolin, serin, treonin, triptofan, triozin, valin, metionin, lizin, leucin, izoleucin, asparagin, arginin, alanin, histidin, fenilalanin, glutamin, glicin, cistin. Prolin je najzastupljenija aminokiselina (50 - 80% od ukupne količine) (Wyatt, 1961; Chen, 1985.), koja postiže maksimum od trećeg do petog dana starosti pčele, dok su niže koncentracije utvrđene kod starijih pčela (Crailsheim i Leonhard, 1997.). Utvrđeno je da pčele nakon letenja imaju nižu koncentraciju prolina, te da postoji velika razlika u koncentraciji aminokiselina između različitih zajednica, no razlog zašto je tome tako, odnosno povezanost, nije razjašnjena (Crailsheim i Leonhard, 1997.). Rosch (1925.) iznosi pretpostavku da razlika u konentracijama aminokiselina, njihovoj zastupljenosti ne ovisi samo o dobi pčela već i o

njihovoj fukciji u zajednici. Treba istaknuti da su istraživanja povezana s koncentracijom slobodnih kiselina u hemolimifi u ovisnosti o dobi pčela različita, a nekad i kontradiktorna. Primjerice, prema podacima Wang i Moller (1970.), sadržaj prolina u hemolimfi je 50% od ukupnih aminokiselina, dok Sinitzky i Lewtschenko (1971.) navode 6% od ukupnih aminokiselina. Određene aminokiseline kao što je su alanin, fenilalanin i metionin, nisu pokazale ovisnost koncentracije o dobi, dok je kod ostalih aminokiselina to uočeno (Crailsheim i Leonhard, 1997.). Razlika u sadržaju aminokiselina u hemolimfi pčela iz različitih zajednica je velika, no bilo kakva povezanost nije utvrđena (Crailsheim i Leonhard, 1997.).

Utvrđene su i značajne razlike u razinama svih aminokiselina, osim triptofana i tirozina usporedbom sadržaja aminokiselina u hemolimfii pet dana starih trutova i pet dana starih radilica (Crailsheim i Leonhard, 1999.).

Trutovi su, kao muški članovi zajednice s obzirom na fiziologiju i ulogu u zajednici, daleko manje istraživani u odnosu na radilice. Značajne razlike između trutova i radilica pronađene su u iskorištavanju glukoze tijekom leta (Gmeinbauer i Crailsheim, 1993.), u sadržaju glikogena (Panzebock i Crailsheim, 1997.) te potrošnji peludi i probavi (Szolderits i Crailsheim, 1993.).

2.3.3. Metode ekstrakcije hemolimfe

Kako bi pratili različita fiziološka, metabolička i patološka stanja jedinki unutar pčelinje zajednice, primjenjuju se različite metode ekstrakcije hemolimfe pčela.

Ekstrakcija čiste hemolimfe iz pčela nije jednostavna zbog otvorenog sustava cirkulacije pri čemu je moguća kontaminacija hemolimfe sadržajem iz zatka (sadržaj iz crijeva) ili jednjaka (nektar). Također, iz jedne se pčele može prikupiti vrlo mala količina hemolimfe prosječno 4-5 µl (Svečnjak i sur., 2012.; Svečnjak, 2016.), stoga je važno odabrati adekvatno mjesto iz kojeg će se hemolimfa ekstrahirati.
U literaturi su opisane sljedeće metode ekstrakcije hemolimfe medonosne pčele:

1. Ekstrahiranje iz aorte dekapitacijom, odnosno predhodnim uklanjanjem glave pčele.
Postupak ekstrakcije se provodi na način da se pčela fiksira pomoću mikroporozne kiruške trake okrenuta na trbušnu stranu. Pincetom se pčela drži okrenuta na trbušnu stranu na tvrdoj podlozi na koju se fiksira pomoću mikroporozne kiruške trake na način da se zalijepi zadak. Zatim se pincetom otkine glava pčele te se na to mjesto prisloni staklena mikrokapilara kapaciteta 5µl ili 10µl i na taj način se prikupi hemolimfa. Kod ovog je načina ekstrakcije hemolimfe moguća kontaminacija nektarom iz jednjaka. Postupak se izvodi bez predhodne narkoze ili usmrćivanja pčela, a količina prikupljene hemolimfe je manja u odnosu na neke druge metode (Svečnjak, 2016.).

2. Ekstrakcija hemolimfe izravno iz srca.
Pčela okrenuta na trbušnu stranu fiksira se na tvrdu podlogu pomoću mikroporozne kiruške trake. Zalijepi se glava te se staklena mikrokapila kapaciteta 5 µl ili 10 µl prisloni i lagano probode između trećeg i četvrtog kolutića zatka, s leđne strane u području srca. Nedostatak ove metode je što postoji mogućnost kontaminacije hemolimfe sadržajem iz mednog mjehura (nektarom) ili crijeva pčele. Postupak se izvodi bez predhodne narkoze ili usmrćivanja pčela (Leta i sur.,1996.; Cremonez i sur.,1998.; Chan i sur.,2006.; De Jong i sur.,2009.).

3. Ekstrakcija hemolimfe iz narkotiziranih pčela između 3. i 4. segmenta.
Pčele se podliježu narkozi s CO_2 u vremenu od jedne minute i drže na ledu najviše 1,5 sati. Slijedi rez s parom kiruških škara između trećeg i četvrtog trbušnog segmenta. Na mjestu reza

prisloni se staklena mikrokapilara kapaciteta 5 µl pomoću koje se ekstrahira hemolimfa (Crailsheim i Leonhard 1999.).

4. Ekstrakcija iz prsišta uklanjanjem nogu

Pčela se fiksira na tvrdu podlogu mikroporoznom kiruškom trakom na način da se zalijepi glava i zadak kako bi se omogućio nesmetan pristup prsištu. Pincetom se noge izvuku, ukloni se stražnja noga, a zatim se staklena mikrokapilara kapaciteta 5 µl ili 10 µl prisloni na mjesto uklonjene noge i prikupi se hemolimfa. U slučaju da se iz prve uklonjene noge ne uspije ekstrahirati hemolimfa, otkidaju se redom i ostale noge dok se ne prikupi dostatna količina hemolimfe za daljnju analizu. Treba naglasiti kako na navedenom mjestu ne postoji mogućnost kontaminacije hemolimfe nektarom jer u tom dijelu cirkulacije (ekstremiteti pčele) prolazi samo hemolimfa. Postupak se izvodi bez predhodne narkoze ili usmrćivanja pčela (Svečnjak, 2016.).

2.5. Infracrvena (IR) spektorskopija

Interakciju elektormagnetskog zračenja i materije proučava znanost koju nazivamo spektroskopija. Daje informaciju o sastavu i građi tvari te se koristi u mnogim granama prirodnih znanosti, a najraširenija je njena primjena u analitičke svrhe (Pavia i sur., 2009.).

Infracrvena spektroskopija (IR) temeljena je na raznovrsnim mogućnostima mjerenja uzoraka, pruža informacije o ukupnom kemijskom sastavu uzorka i koristi infracrveno zračenje valne duljine od 0.8 do 1000 µm, frekvencije 375 THZ do 300 GHz (Günzler i Gremlich, 2006.).
Molekule apsorbiraju različite frekvencije elektromagnetskog zračenja i pokazuju različiti elektormagentski spektar u infracrvenom području (Pavia i sur., 2009.). Sve molekule vibriraju točno određenim amplitudama koje odgovaraju vibracijskim energetskim razinama, a IR spektorskopija detektira molekulske vibracije i spada u takozvanu vibracijsku, odnosno molekulsku spektroskopiju (Svečnjak, 2015.). Molekule počinju vibrirati pobuđene apsorbcijom infracrvenog zračenja, te ako dođe do promjene dipolnog momenta molekule, doći će do emisije ili apsorbcije IR zračenja, a vibracija će biti vidljiva u infracrvenom spektru (IR aktivna molekula). Vibracije ovise o čvrstoći veza između atoma molekule i masi atoma molekula koje vibriraju. Postoje različiti oblici vibracija: torzija molekula, deformacijske vibracije, istezne vibracije, njihajne vibracije, zibanje i disanje molekula i

mnoge druge. S obzirom da funkcionalne skupine molekula pokazuju točno određene vibracije koje se pojavljuju u područjima IR spektra, detaljnom analizom intenziteta i položaja aposorpcijskih vrpci moguća je asignacija promatrane funkcionalne skupine molekula (Günzler i Gremlich, 2006.).

2.5.1. FTIR-ATR- spektroskopija

FTIR-ATR spektroskopija je spektroskopija u infracrvenom dijelu spektra s Fouruerovom transformacijom (računska pretvorba interferograma izvedena na računalu) i ATR tehnikom snimanja (engl. *Attenuated Total Reflectance* - prigušena totalna refleksija), koja omogućuje snimanje spektara uzorka bez razaranja tvari te daje IR spektar gornje površine tvari. Dubina prodora IR zračenja u uzorak je 0,5 μm. Uzorak se dovodi u dodir s internim refleksijskim elementom (dijamant, silicij i drugi materijali s visokim indeksom loma svjetlosti) pri čemu će na svakoj refleksijskoj točki apsorbirati IR zračenje. U odnosu na konvencionalnu disperzijsku spektroskopiju prednosti Fouruerove transformacije su: preciznost tehnike snimanja, jednostavnost i brzina: frekvencije koje dolaze od izvora zračenja istovremeno padaju na detektor, čime se vrijeme mjerenja znatno skraćuje (Günzler i Gremlich, 2006.).

Navedena metoda je jednostavna, brza i nedestruktivna, te se primjenjuje za prepoznavanje kemijskih spojeva. Razvojem naprednih spektroskopskih tehnika i suvremenom kemometrijom, FTIR je primijenjen u složenim sustavima, a područje primjene FTIR spektroskopije sve je šire što ukazuje i na mogućnost njene primjene za identifikaciju sastavnica i detaljnu kemijsku karakterizaciju hemolimfe pčela (Wu i sur., 2008.).

3. Materijali i metode

3.1. Odabir pokusnih pčelinjih zajednica

Istraživanje je provedeno u razdoblju lipanj - srpanj 2019. godine na tri pokusne pčelinje zajednice smještene na Pčelinjaku nadbiskupa Haulika (Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet). U istraživanju su korištene tri pčelinje zajednice sive pčele (*Apis mellifera carnica* Pollman, 1879.). Snaga pokusnih pčelinjih zajednica je procijenjena standardiziranom Liebefeld metodom (Delaplane i sur., 2013.) a zajednice su prije pokusa uniformirane prema snazi. Zajednice su bile smještene u Langstroth-Roothove (LR) košnice na dva nastavka (okrenute prema jugu).

3.2. Inkubacija poklopljenog legla

Iz svake pokusne pčelinje zajednice uzet je jedan okvir poklopljenog starijeg pčelinjeg legla (slika 4.) koji je u vertikalnom položaju tijekom noći postavljen u inkubator (Heratherm Thermo Scientific) pri temperaturi od 34.5°C. Narednog su dana u inkubatoru izašle mlade 24 sata stare pčele radilice markirane bojom za kukce te su korištene za istraživanje hemolimfe kako je opisano u daljnjem tekstu. Okvir s leglom iz svake pčelinje zajednice inkubiran je zasebno tijekom tri uzastopna dana. Na slici 5. prikazan je inkubator Heratherm, Thermo Scientific (lijevo) i okvir poklopljenog starijeg pčelinjeg legla u inkubatoru (desno).

Slika 4. Odabir poklopljenog pčelinjeg legla spremnog za inkubaciju na 24 sata

Slika 5. Inkubator Heratherm, Thermo Scientific (lijevo), okvir poklopljenog starijeg pčelinjeg legla u inkubatoru (desno)

3.3. Markiranje i uzorkovanje pčela

Iz svake pokusne pčelinje zajednice markirano je 260 mladih pčela radilica netom izašlih iz stanica saća kako bi se omogućilo daljnje uzorkovanje pčela definirane dobi za ekstrakciju hemolimfe. Ukupno je markirano 780 pčela. Na slici 6. prikazano je markiranje pčela netom izašlih iz stanica saća. Pčele su markirane na području prsiša bojom za kukce, a pčele iz svake pokusne pčelinje zajednice markirane su različitim bojom (bijela, žuta, zelena) kako ne bi došlo do pogrešnog uzorkovanja tijekom eventualnog zalijetanja pčela u druge košnice. Dijelu mladih pčela (n=30) iz svake pokusne pčelinje zajednice odmah je ekstrahirana hemolimfa, a preostale markirane pčele vraćene su u košnicu (slika 7.), te je ekstrakcija hemolimfe provedena nakon 7, 14, 24 i 42 dana, odnosno prikupljeni su uzorci hemolimfe ukupno pet dobnih skupina pčela (1, 7, 14, 24 i 42 dana starosti). Ukupno je prikupljeno 24 do 31 uzoraka hemolimfe po svakoj dobnoj skupini iz svake pokusne zajednice. Na slici 8. prikazano je prikupljanje pčela starije dobi iz pokusnih zajednica.

Slika 6. Markiranje pčela

Slika 7. Markirane pčele u zajednici

Slika 8. Prikupljanje pčela iz pokusnih zajednica (lijevo – prikupljanje s okvira; desno – polaganje pčela u kutiju

3.4. Ekstrakcija hemolimfe pčela

Uzorci hemolimfe prikupljeni su staklenim mikrokapilarama metodom ekstrakcije iz područja prsišta uklanjanjem nogu kod kuka (slika 9.) kako bi se izbjegla kontaminacija nektarom. Pčela se fiksirala na tvrdu podlogu mikroporoznom kirurškom trakom (*Micropore*) na način da se zalijepila zasebno glava i zadak pčele kako bi se omogućio nesmetan pristup prsištu. Opisana metoda je ovdje modificirana na način da je izostavljena fiksacija pčela pomoću mikroporozne kiruške trake, već je jednom rukom na području prsišta živa pčela

prihvaćena za krila, a drugom rukom pomoću pincete joj je otkinuta noga u području kuka. Pincetom se prvo uklonila stražnja noga, a zatim se staklena mikrokapilara kapaciteta 10 µl prislonila na mjesto uklonjene noge, te se prikupila hemolimfa (slika 10.) Prosječna količina prikupljene hemolimfe iznosila je 3 - 4 µl. U slučaju da se iz prve uklonjene noge ne uspije ekstrahirati hemolimfa, otkidaju se redom i ostale noge dok se ne prikupi dostatna količina hemolimfe za daljnju analizu. Navedena metoda ekstrakcije je odabrana jer u područja prsišta nakon uklanjanja nogu ne postoji mogućnost kontaminacije hemolimfe nektarom.

Slika 9. Otkidanje noge pincetom

Slika 10. Ekstrakcija hemolimfe iz prsišta pčele staklenom mikrokapilarom kapaciteta 10 µl

Prikupljeni uzorci hemolimfe (slika 11.) pet dobnih skupina pčela (1, 7, 14, 24 i 42 dana starosti) nisu arhivirani niti pohranjeni prije daljnje analize, već su analizirani su u izvornom stanju, neposredno nakon prikupljanja.

Slika 11. Prosječna količina hemolimfe (3 - 4 µl) prikupljene iz pčele staklenom mikrokapilarom

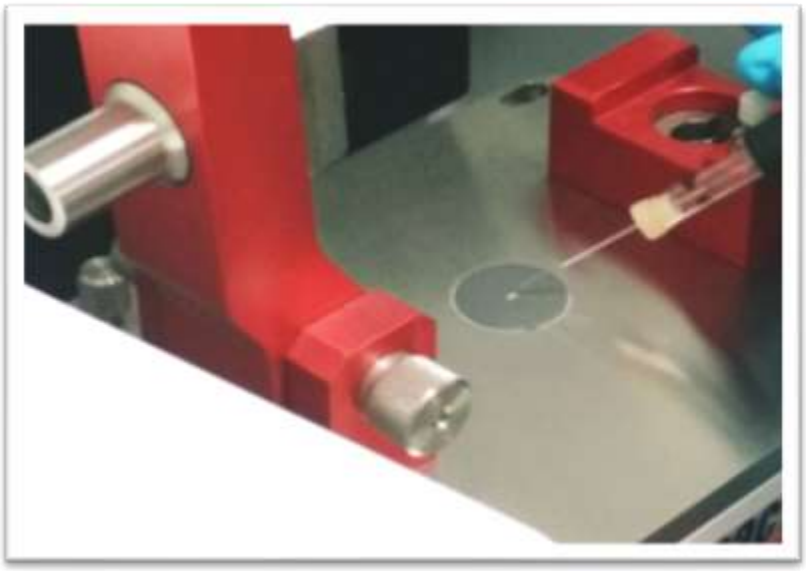
3.5. Analiza uzoraka hemolimfe metodom FTIR - ATR spektroskopije

Uzorci hemolimfe analizirani su metodom FTIR-ATR spektroskopije; spektroskopije u srednjem infracrvenom dijelu spektra (spektralno područje: 4000 - 600 cm^{-1}) s Fourierovom transformacijom (eng. *Fourier tranform infrared spectroscopy*) i ATR (engl. *Attenuated total reflectance*; prigušena totalna refleksija) tehnikom snimanja (slika 12. i 13.). Infracrveni (IR) spektri prikupljenih uzoraka hemolimfe snimljeni su u izvornom stanju pomoću infracrvenog spektrometra Cary 660 (Agilent Technologies) s DTGS (deuterirani triglicin sulfat) detektorom i CsI (cezijev jodid) optikom, spektralnog raspona od 5000 do 200 cm^{-1}. Za snimanje spektara korištena je tehnika jednorefleksijske prigušene totalne refleksije (ATR), a u tu svrhu upotrijebljen je Golden Gate ATR instrumentalni dodatak (Specac) s dijamantom kao internim refleksijskim elementom i ZnSe (cinkov selenid) optičkim komponentama. ATR tehnika snimanja ili prigušena unutarnja refleksijska spektroskopija je tehnika mjerenja bez razaranja uzorka koja daje IR spektar gornje površine tvari (dubina prodora IR zračenja u uzorak = 0,5 µm) u kontaktu s internim refleksijskim elementom.

Uzorak hemolimfe je prije snimanja spektra postavljen na dijamant ATR ploče (slika 14.). te pokriven ATR dodatkom koji priječi potencijalno isparavanje uzorka. Apsorpcijski spektri uzoraka hemolimfe snimljeni su na sobnoj temperaturi (24 ± 2°C) pri spektralnoj rezoluciji od 4 cm^{-1}. Svaki spektar snimljen je kao razlika spektra uzorka i ATR elementa bez uzorka. Nakon analize svakog uzorka ATR kristal temeljito je očišćen etilnim alkoholom (96%) i

osušen mekim papirnatim materijalom. Kako bi se isključili nepotrebni (bezsignalni i/ili šumni) dijelovi spektra, samo je spektralni raspon između 4000 i 600 cm^{-1} uzet u obzir za daljnju analizu i obradu podataka. IR spektri analiziranih uzoraka hemolimfe pohranjeni su u spektrometarsko računalo u BSC formatu, te konvertirani u SPC format pomoću softverskog paketa Resolutions Pro (Agilent Technologies) u svrhu daljnje obrade podataka.

Slika 12. i 13. FTIR spektrometar (lijevo) s ATR instrumentalnim dodatkom (desno)



Slika 14. Uzorak hemolimfe postavljen na dijamant ATR ploče

3.5. Obrada i analiza spektralnih podataka

Kvalitativna interpretacija IR spektara hemolimfe provedena je s ciljem kemijske karakterizacije ispitivanih uzoraka hemolimfe (asignacije apsorpcijskih vrpci odgovarajućih funkcionalnih skupina molekula u uzorku) pomoću softverskog paketa za kvalitativnu analizu spektralnih podataka Spekwin32 (Spekwin32: optical spectroscopy software, version 1.72.0.). Nakon kvalitativne obrade podataka i identifikacije signala (asignacije apsorpcijskih vrpci) prisutnih u IR spektrima hemolimfe, spektri su podvrgnuti kemometrijskoj obradi koja je provedena pomoću programskog paketa za analizu, manipulaciju i grafički prikaz spektralnih podataka Origin 8.1. (OriginLab, version 8.1.).

4. Rezultati i rasprava

Metodom FTIR-ATR spektroskopije analizirano je 338 uzoraka hemolimfe radilica različitih dobnih skuipina iz 3 pokusne pčelinje zajednice kako je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Broj analiziranih uzoraka hemolimfe prema dobnoj skupini i pokusnoj zajednici

Dobna skupina pčela (dan)	Pokusna zajednica		
	K1 (n)	K2 (n)	K3 (n)
1	25	25	31
7	25	24	30
14	24	26	31
24	28	26	25
42	0	0	18
Ukupno	102	101	135

Dodatno su analizirani uzorci hemolimfe trutova (n=8) kako bi se utvrdile spektralne varijacije u ovisnosti o spolu pčela.

4.1. Rezultati analize hemolimfe metodom FTIR - ATR spektroskopije

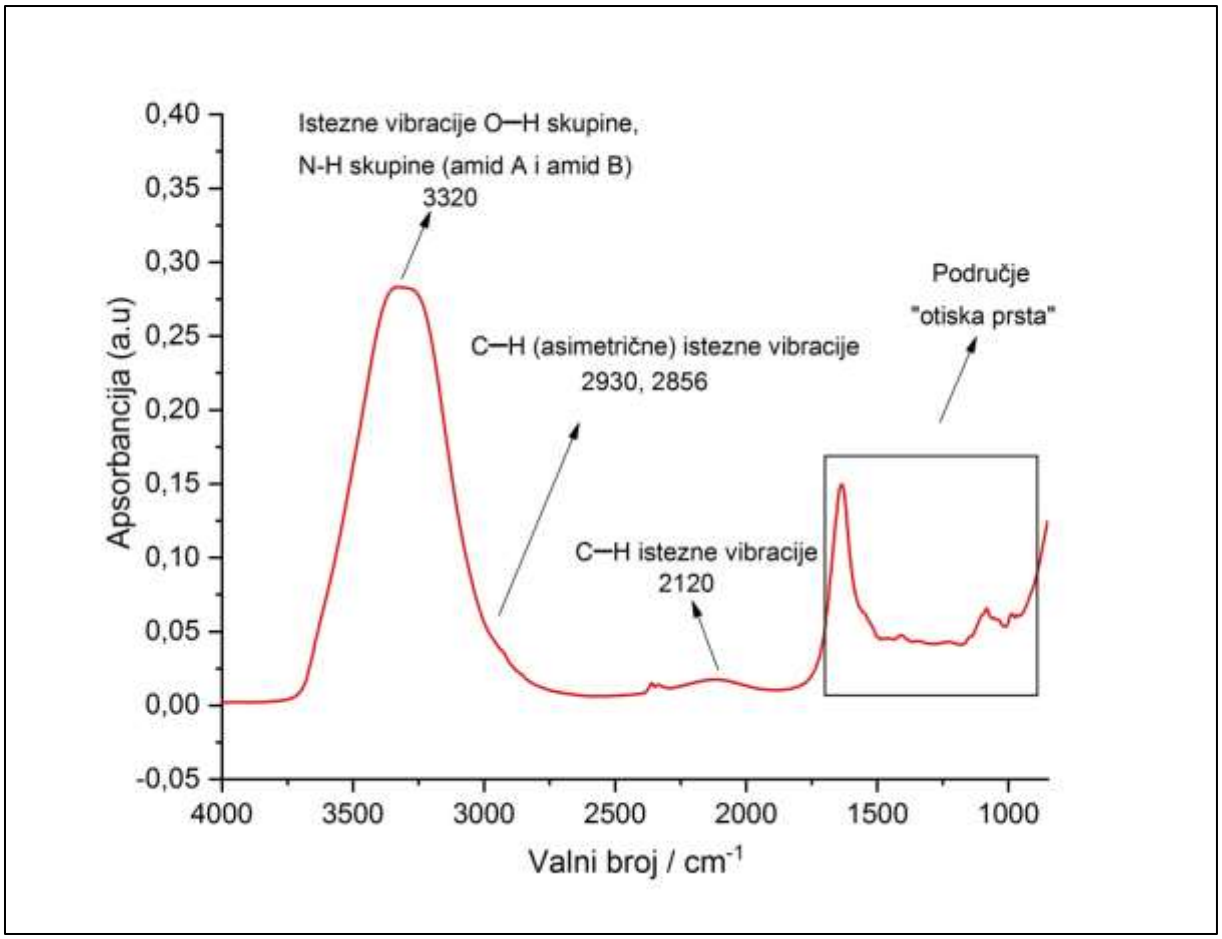
Rezultati prikazani na grafikonu 1. prikazuju karakteristični FTIR-ATR spektar hemolimfe medonosne pčele i pripadajuće temeljne molekulske vibracije, koje su dobivene kao srednji spektar 338 spektara hemolimfe pčela radilica prikupljenih iz pokusnih zajednica. Većinski sadržaj hemolimfe čini voda (90%) u kojoj su otopljene i najzastupljenije sljedeće sastavnice: proteini, lipidi, ugljikohidrati (glukoza, fruktoza, trehaloza), hormoni i enzimi. Tako u karakterističnom IR spektru hemolimfe dominiraju molekulske vibracije spomenutih komponenata sastava hemolimfe (grafikon 1., tablica 2.).

4.1.1. Karakterističan IR spektar hemolimfe pčela

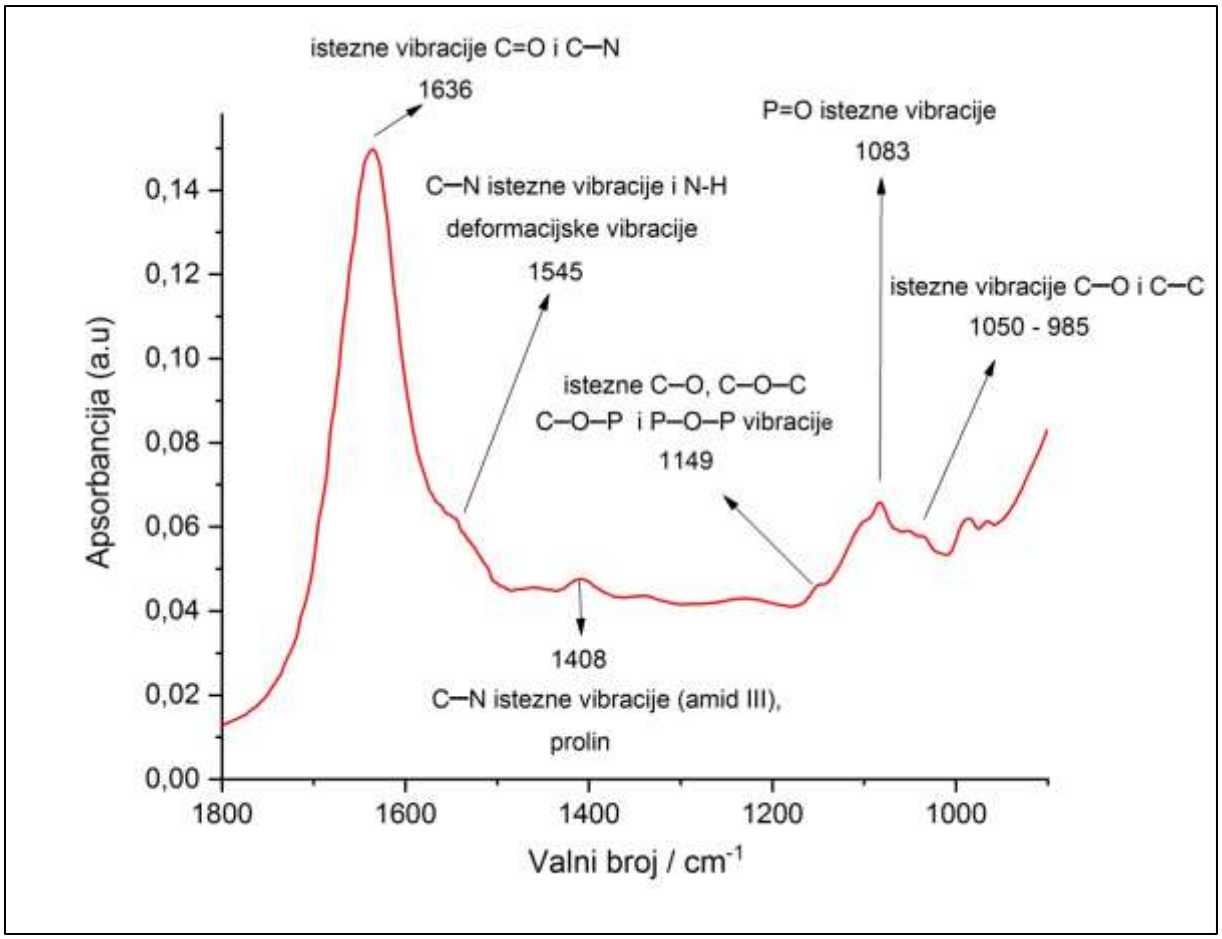
U karakterističnom IR spektru hemolimfe ističe se jaka vrpca s aposrpcijskim maksimumom na 3320 cm^{-1} koja je ujedno i najintenzivnija vrpca u spektru hemolimfe, a javlja se zbog isteznih vibracija O–H hidroksilnih skupina vode i ugljikohidrata. Apsorpcijske vrpce tipične za glukoza javljaju se u području 3123-3410 cm^{-1} (Max i Chapados, 2001.). Obzirom na veliku zastupljenost proteinskih komponenti u hemolimfi pčela, ove se apsorpcijske vrpce vjerojatno preklapaju s N–H isteznim vibracijama u spektralnom području

3500-3300 cm^{-1} (amid A) i na 3100 cm^{-1} (amid B bend) (Kong i Yu, 2007.) koje se mogu pripisati proteinima, enzimima i AMP molekulama. Molekulske vibracije ugljikohidrata i proteina očituju se i u vidu slabih apsorpcijskih vrpci na 2927 i 2856 cm^{-1} (C–H asimetrične istezne vibracije). Široka slaba vrpca koja se nalazi na 2120 cm^{-1} pripada C–H isteznim vibracijama koje se mogu pripisati slobodnim aminokiselinama (Socrates, 2001.).

Područje „otiska prsta“ IR spektra (eng. *fingerprint region*), od 1800-900 cm^{-1} je područje od posebnog značaja u spektroskopskoj analizi hemolimfe jer su u njemu smještene apsorpcijske vrpce lipida, nukleinskih kiselina, masnih kiselina i ugljikohidrata, za koje su vezane najznačajnije spektralne varijacije analiziranih uzoraka hemolimfe. Vibracija srednjeg intenziteta na 1636 cm^{-1} dodjeljena je isteznim C=O i C–N vibracijama (amid I bend) peptida i enzima (globularni proteini). C–N istezne vibracije i deformacijske vibracije N–H skupina (amid II bend) peptida, enzima (globularni proteini) i drugih proteinskih komponenti hemolimfe nalaze se u spektralnom području 1510-1570 cm^{-1}. Prolin kao najzastupljenija aminokiselina u hemolimifi medonosne pčele (Wyatt, 1961; Chen,1985.), u IR spektru hemolimfe zastupljen je s C–N isteznom vibracijom (amid III bend) vibracijom na 1408 cm^{-1}. Spektralno područje vibracija slobodnih masnih kiselina na 1340 cm^{-1} pripada C–H deformacijskim vibracijama, koja se preklapa s C–N isteznim vibracijama (amid III bend). Na području od 1220 do 965 cm^{-1} vidljiva je široka vrpca s apsorpcijskim maksimumom na 1088 cm^{-1} koja se može pripisati P=O isteznim vibracijama nukleinskih kiselina i fosfolipida (Socrates, 2001.). Spektralno područje ugljikohidrata (α-D-glukoza i D- fruktoze) s isteznim C–O i C–C vibracijama nalazi se na 1500 do 600 cm^{-1} (Ibrahim i sur. 2006.) i bendovi hidroksilnih skupina i alkil esterskih veza trehaloze na 1050 cm^{-1} (Kuroiwa, 2015.), koje se preklapa s isteznim vibracijama C–O veza fruktoze na 1051 cm^{-1} i glukoze na 1027 cm^{-1} (Svečnjak, 2015.).



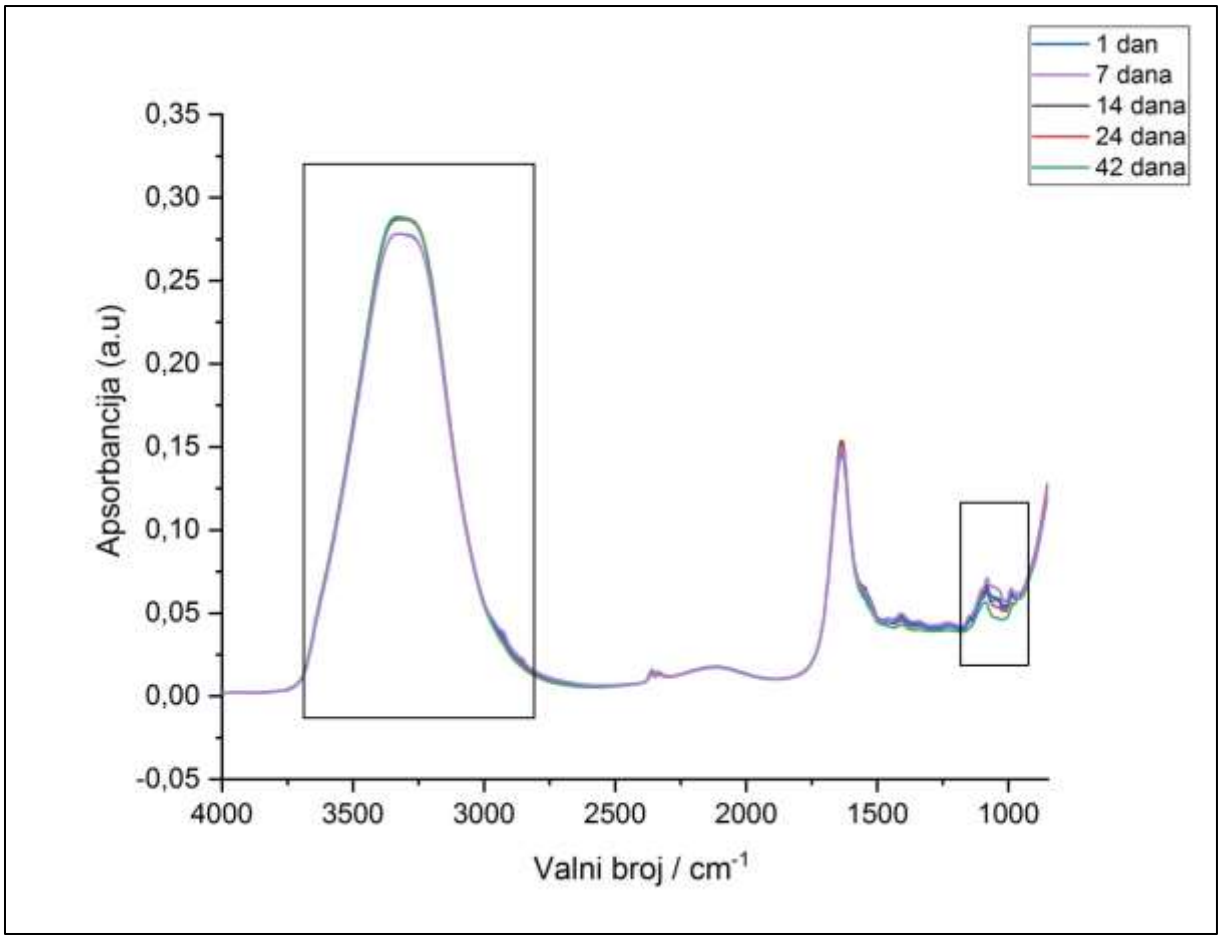
Grafikon 1. Karakterističan infracrveni (IR) spektar hemolimfe s općom asignacijom pripadajućih temeljnih molekulskih vibracija (spektralno područje 4000-600 cm^{-1})



Grafikon 2. Karakterističan infracrveni (IR) spektar hemolimfe s općom asignacijom pripadajućih temeljnih molekulskih vibracija (područje „otiska prsta“: 1800-900 cm^{-1})

4.2.2. Spektralna analiza hemolimfe dobnih skupina pčela

Analizirani su srednji spektri hemolimfe istraživanih dobnih skupina pčela (1, 7, 14, 24 i 42 dana starosti) iz svih pokusnih zajednica kako bi se utvrdilo postoje li razlike u kemijskom sastavu hemolimfe u ovisnosti o dobi pčele. Po dobnoj skupini (osim 42 dana starosti) uzorkovano je od 79 do 81 uzorak hemolimfe. Hemolimfa pčela u dobi 42 dana ekstrahirana je iz jedne pčelinje zajednice (n=18) jer u preostale dvije pokusne zajednice nisu pronađene pčele te dobi. Na grafikonu 3. prikazane su spektralne varijacije između dobnih skupina pčela koje se očituju u vidu različitog intenzitea apsorbancije kemijskih komponenata hemolimfe, ali i prisutnosti, odnosno odsutnosti pojedinih kemijskih sastavnica.



Grafikon 3. Spektralne razlike između srednjih spektara hemolimfe različitih dobnih skupina pčela (cijelo spektralno područje: 4000-600 cm^{-1})

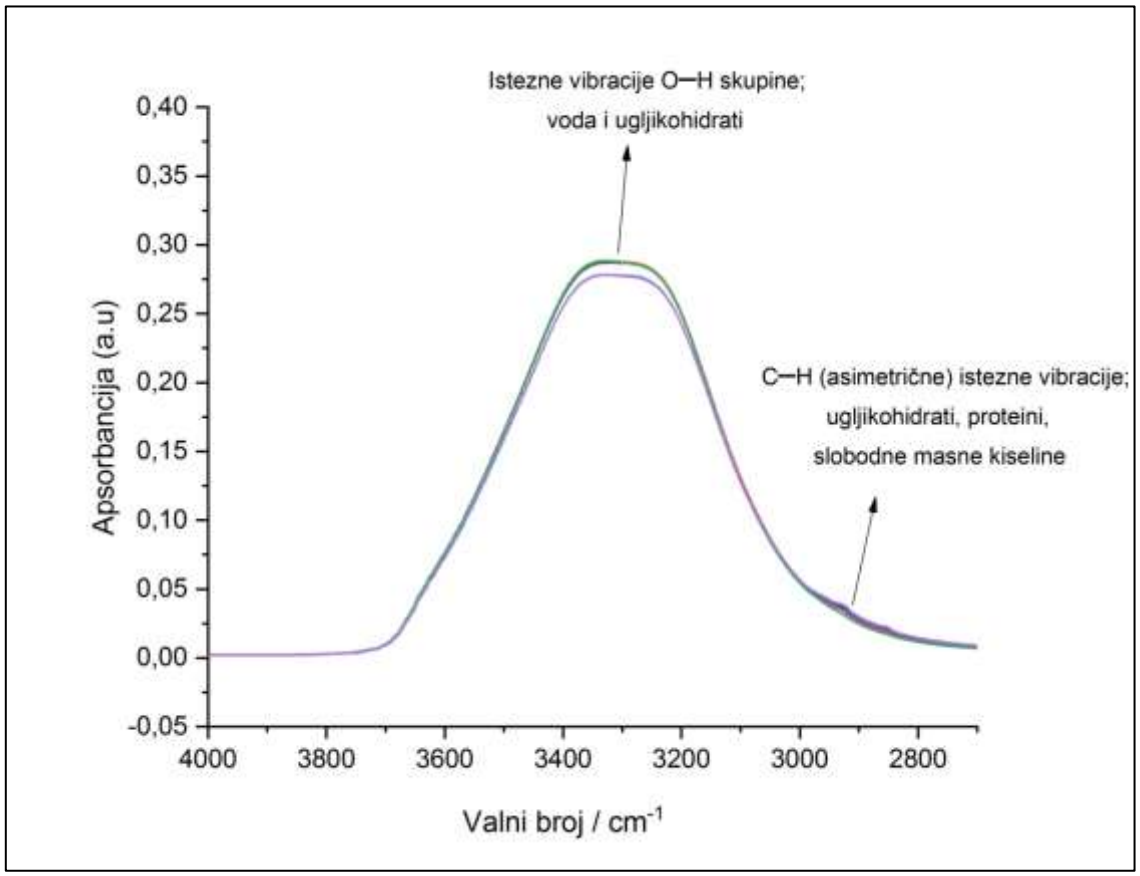
Analizirajući srednje spektre uzoraka hemolimfe istraživanih dobnih skupina pčela uočene su neznatne razlike u spektralnim značajkama, a iste su prikazane u tablici 2.

Tablica 2. Asignacija apsorpcijskih vrpci vibracijama funkcionalnih skupina molekula (sastavnica hemolimfe) i spektralne razlike između hemolimfe različitih dobnih skupina pčela

Apsorpcijski maksimum srednjih spektara	**Položaj apsorpcijske vrpce – valni broj (cm-1) dobne skupine pčela od 1 dan**	**Položaj apsorpcijske vrpce – valni broj (cm-1) dobne skupine pčela od 7 dana**	**Položaj apsorpcijske vrpce – valni broj (cm-1) dobne skupine pčela od 14 dana**	**Položaj apsorpcijske vrpce – valni broj (cm-1) dobne skupine pčela od 24 dana**	**Položaj apsorpcijske vrpce – valni broj (cm-1) dobne skupine pčela od 42 dana**	**Asignacija apsorpcijskih vrpci vibracijama funkcionalnih skupina**	**Sastavnica hemolimfe**
3320	3326	3327	3320	3330	3330	Istezne vibracije OH skupine, N – H istezne vibracije (amid A i amid B)	Voda, ugljikohidrati, proteini, enzimi i AMP moekule
2930	2927	2925	2926	2927	/	C – H asimetrične istezne vibracije	Ugljikohidrati, proteini
2856	/	2854	2856	2854	/	C – H vibracije	Ugljikohidrati, masne kiseline, fosfolipidi, lipoproteini
2120	2120	2120	2120	2120	2120	C – H istezne vibracije	Slobodne aminokiseline
1636	1636	1635	1635	1636	1637	C=O i C – N istezne vibracije (amid I bend)	Peptidi i enzimi (globularni proteini)
1545	1560 1545 1510	1560 1545 1530-1510	1516 1546 1510	1570 1560 1510 1543 1535	1561 1543 1510	Istezne vibracije C – N i N – H (amid II bend)	Peptidi i enzimi (globularni proteini)
1475	1472	1472	1473	1475	1491 1476	C – N istezne vibracije i N – H deformacijske vibracije (amid II), CH3 asimetrične vibracije	Peptidi, enzimi, lipidi
1460	1459	1460	1459	1460	/	C=O istezna vibracija	Prolin, aminokiseline

1408	1409	1409	1408	1407	1405		
1340	1342	1340	1340	1339	1340	C – N istezna vibracija (amid III)	Slobodne masne kiseline
1230	1220	1230	1230	1232	1238	C – N istezna vibracija (amid III)	Lipidne komponente
1149	1149 1102	1150 1101	1150 1100	1148 1110	/ /	C – O i C – O – C istezne vibracije ; C – O –P i P –O – P vibracije	Ugljikohidrati (glukoza i fruktoza); fosfolipidi
1083	1082	1082	1083	1084	1088	P=O istezne vibracije	Fosfolipidi
1050	1051 1035	1052 1036	1050 1036	1050 1035	1049 /	C – O i C – C istezne vibracije	Ugljikohidrati (glukoza fruktoza i trehaloza)
985	991	989	986	983,6	983	C – C istezna vibracija , riboza	Riboza fosfat

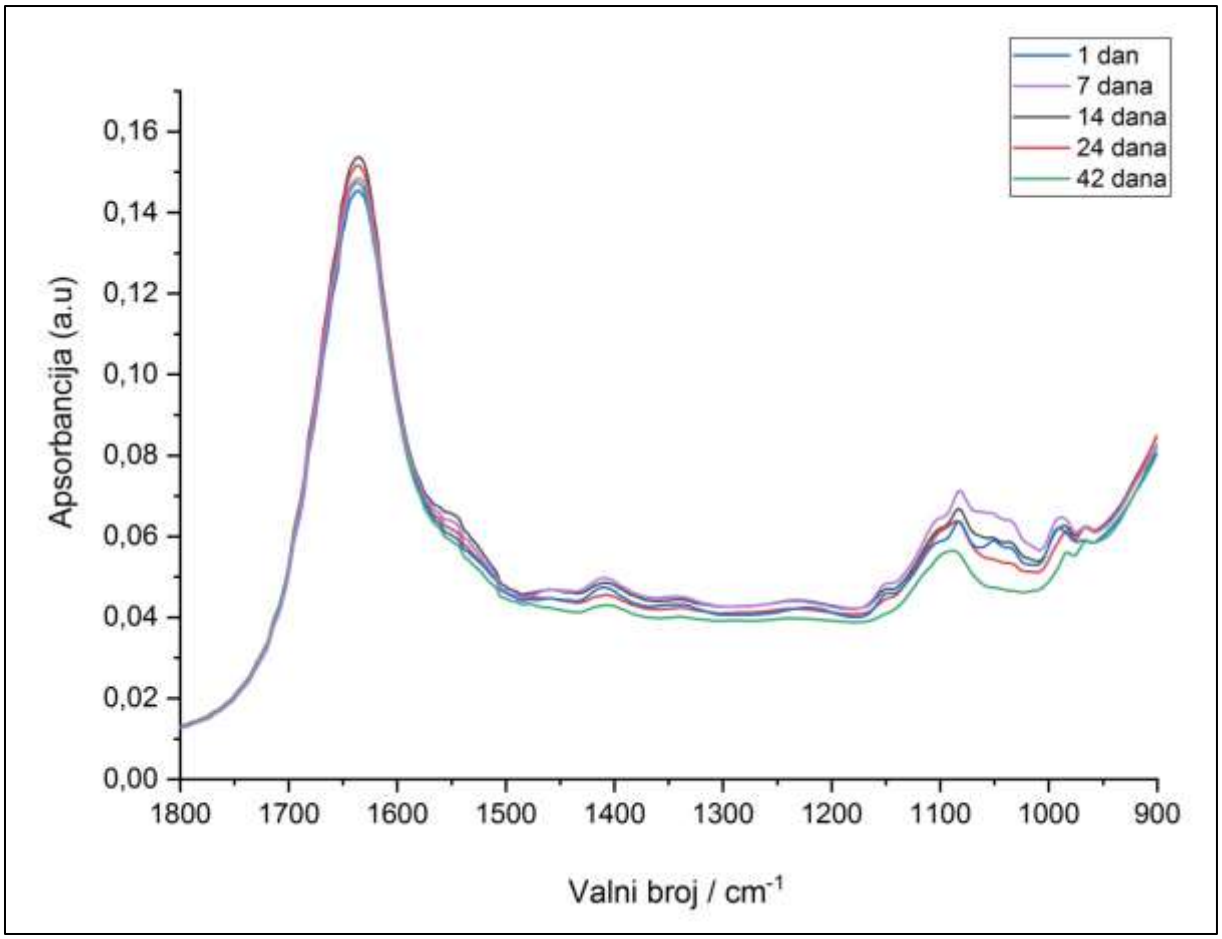
Na grafikonu 4. prikazano je spektralno područje od 4000 do 2700 cm^{-1} u kojem se uočavaju spektralne varijacije u intenzitetu apsorbancije srednjih spektara različitih dobnih skupina pčela. Razlike se očituju u isteznim vibracijama hidroksilnih skupina vode, ugljikohidrata i amida A s aposrpcijskim maksimumom na 3320 cm^{-1}; utvrđeno je kako srednji spektar pčela starosti 1 i 7 dana ima jednak intenzitet apsorbancije (0,278 a.u.) koji je ujedno najniži u odnosu na srednje spektre ostalih dobnih skupina pčela. Najviši intenzit absorbancije utvrđen je u spektrima hemolimfe pčela starosne dobi 42 i 24 dana (0,288), a zatim pčela u dobi od 14 dana (0,267). Također, uočene su razlike u apsorbanciji C–H isteznih vibracija ugljikohidrata, proteina i slobodnih masnih kiselina čiji je intenzitet najviši kod srednjeg spektra hemolimfe pčela starosne dobi 7 dana (0,038), a dok je najniža vrijednost uočena kod pčela starosne dobi 42 dana (0,031). Kvalitativna interpretacija srednjih spektara hemolimfe različitih dobnih skupina pčela, kao i integralne spektralne značajke i varijacije istih, ukazuju na to kako mlade pčele sadrže viši udio isteznih C–H vibracija ugljikohidrata, proteina i slobodnih masnih kiselina, dok hemolimfa starijih sadrži viši udio isteznih vibracija hidroksilnih skupina vode i ugljikohidrata.



Grafikon 4. Spektralne razlike između srednjih spektara hemolimfe različitih dobnih skupina pčela u spektralnom području 4000 do 2700 cm^{-1}

Na području spektra hemolimfe između 1800 i 900 cm^{-1} (područje „otiska prsta)“ možemo uočiti spektralne razlike u intenzitetu apsorbancije srednjih spektara hemolimfe između dobnih skupina pčela (grafikon 5.). Razlike koje se očituju su u isteznim vibracijama C=O i C–N (amid I bend) peptida i enzima (globularni proteini). Najvišu vrijednost postižu pčele starosne dobi 14 dana (0,154), a najnižu pčele od 1 dan (0,145). U spektralnom području C–N isteznih vibracija i N–H deformacijske vibracije (amid II bend) (peptidi, lipidi) situacija je nešto drugačija. Najviši intenzitet srednjeg spektra je kod hemolimfa pčela starosne dobi 14 dana (0,065), dok najniži intenzitet imaju pčele starosne dobi 42 dana (0,057). Na spektralnom području od 1200 do 900 cm^{-1}, uočavaju se spektralne razlike u C–N isteznim vibracija (amid III), C–O i C–O–C isteznim vibracijama (ugljikohidrati) C–O–P , P–O–P vibracije i P=O (fosfolipidi), isteznim C–O i C–C vibracijama (ugljikohidrati). Najviši intenzitet apsorbancije utvrđen je u spektrima hemolimfe pčela starosne dobi 7 dana (0,071). Zatim slijede spektri hemolimfe pčela starosnih dobi 14, 24 i 1 dan, dok najniži intenzitet apsorbancije je u pčela u dobi od 42 dana (0,056).

Iz navedenog možemo zaključiti kako najstarije (42 dana) i najmlađe (1 dan) pčele sadrže niži udio peptida, enzima (globularni proteini), lipida, ugljikohidrata i fosfolipida.



Grafikon 5.

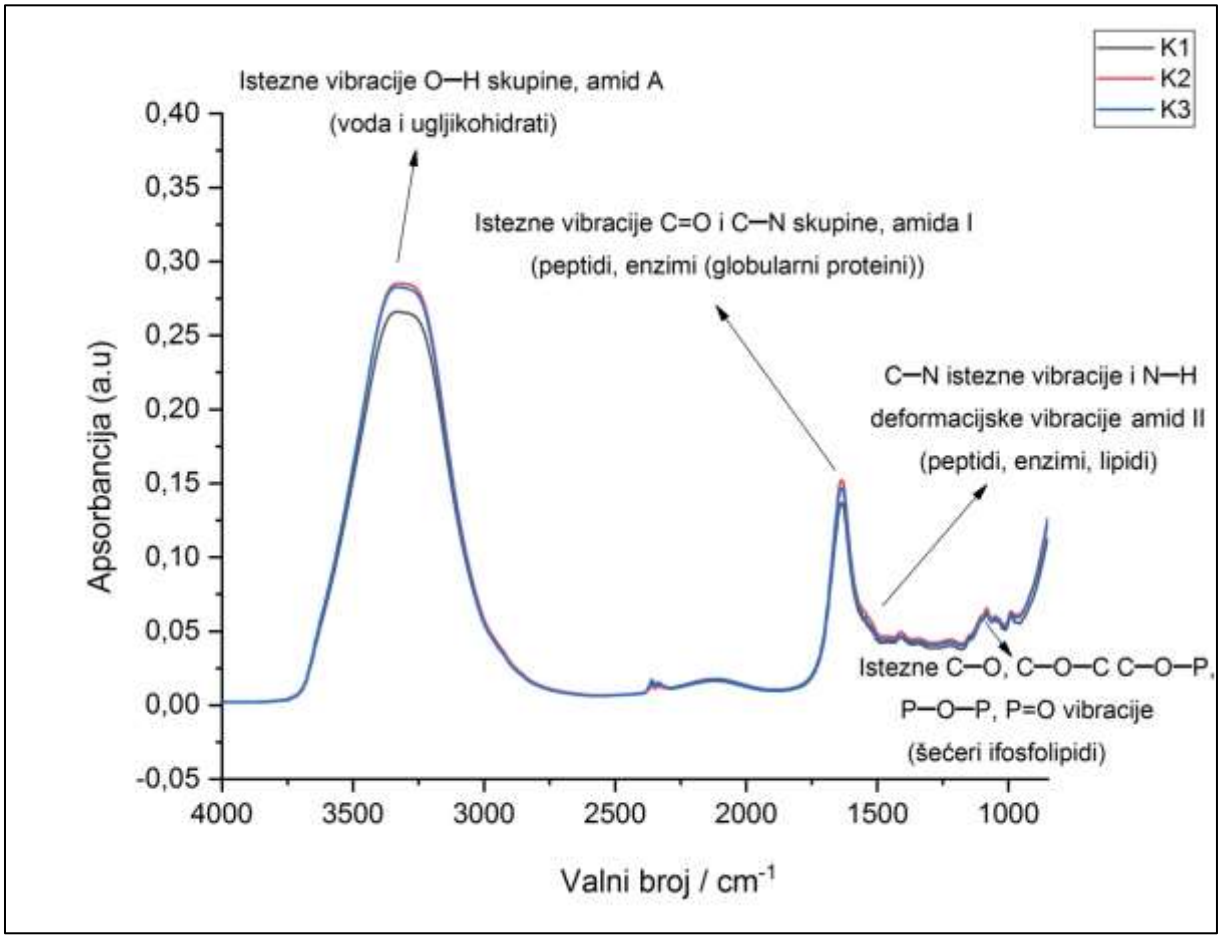
Spektralne razlike između srednjih spektara hemolimfe različitih dobnih skupina pčela u spektralnom području „otiska prsta“ (1800 do 900 cm^{-1})

4.2.2. Spektralna analiza hemolimfe pčela iste dobi iz različitih zajednica

Temeljem analize srednjih spektara uzoraka hemolimfe iste dobi iz različitih pokusnih pčelinjih zajednica (K1, K2 i K3) (n=79-81) utvrđeno je da ne postoje značajne razlike u kemijskom sastavu hemolimfe između pčela iste dobi iz različitih zajednica. Uočene su samo minimalne varijacije u spektralnom intenzitetu apsorbancije apsorpcijskih vrpci, koje su prikazane na grafikonu 6. (1 dan), grafikonu 7. (7 dana), grafikonu 8. (14 dana) i grafikonu 9. (24 dana). Iz grafikona se može vidjeti da pčele koje imaju najviši intenzitet apsorbancije u području peptida, enzima i lipida, imaju najniži intenzitet apsorbancije u području šećera i fosfolipida, izuzev pčela dobi 7 dana. Također utvrđeno je da pčele starosne dobi 14 dana iz

K1, K2 i K3 imaju najmanju spektralnu varijaciju u intenzitetu apsorbancije na čitavom području mjerenja (4000 do 600 cm^{-1}).

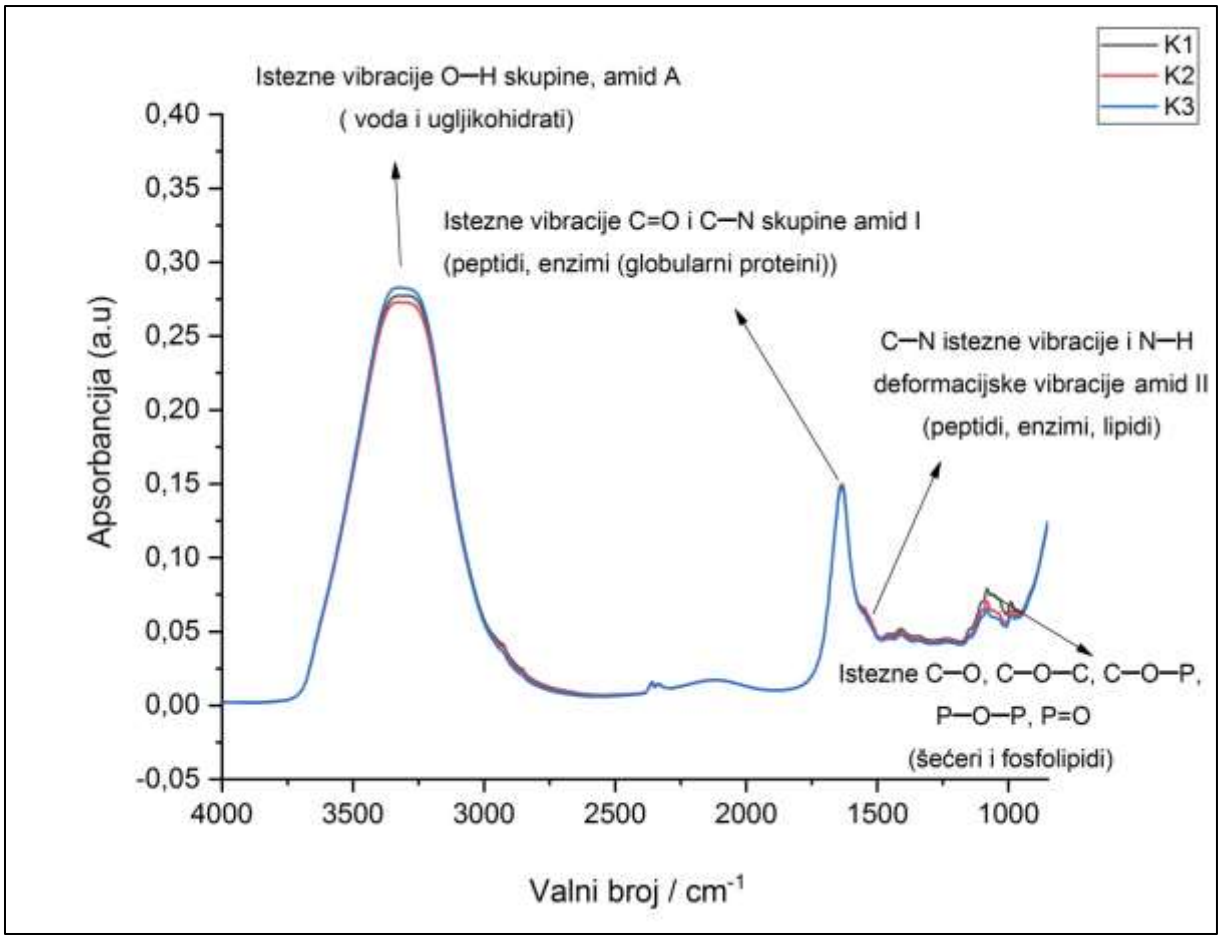
Grafikon 6. prikazuje srednje spektre hemolimfe starosne dobi 1 dan, iz tri pokusne pčelinje zajednice. Vidljivo je da se razlike očituju u intenzitetu apsorbcijskih vrpci na spektralnom području isteznih vibracija OH skupina (vode, ugljikohidrata i amida A), zatim na spektralnom području „otiska prsta“ (1800 i 900 cm^{-1}).



Grafikon 6. Srednji spektri uzoraka hemolimfe pčela starosti 1 dan

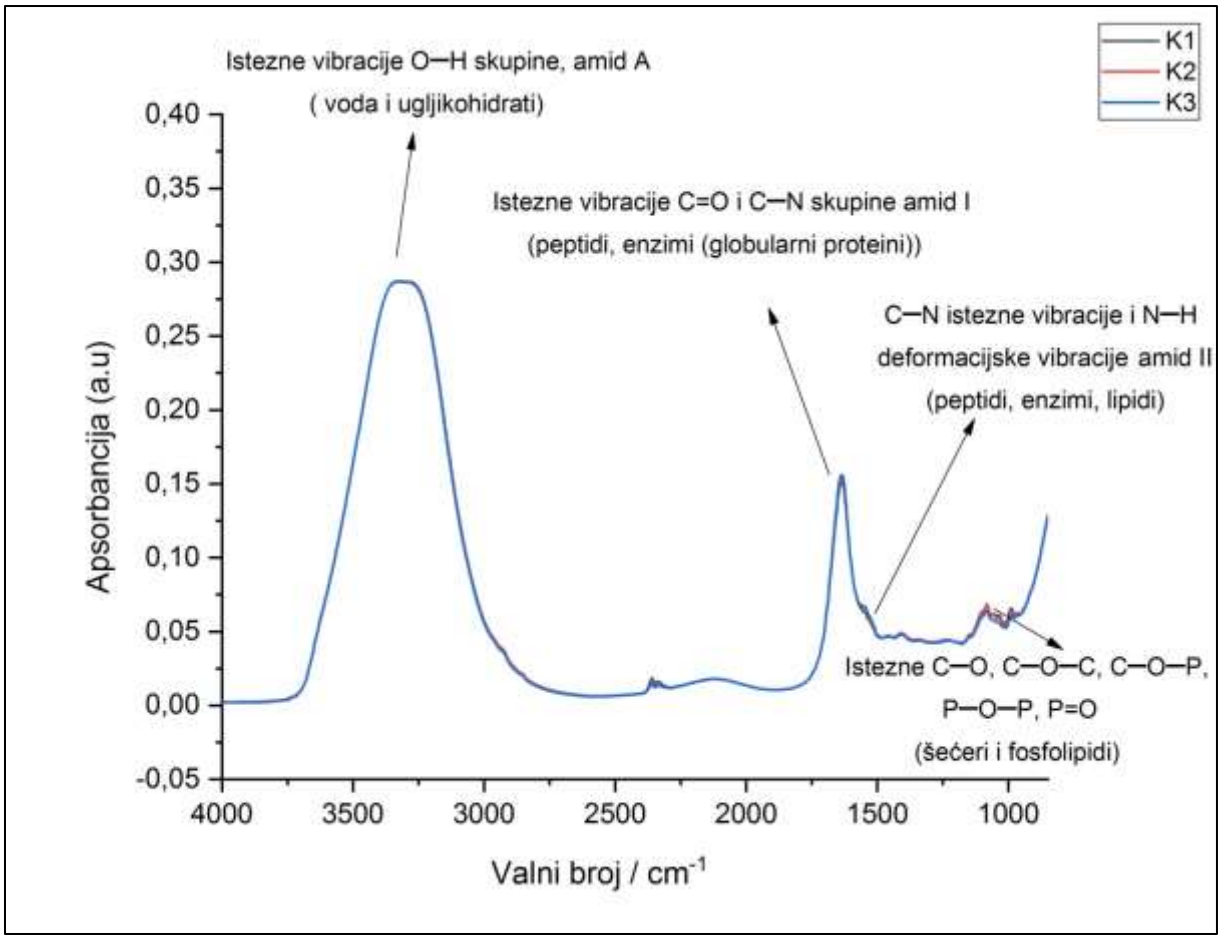
Grafikon 7. prikazuje srednje spektre hemolimfe pčela starosne dobi 7 dana, iz tri pokusne pčelinje zajednice. Iz spektra su vidljive razlike u intenzitetu apsorbcijskih vrpci na spektralnom području isteznih vibracija OH skupina (vode ugljikohidrata i amida A), zatim na spektralnom području „otiska prsta“ (1800 i 900 cm^{-1}).

Zanimljivo je vidjeti da se najizraženija varijacija u intenzitetu apsorbcijskih vrpci nalazi na području od 1150 do 966 cm^{-1}, odnosno na području šećera i fosfolipida.



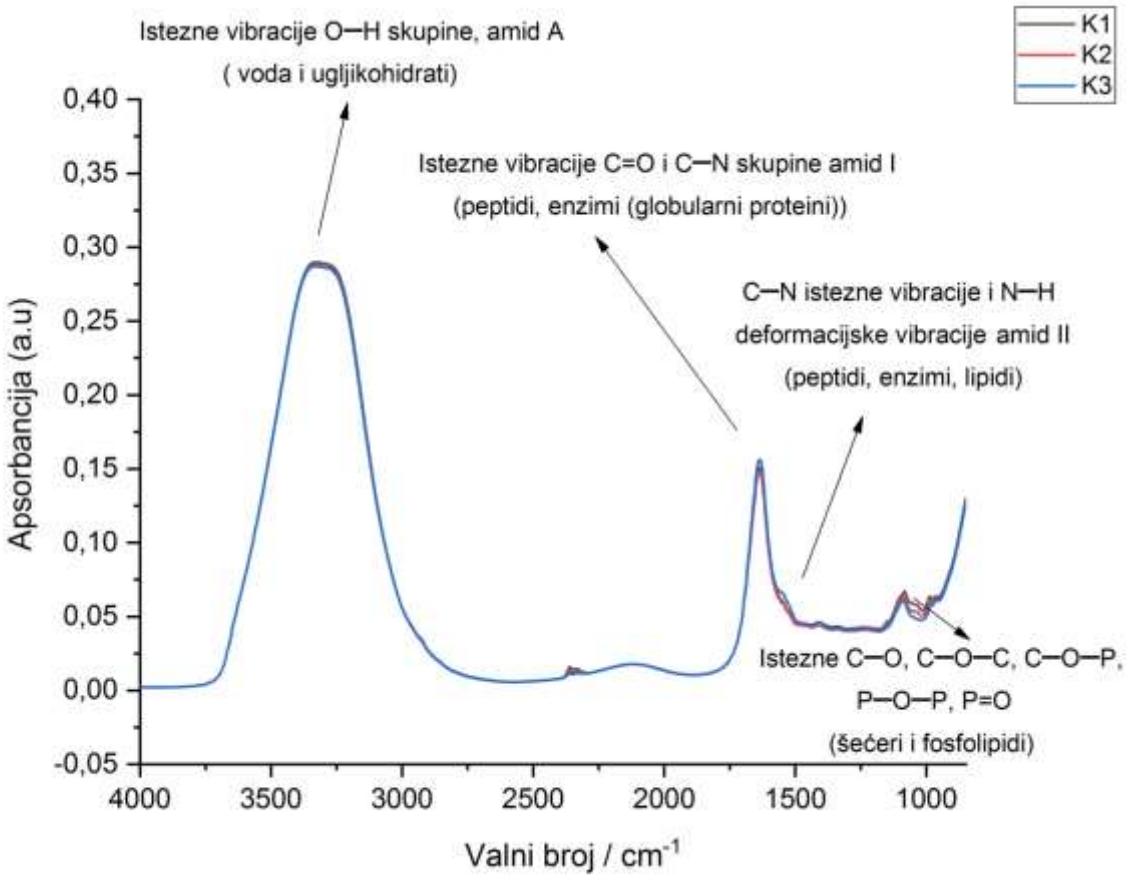
Grafikon 7. Srednji spektri uzoraka hemolimfe pčela starosti 7 dana

Pčele starosne dobi 14 dana pokazuju spektralne varijacije u intenzitetu apsorbancije na području od 1800 do 900 cm^{-1} („područje otiska prsta“), no ona nije jako izražena, što možemo vidjeti na grafikonu 8.



Grafikon 8. Srednji spektri uzoraka hemolimfe pčela starosti 14 dana

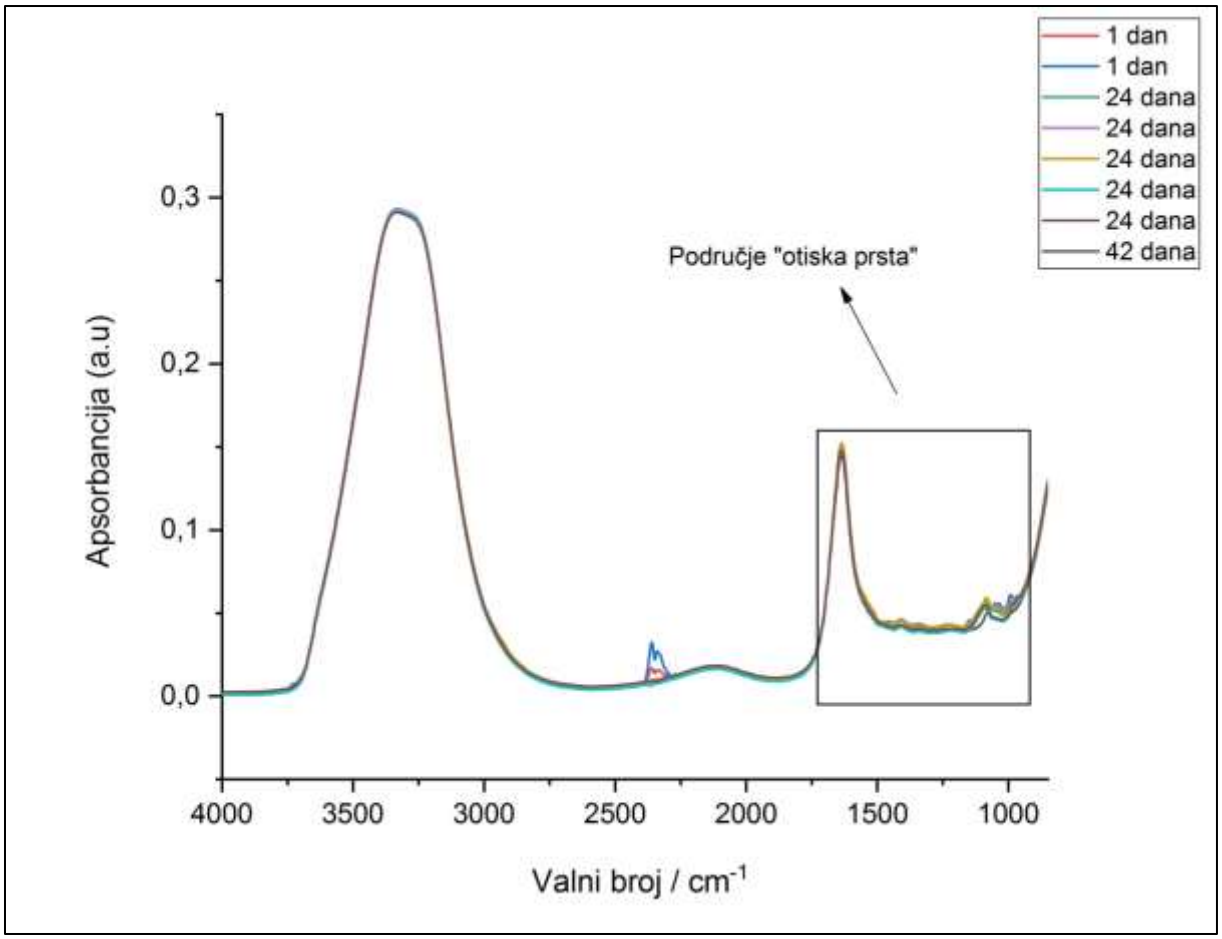
Grafikon 9. prikazuje srednje spektre hemolimfe pčela starosne dobi 24 dana, iz tri pokusne pčelinje zajednice. Iz spektra možemo vidjeti minimalne razlike koje se očituju u nižem integralnom intenzitetu apsorbancije na spektralnom području isteznih vibracija OH skupina, vode, ugljikohidrata i amida A (od 3300-3320 cm^{-1}), zatim na spektralnom području od 1800 i 900 cm^{-1} na kojem se nalaze istezne C=O i C–N vibracije. Najizraženija varijacija u intenzitetu apsorpcijskih vrpci nalazi se na 1635 cm^{-1} (amid I bend) te na 1543 cm^{-1} (amid II bend). Također izraženije varijacije u intenzitetu apsorbcijskih vrpci su od 1150 do 965 cm^{-1}, tj. na području ugljikohidrata i fosfolipida.



Grafikon 9. Srednji spektri uzoraka hemolimfe pčela starosti 24 dana

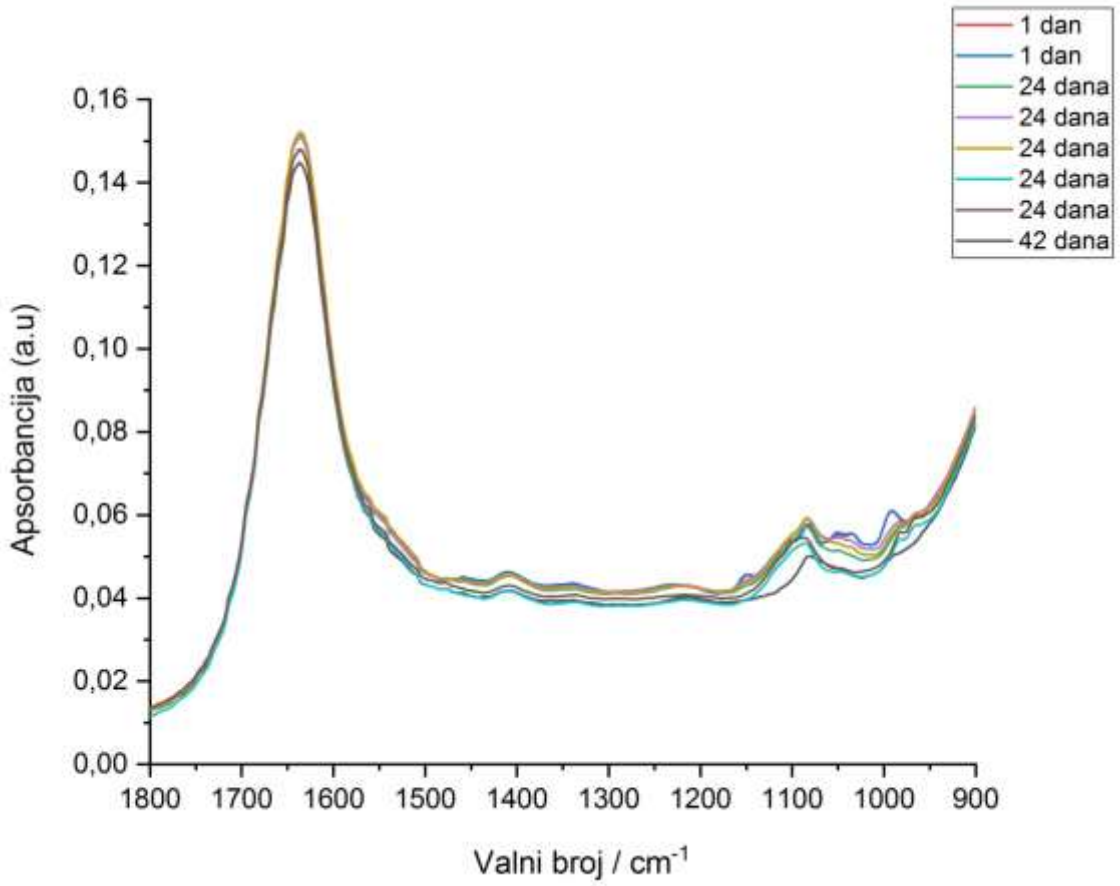
4.2.3. Komparativne spektralne varijacije između hemolimfe trutova i radilica

Analizirano je nekoliko uzoraka hemolimfe trutova različite starosne dobi iz različitih pokusnih pčelinjih zajednica. Na grafikonu 10. prikazani su spektri hemolimfe trutova dobi od 1 dan (n=2), 24 dana (n=5) i 42 dana (n=1); razvidno je kako su intergralne spektralne značajke analiziranih uzoraka hemolimfe podjedanke.



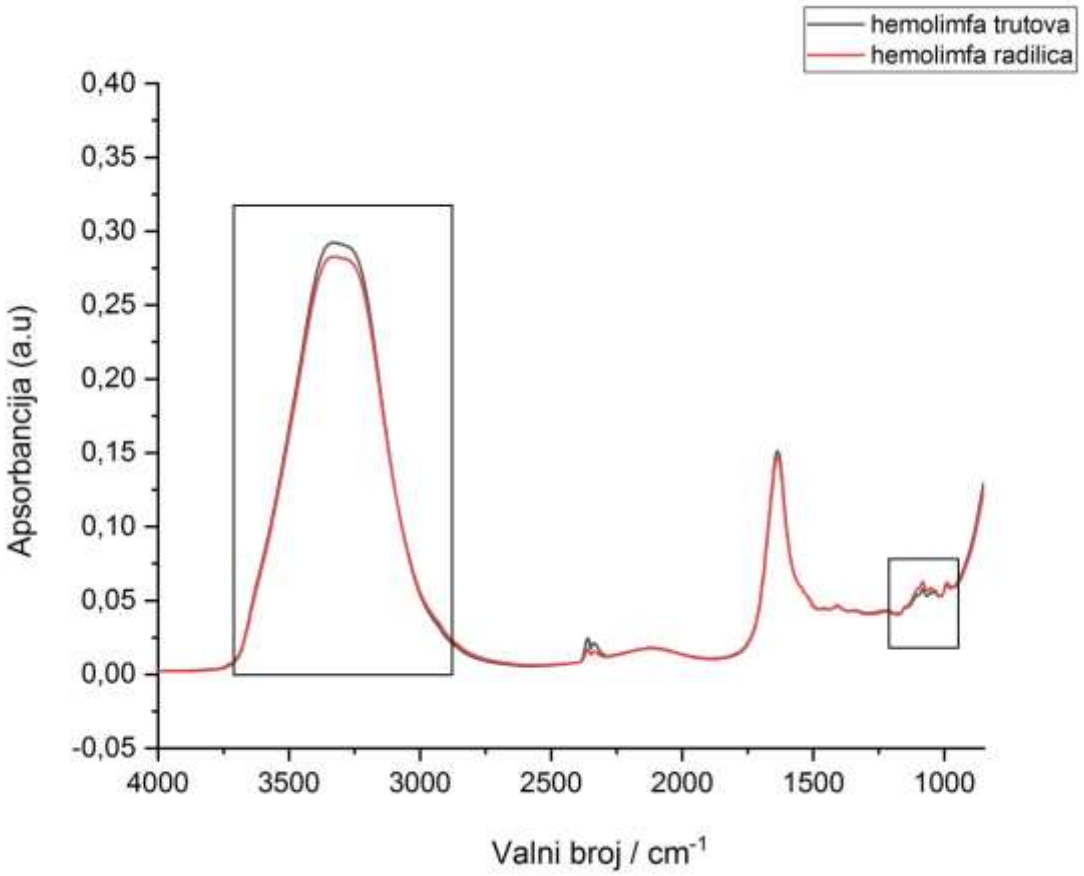
Grafikon 10. Spektri uzoraka hemolimfe trutova u dobi od 1 dan (n=2), 24 dana (n=5) i 42 dana (n=1)

Grafikon 11. prikazuje spektralne varijacije spektara hemolimfe trutova između 1800 i 900 cm^{-1} (područje „otiska prsta“). Spektralne razlike u intenzitetu apsorpcijskih vrpci mogu se uočiti na čitavom području „otiska prsta“, ali su neznatne.



Grafikon 11. Spektri hemolimfe trutova trutova u dobi od 1 dan (n=2), 24 dana (n=5) i 42 dana (n=1) na području „otiska prsta“ (1800-900 cm^{-1})

Spektralne varijacije (grafikon 12.) u uzorcima hemolimfe truta starosne dobi 1 dan (n=2) i srednji spektar hemolimfe pčela radilica iste starosne dobi (n=25) iz iste pčelinje zajednice, ne očituju se u različitoj kemijskoj sastavnici hemolimfe već u intenzitetu apsorpcijskih vrpci. Na grafikonu 12. može se uočiti kako je intenzitet apsorpcijskih vrpci u području isteznih vibracija molekula vode, ugljikohidrata i amida A (3300-3320 cm^{-1}) niža kod pčela radilica u odnosu na trutove. Područje isteznih C=O i C–N vibracija, amid I (peptidi, enzimi (globularni proteini)) je izraženije kod trutova, dok je područje ugljikohidrata i fosfolipida od 1150 do 966 cm^{-1} izraženije kod pčela radilica. Možemo zaključiti da pčele radilice iste starosne dobi od 1 dan imaju viši udio ugljikohidrata i fosfolipida u hemolimfi od trutova.

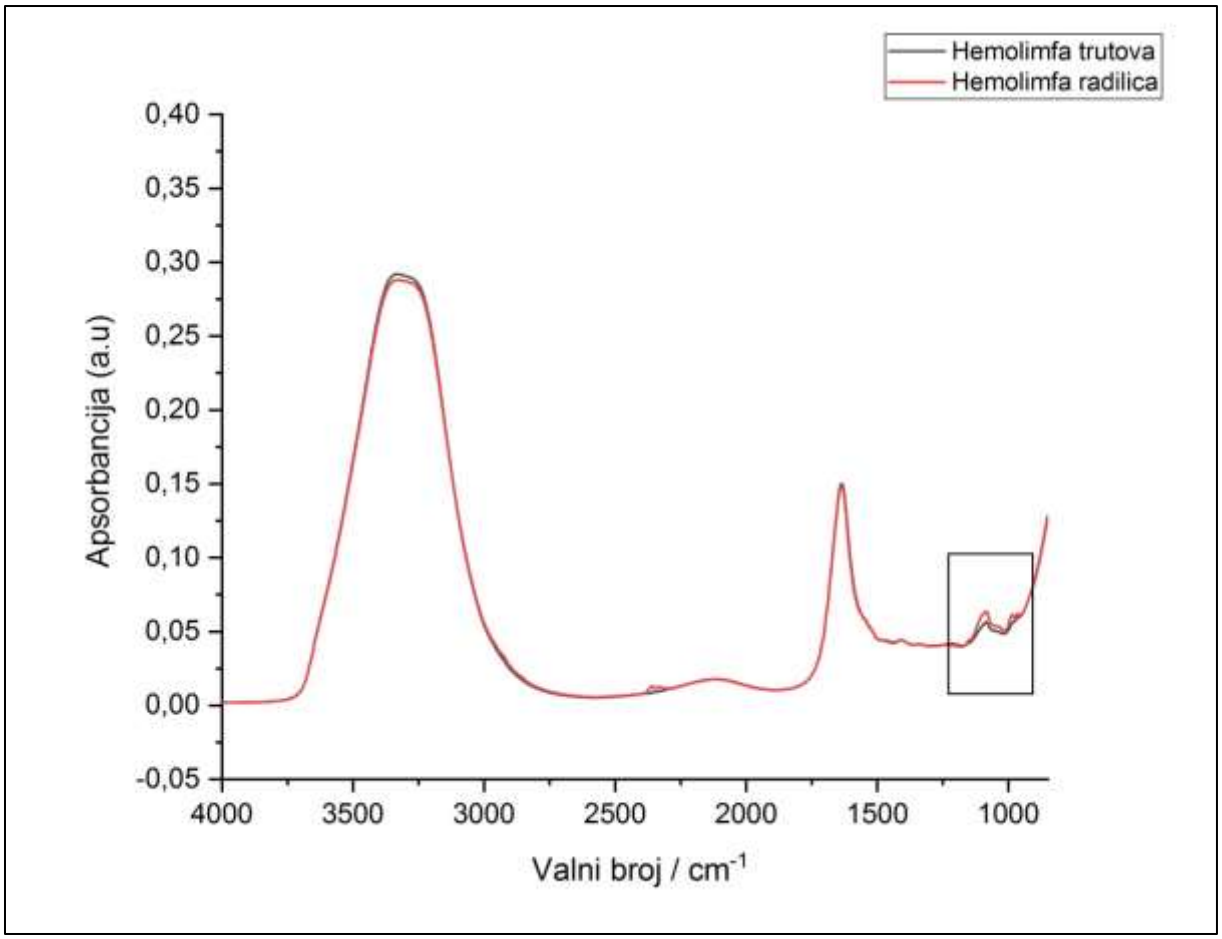


Grafikon 12. Srednji spektri uzoraka hemolimfe trutova u dobi od 1 dan (n=2) i pčela radilica iste dobi iz iste pčelinje zajednice (n=81)

Na grafikonu 13. prikazane su razlike u intenzitetu apsorbcijskih vrpci trutova starosne dobi 24 dana (n=5) i srednjeg spektra hemolimfe pčele radilice iste starosne dobi iz iste zajednice (n=30). Može se uočiti kako na području šećera i fosfolipida pčele radilice imaju izraženiju spektralnu apsorbanciju, odnosno veći udio navedenih sastavnica hemolimfe

Ova bi se opažanja mogla opravdati činjenicom što pčele skupljačice u životnoj dobi od 24 dana skupljaju nektar.

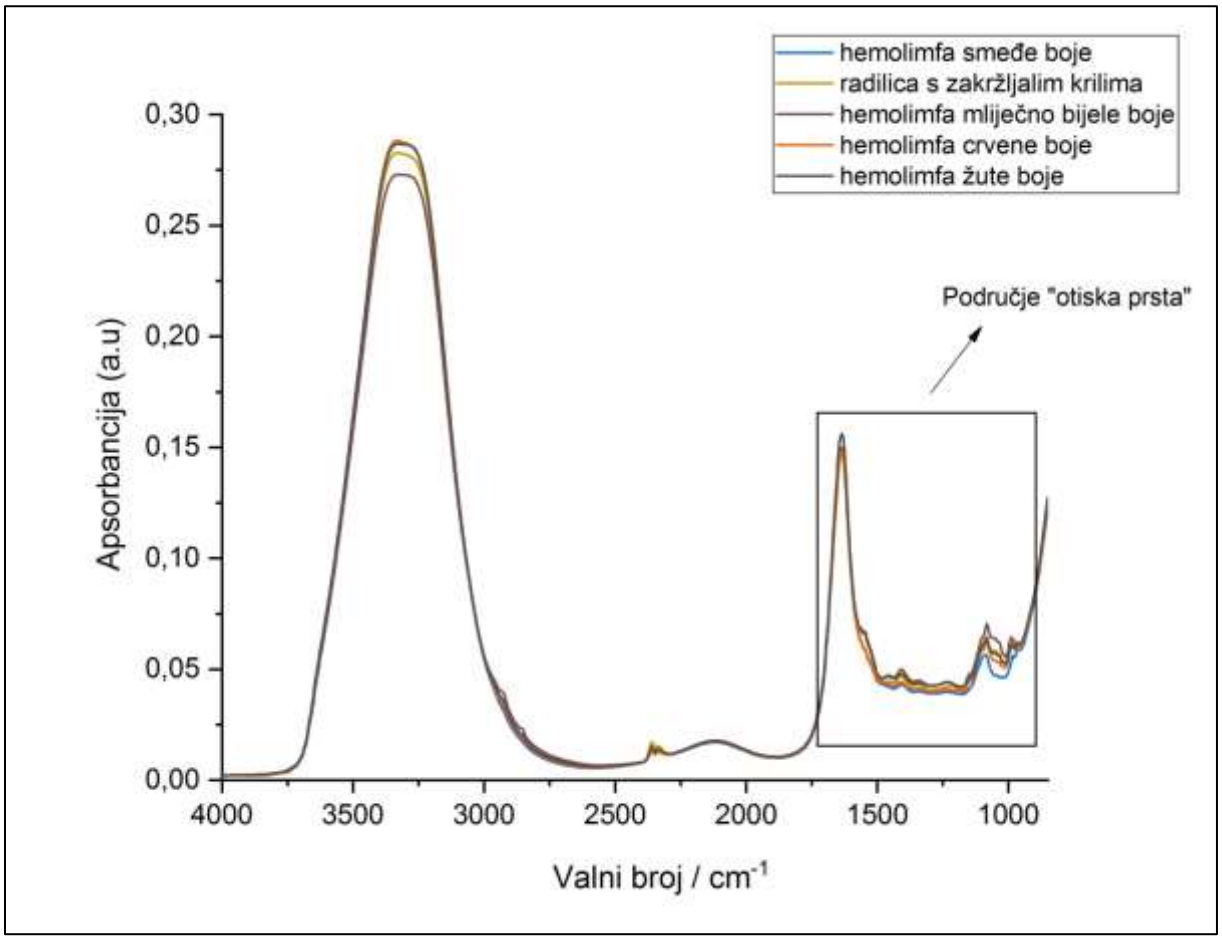
Zbog znantno manjeg broja uzoraka hemolimfe trutova (n=8) u odnosu na broj analiziranih uzoraka hemolimfu pčela radilica iste dobi (n=~80), dobivene bi rezultate trebalo nadograditi dodatnim istraživanjima hemolimfe trutova.



Grafikon 13. Srednji spektri uzoraka hemolimfe trutova starosne dobi od 24 dana (n=5) i i pčela radilica iste dobi iz iste pčelinje zajednice (n=79)

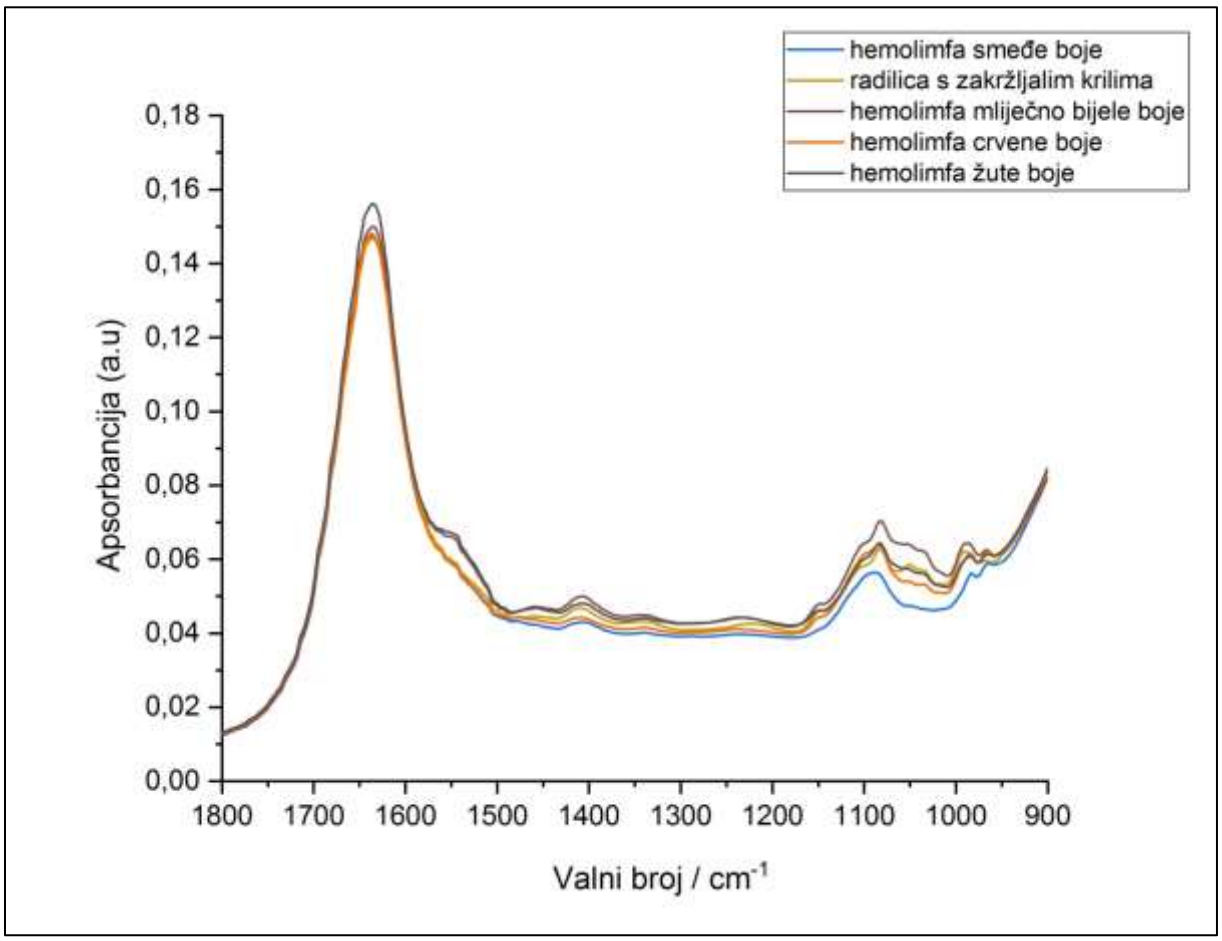
4.2.4. Spektralne značajke atipičnih uzoraka hemolimfe

Tijekom istraživanja analizirano je i nekoliko spektara hemolimfe različitih dobnih skupina pčela koje su se od normalne hemolimfe razlikovale prvenstveno u vizualnom opažanju atipičnih boja hemolimfe. Vizualnim opažanjem uočena je i hemolimfa mliječno bijele boje (n=1) kod pčela starih 7 dana, hemolimfa intenzivno žute boje (n=2) kod pčela starosne dobi 14 dana, zatim hemolimfa crvene boje (n=1) kod pčela starosne dobi 24 dana i hemolimfa smeđe boje (n=3) u pčela starosne dobi 42 dana (n=2) (grafikon 14.). Također, ekstrahirana je hemolimfa pčela sa zakržljalim krillima (n=2) što je tipičan simptom istoimene virusne bolesti pčela (virus deformiranih krila; engl. *Deformed Wing Virus* - DWV). Uz navedeno, snimljen i spektar hemolimfe pčela starosne dobi 42 dana smeđe boje koji je stajao 7 minuta prije analize na ATR ploči FTIR spektrometra (time je ispraila suvišna voda, a istaknule su se molekulske vibracije drugih sastavnica hemolimfe).



Grafikon 14. Spektri atipičnih uzoraka hemolimfe

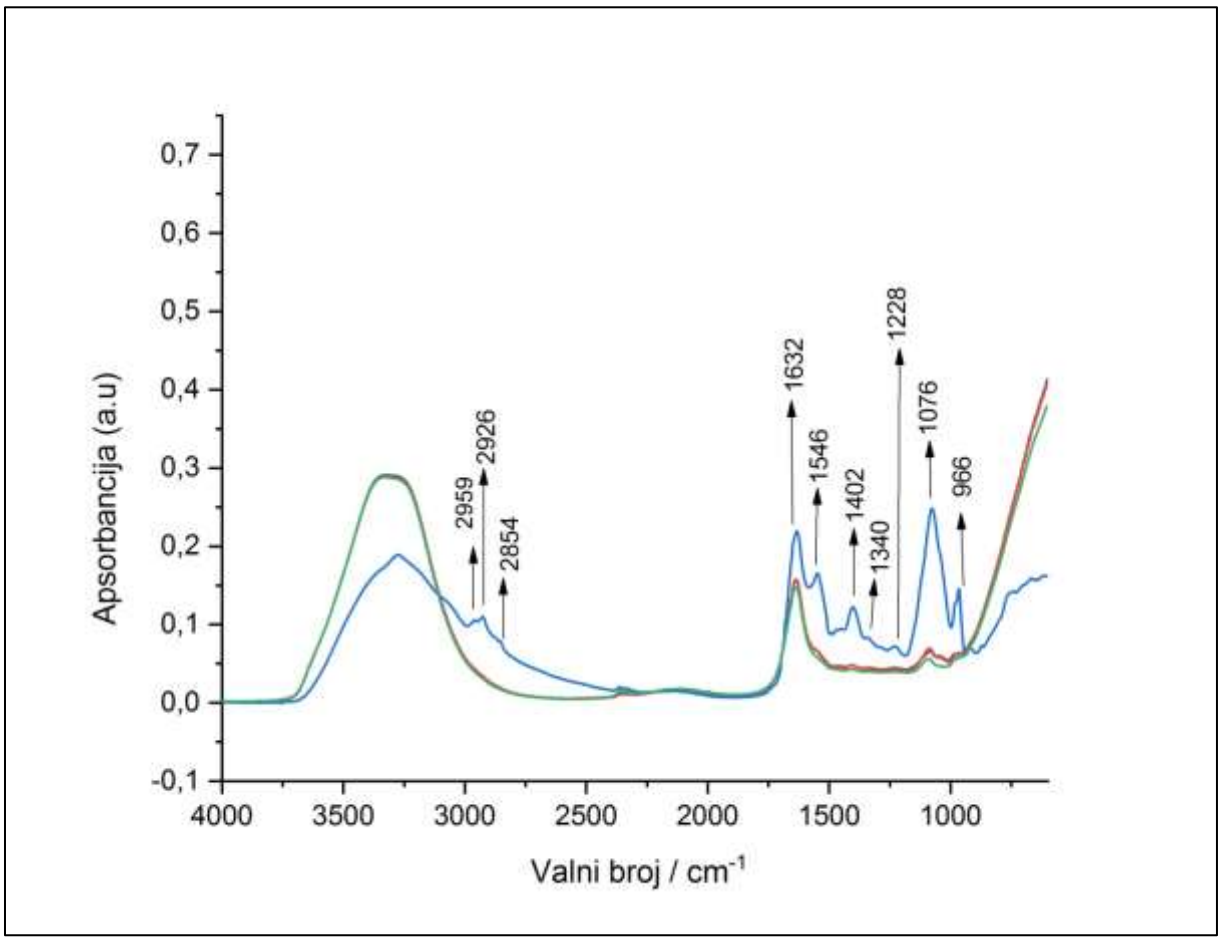
Na grafikonu 15. prikazani su spektri atipičnih uzoraka hemolimfe u području „otiska prsta“ (1800-900 cm-1). Uočene se spektralne varijacije u intenzitetu apsorpcije duž čitavog spektra. U spektralnom području od 1200 do 900 cm^{-1}, uočavaju se spektralne razlike u C–O i C–O–C isteznim vibracijama (ugljikohidrati) C–O–P , P–O–P vibracije i P=O (fosfolipidi), isteznim vibracijama C–O i C–C isteznim vibracijama (ugljikohidrati).



Grafikon 15. Spektar „otiska prsta“ (1800-900 cm^{-1}) atipičnih uzoraka hemolimfe

Na grafikonu 16. zanimljivo je vidjeti usporedbu uzoraka hemolimfa smeđe boje (n=1) starosne dobi 42 dana koji je stajao 7 minuta prije analize na IR spektrometru s dva uzorka hemolimfe smeđe boje koji su analizirani odmah nakon ekstrahiranja hemolimfe i srednje vrijednosti hemolimfe iste starosti. Iz spektra je vidljivo da su vrpce kemijskih sastavnica puno izraženije, odnosno viši je integralni intenzitet apsorbancije. Također, utvrđena je nova kemijska sastavnica na valnom broju 2959 cm^{-1} koja nije nađena kod karakterističnog spektra hemolimfe pčela iste ili različite starosne dobi. Navedeni valni broj pripada C–H asimetričnoj isteznoj vibraciji CH_3 skupine (Socrates, 2001.), što bi u hemolimfi pčele moglo predstavljati

funkcionalnu skupinu amina. Ovom su komparativnom analizom potvrđene molekulske vibracije koje u spektru hemolimfe pripadaju vodi obzirom da je nakon isparavanja vode u spektru hemolimfe uočeni znantno niži intenzitet apsorbancije vrpce na 3320 cm^{-1} koja pripada isteznim vibracijama O–H skupina vode. Također, potvrđeno je i kako spomenuta vrpca preklapa molekulske vibracije proteina koje nakon isparavanja vode dolaze do izražaja.



Grafikon 16. Komparativne spektralne razlike između hemolimfe smeđe boje, srednjeg spektra hemolimfe radilica starosti 42 dana i spektra hemolimfe iste dobi nakon isparavanja

Znanstvena literatura s kojom bi se dobiveni rezultati svih prikazanih IR spektara hemolimfe medonose pčele mogli usporediti nije dostupna, jer kemijska karakterizacija sastavnica „pčelinje krvi“ dobivena FTIR-ATR spektroskopijom nije provedena.

5. Zaključak

Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako hemolimfa pčela daje karakterističan IR spektar u kojem dominiraju apsorpcijske vrpce proteina, lipida, ugljikohidrata (glukoza, fruktoza, trehaloza), enzima.

Temeljem spektralnih varijacija utvrđenih između hemolimfe različitih dobnih skupina radilica i trutova utvrđeno je kako se hemolimfa pčela ovisno o dobi i spolu ne razlikuje kvalitativno, već postoje razlike u udjelu pojedinih komponenata sastava.

Kvalitativna interpretacija srednjih spektara hemolimfe različitih dobnih skupina pčela, kao i integralne spektralne značajke i varijacije istih, ukazuju na to kako mlade radilice (1 i 7 dana starosti) sadrže viši udio proteina i slobodnih masnih kiselina, dok hemolimfa starijih pčela radilica (24 i 42 dana starosti) sadrži više vode i ugljikohidrata.

Spektralnom analizom hemolimfe pčela iste dobi iz različitih zajednica nisu utvrđene značajne spektralne razlike koje bi se mogle povezati s razlikama u sastavu hemolimfe na razini zajednice.

Komparativnom analizom spektralnih varijacija između hemolimfe trutova i radilica utvrđeno je kako hemolimfa pčela radilica iste starosne dobi (1 dan, 24 dana) ima viši udio ugljikohidrata i fosfolipida u odnosu na hemolimfu trutova. Ovim su opažanjem spolne razlike potvrđene, a viši udio navedenih sastavnica može se povezati s poslovima za koje su radilice zadužene u pčelinjoj zajednici, odnosno aktivnošću pojedinih žlijezdi.

Ovim je istraživanjem po prvi puta analizirana hemolimfa pčela metodom infracrvene (IR) spektroskopije, a rezultati istraživanja ukazuju na mogućnost njene primjene za daljnja istraživanja, kao i mogućnost formiranja spektralne zbirke hemolimfe pčela različite dobi i spola (kemijskog "otiska prsta") i postavljanja temeljnjih parametara koji karakteriziraju specifičnu "krvnu sliku" pčela različite dobi i spola. Navedena bi istraživanja trebala biti nadograđena spektralnom analizom hemolimfe matica.

6. Popis literature

1. Abou-Seif M. A. M., Maier V., Fuchs J., Mezger M., Pfeiffer E. F., Bounias, M. (1993). Fluctuations of carbohydrates in haemolymph of honeybee (*Apis mellifica*) after fasting, feeding and stress. Hormone and Metabolic Research, 25, 4-8
2. Arslan A., Standifer L. N., Don, H. (1986). Carbohydrates in honey bee hemolymph. Compa-rative Biochemistry and Physiology, 84B: 363-367
3. Beenakkers A. M. T., van der Horst D. J., van Marrewijk W. J. A. (1985). Biochemical processes directed to flight muscle metabolism. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Pergamon Press: 451-488
4. Blatt J., (2001). Haemolymph sugar homeostasis and the control of the proventriculus in the honeybee (*Apis mellifera carnica* L.). Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg.
5. Bounias M., Morgan M. R. J. (1984a). Adaptation of honeybee haemolymph a-glucosidase to changing physiological requirements by transitions in the hill coefficient. International Journal of Biochemistry, 16: 939-941
6. Bounias M., Morgan M. R. J. (1984b). Haemolymph levels of carbohydrates and sucrase acti-vity in honeybees fed on trehalose. IRCS Medicine Science, 12: 769-770
7. Bounias M (1986). Noradrenaline, propranolol and adrenochrome interactions with the dynamic of haemolymph lipids in worker honeybees. Hormone and Metabolic Research, 18: 804-810
8. Bozic J., Woodring J. (1997). Effect of activity on the haemolymph sugar titres in honey bees. Journal of Apicultural Research, 36: 33-39
9. Bulet P., Stocklin R. (2005). Insect Antimicrobial Peptides: Structures, Properties and Gene Regulation. Protein and Peptide Letters, 12: 3-11
10. Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. (1993). Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antimicrobal peptide that is infection inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). Journal of Biological Chemestry, 268:7044-7054
11. Chan W. T., Howes C. G., Fosters L. J. (2006). Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph. The American Society for Biochemistry and Molecural Biology
12. Chen P. S. (1985). Amino acid and protein metabolism. Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology, 177–217

13. Crailshei, K. and Leonhard B. (1999). Amino acid and osmolarity in honeybee drone haemolymph. Springer – Verlag 17: 195-205
14. Cremonez T. M., De Jong D., Bitondi M. M. G. (1998). Quantification of Hemolymph Proteins as a Fast Method for Testing Protein Diets for Honey Bees (Hymenoptera: *Apidae*). Journal of Economic Entomology 91 (6): 1284-1289
15. De Jong D., Junqueira da Silva E., Kevan P. G., Atkinson J. L. (2009). Pollen substitutes increase honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen. Journal of Apicultural research and Bee World 48(1): 34-37
16. Delaplane K. S., Van der Steen J., Guzman E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of Apis mellifera colonies. In V. Dietemann; J. D. Ellis; P. Neumann (Eds). The COLOSS BEEBOOK, Volume I: Standard methods for Apis mellifera research. Journal of Apicultural Research, 52(1): 1–12
17. El Mohandes S. S., Nafea E. A., Fawzy A. M. (2010). Effect of different feeding diets on the haemolymph of the newly emerged honeybee workers *Apis mellifera* L. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, 3: 213-220
18. Engels W., Kaatz H., Zillikens A., Simoes Z. L. P., Trube A., Braun R., Dittrich F. (1990). Honey bee reproduction: vitellogenin andbcaste-specific regulation of fertility. In: Hoshi, M., Yamashita, O. (Eds.), Advances in Invertebrate Reproduction, vol. 5.:495–502
19. Evans J. D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J. L., Jiang H., Kanost M., Thompson G. J., Zou Z., Hultmark D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees Apis mellifera. Insect Molecular Biology 15 (5): 645–656
20. Fell R. D. (1990). The qualitative and quantitative analysis of insect hemolymph sugars by high performance thin - layer chromatography. Comparative Biochemistry and Physiology, 95A: 539-544
21. Geisler G., Steche W. (1963). Natürliche Trachten als Ursache für Vergiftungen bei Bienen und Hummeln. Zeitschrift für Bienenforschung, 6: 77-92
22. Gmeinbauer R., Crailsheim K. (1993). Glucose utilisation during flight of honeybee (Apis mellifera) workers, drones and queens. Journal Insect Physiology 39:959 - 967
23. Günzler H., Gremlich H.-U. (2006). Uvod u infracrvenu spektroskopiju. Preveli Meić Z., Baranović G. Školska knjiga. Zagreb
24. Herbert, E. W. 1992. Honey bee nutrition, pp. 197Ð233. In J. M. Graham [ed.], The hive and the honey bee. Dadant, Hamilton, IL

25. Higashiyama T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. Pure Appl. Chem., Vol. 74 (7): 1263–1269
26. Ibrahim M., Alaam M., El-Haes H., Jalbout A. F., de Leon A. (2006). Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. Ecletica. Volume 31: 3
27. Kezić N., Bubalo D., Grgić Z., Dražić M., Barišić D., Filipi J., Jakopović I., Krakar D., Palčić – Jakopović K., Ševar M., Tretinjak V. (2011). Konvencionalno i ekološko pčelarenje. Interna skripta, Zagreb
28. Kong J., Shaoning Y. (2007). Fourier Transform Infrarared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. Acta Biochimica et Biophysica Sinica,39(8): 549 – 559
29. Kuroiwa T., Kimura K., Aoki Y., Neves M. A., Sato S., Mukataka S., Kanazawa A., Ichikawa S. (2015). Quantitative Evaluation of the Effects of Moisture Distribution on Enzyme-Induced Acylation of the Trehalose in Reduced-Moisture Organic Media. Journal of Food Research, Vol 4:5
30. Leta M. A., Gilbert,C., Morse R. A. (1996). Levels of Hemolymph Sugars and Body Glycogen of Honeybees (*Apis mellifera* L.) from Colonies Preparing to Swarm. J. Insect Physiol. Vol. 42(3):239 – 245
31. Locke M. (1997). Caterpillars have evolved lungs for hemocyte Gas exchange. Journal Insect Physiology. 44: 1-20
32. Marringa W. J., Krueger M. J., Burritt N. L., Burritt J. B. (2014). Honey Bee Hemocyte Profilling by Flow Cytometry. PloS ONE 9(19)
33. Maurizio A. (1965). Untersuchungen über das Zuckerbild der Hämolymphe der Honigbiene (Apis mellifica L.)- I. Das Zuckerbild des Blutes erwachsener Bienen. Journal of Insect Physiology, 11: 745-763
34. Max J. J. and Chapados C. (2001). Surcose Hydrates in Aqueous Solution by IR Spectroscopy. Journal of Physical. Chemistry. 105: 10681 – 10688
35. Michelette E and Engels W. (1995). Concentration of hemolymph proteins during postembryonic worker development of Africanized honey bees in Brazil and Carniolans in Europe. Apidologie. 26: 101-108
36. Panzenbock U., Crailsheim K. (1997). Glycogen in honeybee queens, workers and drones (Apis mellifera carnica Pollm.). Journal Insect Physiology 43(2):155-165
37. Pavia D., Lampman G., Kriz G., Vyvyan J. (2009). Incroduction to spectroscopy, fourth edition. Academic cengage, Belmont, USA

38. Pčelina školica, portal za male pčelare. https://pcelinaskolica.wordpress.com/ucionica/strucna-predavanja/ (pristupljeno 1.rujna, 2019.)
39. Piulachs M. D., Guidugli K. R., Barchuk A. R., Cruz J., Simoes Z. L. P., Belles X. (2003). The vitellogenin of the honey bee, Apis mellifera: structual analysis of the cDNA and expression studies. Insect Biochemistry and Molecural Biology 33: 459-465
40. Rosch G. A. (1925). Untersuchungen fiber die Arbeitsteilung im Bienenstaat. I. Teil: Die Tfitigkeiten im normalen Bienenstaate und ihre Beziehungen zum Alter der Arbeitsbienen. Z Vergl Physiology 2:571-631
41. Schmidt O. (2008). Insect Immune Recognition and Suppression. Insect Molecular Biology, School of Agriculture, Food and Wine, University of Adelaide, Glen Osmond, SA 5964, Australia
42. Sinitzky N., Lewtschenko I. (1971). Der Gehalt an Eiwei und freien Aminosiuren in der Hfimolymphe der Arbeitsindividuen der Honigbiene. 23th Intern. ApimondiaCongre Moskau, 361-367
43. Socrates G. (2001). Infared and Raman Characteristic Group Frequencies. John Wiley & Sons Ltd.West Sussex, England
44. Svečnjak L. (2016). Hemolimfa i „krvna slika“ pčela. Hrvatska pčela 2: 53-56
45. Svečnjak L., Baranović G., Vinceković M., Prđun S., Bubalo D., Tlak Gajger I. (2015). An approach for routine analytical detection of beeswax adulteration using FTIR-ATR spectroscopy. Journal of Apicultural Science. 59(2): 37-49
46. Svečnjak L., Laurino D., Zimmermann B., Biliškov N., Prđun S., Bubalo D. (2012). An infrared insight into honeybee (*Apis mellifera* L.) haemolymph: analytical potentials. Book of abstracts 5th European Conference of Apidology - EurBee 5. Halle an der Saale, Njemačka, 3.-7. 09. 2012. p. 199
47. Szolderits M. J., Crailsheim K. (1993). A comparison of pollen consumption and digestion in honeybee (*Apis mellifera carnica*) drones and workers. Journal Insect Physiology 39(10): 877- 881
48. Trenczek T, Zillikens A and Engels W. (1989). Developmental patterns of vitellogenin hemolymph titer and rate of synthesis in adult drone honey bees (Apis mellifera). Journal of Insect Physiology. 35: 475-481
49. van Engelsdorp D. & Pettis J. S. (2014). Colony collapse disorder. U: Bee health and veterinarians (ed. Ritter, W.). OiE, Philadelphia.

50. Wang D., Moller F. (1970). Comparison of the free amino acid composition in the haemolymph of healthy and Nosema infected female honeybees. Journal Invert Pathol 15: 202-206
51. Wheeler DE, Kawooya JK. (1990). Purification and characterization of honey bee vitellogenin. Archives of Insect biochemistry and Physiology. 14: 253-267
52. Wu Y. W., Sun S. Q., Zhao J., Li Y., Zhou Q. (2008). Rapid discrimination of extracts of Chinese propolis and poplar buds by FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. Journal of Molecular Structure. 883-884: 48-54
53. Wyatt G. R., Davey K.G. (1996). Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. Advances. Insect Physiology. 26: 1–155
54. Zakaria M. E. (2007). Factors Affecting On The Food Metabolism In Some Honey Bee Races. Journal of Applied Sciences Research, 3(4): 311-316
55. Zillikens A. (1985). Age and juvenile hormone-dependent vitellogenin syntesis in imaginal honey bee drones. Apidologie. 16: 237-238

Životopis

Jelena Horvatinec rođena je 18. 12. 1991. u Zagrebu. Pohađala je Glazbenu školu Jastrebarsko, završila XV. matematičku gimnaziju u Zagrebu, završila prediplomski studij Biljnih znanosti.

Govori i razumije izvrsno engleski i dobro španjolski jezik. Zastupnica je Zagrebačkog orkestra ZET- a, članica predsjedništva i voditeljica svih projekata orkestra na državnoj i međunarodnoj razni. U 2016. g. Zagrebački orkestar ZET-a dodjelio joj je prizanje za izniman doprinos, podršku u radi i ostvarenju ciljeva orkestra, a 2018. g. Hrvatski sabor kulture ju je odlikovao s brončanom diplomom za 10-godišnji uspješan rad na širenju i razvijanju hrvatske kulture. Posjeduje praktično znanje iz poljoprivredne djelatnosti pčelarstvo s kojom se i privatno bavi. Svira orkestralnu flautu, piccolo flautu i saksofon. Bavi se pisanjem aranžmana i izvođenjem tradicijske glazbe Balkana, s daškom Arabije, koja je ritmički i harmonijski obogaćena primjesama modernog svijeta. Surađivala je i sudjelovala kao članica u aktivnostima folklornog ansambla hrvatske vojske „Petar Zrinski“, Limene glazbe „Sijač“ Lučko, KUD-a sv. Jana, Primavara kvarteta i Etno udruge Vuge.