



# **Jämförelse av patogenprevalens hos vilda humlor på olika avstånd från honungsbisamhällen**

Och skillnader i patogenförekomst mellan olika arter av kommersiella pollinerare

---

Julia Carlsson

Självständigt arbete • 15 hp

Sveriges lantbruksuniversitet, SLU

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap • Institutionen för ekologi

Biologi och miljövetenskap

Uppsala 2023



# Jämförelse av patogenprevalens hos vilda humlor på olika avstånd från honungsbisamhällen

*Och skillnader i patogenförekomst mellan olika arter av kommersiella pollinerare*

Julia Carlsson

**Handledare:** Joachim Rodrigues de Miranda, SLU, Institutionen för ekologi  
**Bitr. handledare:** Liam Kendall, Lunds universitet, CEC  
**Examinator:** Åsa Berggren, SLU, Institutionen för ekologi

**Omfattning:** 15 hp  
**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E  
**Kurstitel:** Självständigt arbete i Biologi  
**Kurskod:** EX0894  
**Program/utbildning:** Biologi och miljövetenskap  
**Kursansvarig inst.:** Institutionen för vatten och miljö  
**Utgivningsort:** Uppsala  
**Utgivningsår:** 2023  
**Upphovsrätt:** Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.

**Nyckelord:** *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, vilda pollinerare, patogenprevalens

**Sveriges lantbruksuniversitet**

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap

Institutionen för ekologi

## Sammanfattning

Idag minskar den inhemska populationen av pollinerare till följd av klimatförändringar och urbanisering. För att bibehålla den livsviktiga pollineringen används bland annat samhällen av honungsbin (*Apis mellifera*), vilket antas kunna påverka de vilda humlorna negativt genom exempelvis konkurrens om resurser och patogenspridning. I denna studie var syftet att undersöka hur prevalens av elva patogener som är vanligt förekomna hos bin skiljde sig mellan vilda humlor på olika avstånd från honungsbisamhällen, hos honungsbin och hos jordhumlor. De tre grupperna jämfördes därefter med varandra. Hypotesen var att prevalensen skulle vara högre för virus hos honungsbin medan övriga patogener var högre hos humlor. Vidare förväntades prevalensen vara högre av virusen hos de vilda humlorna närmast honungsbisamhällena.

Förekomsten jämfördes med 36 stycken honungsbin för att undersöka potentialen att arten är spridningskälla för att därefter jämföra prevalensen mellan två avståndsintervall (0 – 500 meter respektive 1000 – 2000 meter) ifrån bikuporna. Vidare användes 37 kommersiella jordhumlor (*Bombus terrestris*) för att jämföra med honungsbins prevalens för att detektera skillnader mellan patogenförekomst hos olika arter av kommersiella pollinerare.

Genom att använda 169 bin extraherades RNA och DNA från samtliga prover för att undersöka frekvensen av respektive patogen genom RT-PCR.

Resultatet från studien kunde inte påvisa en signifikant skillnad i prevalens av samtliga patogener hos vilda humlor närmast honungsbisamhällena i jämförelse med dom längre ifrån. Skillnaden i prevalens var dock signifikant högre för Black queen cell virus (BQCV), Lake Sinai virus 1-4 (LSV1-4), *Apicystis*, *Crithidia* och *Sphaerularia bombi* hos honungsbin i jämförelse med vilda humlor, medan prevalensen var 0 % av SBPV (Slow bee paralysis virus) hos honungsbin men förekom hos de vilda humlorna. Mellan jordhumlor och honungsbin var skillnaden i prevalens signifikant högre för LSV1-4 och *Sphaerularia* hos honungsbin medan skillnaden var signifikant högre hos jordhumlorna av patogenerna *Crithidia* och SBPV. I flera studier har viruset DWV visat kunna spridas mellan honungsbin och humlor, men i och med att DWV saknades i samtliga individer kunde inget sådant samband undersökas.

Nyckelord: *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, vilda pollinerare, patogenprevalens

## Abstract

The population of wild pollinators has declined due to climate changes and urbanization. To maintain the vital pollination of pollination-dependent crops, imported colonies of honeybees (*Apis mellifera*) are used, which is assumed to influence the wild population negatively by competition of resources and spreading of pathogens. The purpose of this study was to determine how the prevalence of eleven common pathogens differed within wild bumblebees from different distances from honeybee colonies, but also in honeybees and bumblebees. The three groups were then compared with each other to detect differences in prevalence of pathogens. The hypothesis for this study was that the prevalence should be higher among honeybees for viruses, while the rest of the pathogens are higher in the bumblebees. It was also expected that the prevalence of the viruses was higher for the wild bumblebees nearest the honeybees.

36 honeybees and 96 wild bumblebees (*Bombus pascuorum* and *Bombus sylvarum*) were used in the comparison and the wild bees were sorted into two groups: those collected 0 – 500 meters from the colonies and those found 1000 – 2000 meters from the hives. Furthermore, 37 commercial bumblebees (*Bombus terrestris*) were used to see differences between two species of commercial bees in terms of pathogen prevalence.

By using 169 bees, RNA and DNA were extracted from the samples to detect the frequency of all pathogens by the technique RT-qPCR.

The result did not show any significant difference of prevalence between wild bumblebees nearest the hives in comparison with those further away. The result did show that it was a significant higher prevalence of the pathogens Black queen cell virus (BQCV), Lake Sinai virus (LSV1-4), *Apicystis*, *Crithidia* and *Sphaerularia bombi* in honeybees while the occurrence of SBPV (Slow bee paralysis virus) was 0 % in honeybees but did occur in wild bees. Between commercial bumblebees and honeybees, the difference in prevalence was significant higher for LSV1-4 and *Sphaerularia* in honeybees, while the difference was significantly higher of the pathogens SBPV and *Crithidia* in commercial bumblebees. In several studies, the DWV has been shown to be able to be spread between honeybees and wild bumblebees, but because the prevalence was zero for all groups of bees, no such conclusion could be drawn from this study.

Keywords: *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, wild pollinators, pathogen prevalence

# Innehållsförteckning

<b>Tabellförteckning</b> .....	<b>8</b>
<b>Figurförteckning</b> .....	<b>9</b>
<b>Förkortningar</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Inledning</b> .....	<b>11</b>
1.1 Bakgrund .....	11
1.2 Syftet .....	12
<b>2. Material och metod</b> .....	<b>13</b>
2.1 Proverna .....	13
2.1.1 Projektet "Fysiobin 2022" .....	13
2.1.2 Insamlade bin .....	13
2.2 Patogener .....	14
2.2.1 Vad är en patogen .....	14
2.2.2 Virus .....	14
BQCV (" <i>Black queen cell virus</i> ") .....	15
ABPV (" <i>Acute bee paralysis virus</i> ") .....	15
SBPV (" <i>Slow bee paralysis virus</i> ") .....	15
SBV (" <i>Sacbrood virus</i> ") .....	16
DWV (" <i>Deformed wing virus</i> ") .....	16
CBPV (" <i>Chronic bee paralysis virus</i> ") .....	16
LSV1-4 (" <i>Lake Sinai virus</i> ") .....	16
2.2.3 Protozoer .....	17
<i>Nosema</i> .....	17
<i>Chrithidia</i> .....	17
2.2.4 Nematoder .....	18
<i>Sphaerularia bombi</i> .....	18
2.3 Dissekering och homogenisering .....	18
2.4 Extraktion av RNA .....	19
2.5 Extraktion av DNA .....	20
2.6 Kontrollerandet av renhet av DNA och RNA .....	21
2.7 RT-PCR.....	22
2.7.1 cDNA syntes (omvänd transkription).....	22
2.7.2 RT-PCR.....	23

2.7.3 Statistiska Analyser .....	25
<b>3. Resultat .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>31</b>
<b>Referenser .....</b>	<b>34</b>
<b>Tack 37</b>	
<b>Bilaga 1 .....</b>	<b>38</b>
<b>Bilaga 2 .....</b>	<b>39</b>
<b>Bilaga 3 .....</b>	<b>40</b>
<b>Bilaga 4 .....</b>	<b>41</b>

# Tabellförteckning

Tabell 1: Sekvenserna (forward och reversed) för samtliga primers för detektering av patogenerna. RNA250 och pJET1.2 fungerade som passiva kontroller för att kontrollera kvaliteten på proverna inför RT-PCR. 24



# Figurförteckning

Figur 1: Skillnad i prevalens av elva patogener mellan honungsbin och vilda humlor på ett avstånd av 0 - 500 meter från utsatt bikupa. För SBQV, BQCV, SBV, LSV1-4, Crithidia, Apicystis och Sphaerularia var skillnaden signifikant mellan grupperna. ....	27
Figur 2: Skillnad i patogenprevalens av elva patogener mellan honungsbin och vilda humlor på ett avstånd av 1000 - 2000 meter från samhällen av honungsbin. För SBPV, BQCV, SBV, LSV1-4, Crithidia, Apicystis och Sphaerularia var skillnaden signifikant. ....	28
Figur 3: Skillnaden i patogenprevalens hos vilda humlor på avstånden 0 - 500 och 1000 - 2000 m från honungsbisamhället. Det fanns ingen signifikant skillnad mellan grupperna för någon av patogenerna. ....	29
Figur 4: Patogenprevalens hos honungsbin och jordhumlor (kommersiella). Skillnaden i patogenförekomst var signifikant för patogenerna SBPV, LSV1-4, Crithidia och Sphaerularia. ....	30
Figur 5: Amplifieringskurvor för Crithidia. Gröna kurvorna är vilda humlor och de röda kurvorna är positiva kontroller. ....	38
Figur 6: Amplifieringskurva för Crithidia. Lila kurvorna visar förekomst hos jordhumlor medan de röda kurvorna är positiva kontroller. ....	39
Figur 7: Amplifiering av Crithidia. Mörkröda kurvor är förekomsten hos honungsbin och de röda kurvorna är positiva kontroller. ....	40
Figur 8: Smältpunktstoppar för proverna. För samtliga prover är smältpunkten vid 85 grader vilket tyder på att inget av resultaten var falskt. ....	41

## Förkortningar

ABPV	Acute bee paralysis virus
BQCV	Black queen cell virus
CBPV	Chronic bee paralysis virus
cDNA	Complementary DNA
DWV	Deformed wing virus
LSV	Lake Sinai virus
RT-qPCR	Real time quantitative polymerase chain reaction
SBV	Sacbrood virus
SBPV	Slow bee paralysis virus

# 1. Inledning

## 1.1 Bakgrund

Pollinering är essentiell för människans matproduktion och majoriteten av växterna tar hjälp av insekter för pollenöverföringen (Borgström et al. 2018). Humlor och bin är bland de viktigaste pollinatörerna på grund av deras effektivitet och är därför viktiga komponenter inom jordbruket. Emellertid minskar andelen pollinerande insekter drastiskt till följd av bland annat jord- och skogsbruksintensifiering, utbyggnad av urbana områden och klimatförändringar (Pedersen et al. 2020). I många fall placeras därför kommersiella humlor och honungsbin ut i landskapen för att bibehålla den viktiga ekosystemtjänsten. I och med utplacering av nya arter i landskap uppstår istället nya hot för de vilda humlorna, bland annat konkurrens om föda och ökad patogenförekomst. Det finns nämligen sjukdomar som förekommer hos både honungsbin och humlor, men hur dessa patogener överförs och om de kan överföras mellan olika arter är inte helt klarlagt (Ocepek et al. 2021).

De vanligast förekomna patogenerna som återfinns hos humlor är *Apicystis bombi*, *Crithidia bombi*, *Nosema bombi* och *Sphaerularia bombi* (Nanetti et al. 2021) medan virusjukdomar som DWV (Deformed wing virus), ABPV (Acute bee paralysis virus), BQCV (Black queen cell virus), SBV (Sacbrood bee virus) och LSV (Lake Sinai virus) främst är förknippade med honungsbin. Samtliga patogener har dock detekterats hos både humlor och honungsbin i tidigare studier, vilket har föranlett en oro hos forskare om huruvida kommersiella honungsbin kan öka förekomsten hos de vilda bestånden (Nanetti et al. 2021).

Eftersom de vilda bina redan står inför ett flertal hot så är det av stor vikt att inte orsaka fler hot, och därav krävs reglering av hur importering av honungsbin sköts och regler kring vad som ska göras i fall av smitta (Bernhardsson et al. 2020). I Sverige har vi idag en lag för hantering av bisjukdomar (SFS 1974:211) med en tillhörande förordning (SFS 1974:212) som beskriver alla regler och bestämmelser kring bihälsa för att minska smittspridningen av sjukdomar hos humlor och bin.

Bevakningen av bihälsa sker på lokal, regional och nationell nivå. På nationell nivå är det Jordbruksverket som har hand om arbetet med att detektera

smittspridning hos honungsbin. Deras arbete går bland annat ut på att besluta om att smittförklara områden och utbilda både länsstyrelserna och tillsynsmännen som jobbar med bihälsa. Det är sju av Sveriges länsstyrelser som har hand om den regionala bitillsynen för samtliga län i Sverige och deras uppgift är att utse hur stora tillsynsdistrikten ska vara och tillsätta tillsynsmän. Tillsynsmännen jobbar på en lokal nivå och de jobbar med praktiskt arbete för bevakning av bisjukdomar inom olika distrikt. Exempelvis är det tillsynsmännen som tar prover för att fastställa sjukdom vid misstänkt smitta och de har även rätt till att besluta om förflyttning eller om bisamhället ska förintas om sjukdom kunnat detekteras (Jordbruksverket 2022).

Vidare har Europeiska kommissionen beslutat att alla medlemsländer är skyldiga att ha ett nationellt referenslaboratorium för bihälsa vilket ledde till att Sveriges lantbruksuniversitet utsågs till detta här i Sverige. Deras uppgift är att diagnostisera prover som kommer in till laboratoriet och då i första hand de anmälningspliktiga sjukdomarna amerikans yngelröta, varroakvalster och trakékvalster (Lundmark u.å.).

## 1.2 Syftet

Syftet med studien var att undersöka hur patogenförekomsten skiljde sig mellan vilda humlor beroende på närvaron av kommersiella honungsbin. En hypotes var att prevalensen av virus skulle vara högre hos honungsbin än hos vilda humlorna, medan patogener i form av protozoer och nematoder skulle vara högre hos humlorna. Prevalensen av virusen antogs dessutom vara högre hos vilda humlor som befann sig närmare honungsbin än de som hittades längre bort.

Vidare undersöktes även skillnader i patogenförekomst hos kommersiella *Apis mellifera* och *Bombus terrestris*. Detta för att jämföra hur patogenförekomsten skiljer sig åt mellan olika arter som lever i kolonier. Precis som för vilda humlor var hypotesen att prevalensen skulle vara högre för virussjukdomar hos honungsbin medan jordhumlor istället skulle ha en högre prevalens av de övriga patogenerna.

För att testa hypoteserna genomfördes realtids-PCR test av insamlade honungsbin, vilda humlor och jordhumlor. De vilda humlorna var kategoriserade i två avståndsintervall ifrån de utplacerade honungsbina för att undersöka hur närvaron av honungsbin möjligen kunde påverka prevalensen hos de vilda humlorna.

## 2. Material och metod

### 2.1 Proverna

#### 2.1.1 Projektet "Fysiobin 2022"

Proverna som har använts till detta projekt kommer från ett större projekt genomfört 2022. Centrum för miljö- och klimatforskning vid Lunds universitet fick i uppdrag av Jordbruksverket att studera honungsbins påverkan på vilda bin ur ett landskapsekologiskt perspektiv. Studien syftade till att studera hur tätheten av honungsbisamhällen och avståndet från dessa samhällen påverkade reproduktionsförmågan hos vilda bin (Bernharsson et al. 2022). Alla bin samlades in från åtta landskap lokaliserade i Skåne. De var klassade som betesmark eller slåtteräng i Jordbruksverkets blockdatabas. I varje landskap sattes samhällen med honungsbin ut vid en punkt med känd koordinat. På avstånd 0, 500, 1000 och 2000 meter från dessa honungsbisamhällen placerades 1) humlekolonier av mörk jordhumla (*Bombus terrestris*) och 2) bihotell för solitära bin för att detektera tätheten av individer vid dessa olika avstånd.

#### 2.1.2 Insamlade bin

Totalt användes 176 individer från kolonier, bihotell och inventeringar från tidigare beskrivna projektet. Av de insamlade individerna var 40 stycken honungsbin (*Apis mellifera*), 39 mörka jordhumlor (*Bombus terrestris*), 38 stycken haghumlor (*Bombus sylvarum*) och 60 stycken åkerhumlor (*Bombus pascuorum*). Hos samtliga analyserades patogenförekomst av elva vanligt förekommande patogener (se nedan för information om dessa patogener).

De fyra avståndsgrupperna slogs vid analyserna samman till två grupper, 0 – 500 m respektive 1000 – 2000 m, för att undersöka om prevalensen av patogener minskade med ett ökat avstånd från de utsatta bikuporna.

## 2.2 Patogener

### 2.2.1 Vad är en patogen

En patogen brukar ofta definieras som en mikroparasit (exempelvis bakterie eller virus) som är direkt beroende av en värd för reproduktion och överlevnad (Morley 2012). Det är när en patogen börjat reproducera sig i värden som värdorganismen anses infekterad. Att vara infekterad av en patogen och att vara sjuk är två skilda aspekter. Om infektion leder till sjukdom beror bland annat på värdens mottaglighet och resistens mot infektion, mängden av patogen i värden, men även virulensförmåga. Utöver mängden patogen kan man definiera förekomsten genom prevalens. Prevalensen anger hur stor andel av en population som visar positivt resultat för patogenen vid en viss tidpunkt och tar inte hänsyn till mängden i varje enskild individ (Pedersen et al. 2020). I denna undersökning är det prevalensen som använts för att jämföra patogenförekomsten mellan olika arter.

Ett patogen kan överföras hos bin mellan olika värdar på flera sätt. Det kan exempelvis ske genom sexuell och vertikal överföring, men även genom direktkontakt eller genom luften. Dessutom kan många patogener ackumuleras i avföringen och detta är en stor faktor till spridningen av patogener till övriga bikolonier eller solitära bin (Pedersen 2020).

Det är dessutom vanligt att patogener sprids mellan honungsbin genom *Varroa destructor*, ett kvalster som spridits från *Apis Cerana* till *Apis mellifera*. Kvalstret livnär sig på hemolymfan hos honungsbiet och leder till att biet blir deformerat men samtidigt kan smittas av flertalet patogener. Utan kontroll av kvalstret kan honungsbisamhällen förstöras inom ett fåtal år (Knolhoff et al. 2008).

### 2.2.2 Virus

Virus är en infektiös mikrob som består av RNA eller DNA omslutet av en proteinpartikel. För att replikera sig behöver viruset infektera värdceller, och överföring sker genom direkt fysisk kontakt eller genom indirekt överföring från

exempelvis parasiter. De flesta virus orsakar inte sjukdom, utan lever i sin värd utan att medföra någon negativ påverkan (Pedersen et al. 2020). Detta kan däremot också medföra problem i och med att virus kan vara svåra att upptäcka innan smittspridningen blivit stor. Hos bin är det främst för honungsbin som virus är ett hot och det orsakar stora problem för biodlare (Tantillo et al. 2015). I denna undersökning har sju RNA-virus testats hos samtliga prover för att detektera prevalensen och jämföra mellan grupper av bin. Eftersom virusen främst associeras med honungsbin är detta intressant att testa ur från smittspridningsperspektiv mellan honungsbin och vilda humlor. Nedan beskrivs de virus vars förekomst undersöktes i studien.

### BQCV ("*Black queen cell virus*")

BQCV är en av de vanligaste honungsbisjukdomarna i världen och detekterades först från döda drottninglarver och prepupper som fått mörkbruna eller svarta cellväggar (Spurny et al. 2017). Larver smittade med viruset får först en distinkt gul färg som senare övergår till mörkbrun eller svart färg, och larverna får ofta ett säckliknande utseende (Ball et al. 1999). Viruset smittar främst genom vertikal, social överföring från drottningen till avkommorna, men även från vuxna till larver genom körtelsekret. BQCV är därmed främst ett hot inom biuppfödningindustrin då en smittad honungsbidrottning kan föra vidare viruset till stora delar av samhället. Studier har dessutom visat att bin som infekterats av BQCV och *Nosema* har högre mortalitetsrisk (Spurny et al. 2017).

### ABPV ("*Acute bee paralysis virus*")

I likhet med BQCV så drabbar ABPV främst honungsbin och tros ha ökat i prevalens på grund av *V. destructor* (McMahon et al. 2018). Viruset har en hög virulens som leder till att färre infekterade puppor överlever, vilket tros vara anledningen till att frekvensen är lägre för viruset hos bin än till exempel DWV, som påverkar vuxna bin och sprider sjukdomen vidare (McMahon et al. 2018).

### SBPV ("*Slow bee paralysis virus*")

SBPV är prevalent både i honungsbin och i flera arter av humlor, men är främst virulent hos honungsbin genom *V. destructor* (McMahon et al. 2018). När biet infekterats av viruset blir frambenen förlamade och leder i många fall till en snabb död. I och med detta är viruset sällsynt i kolonier av honungsbin då smittade individer inte hinner överföra smittan innan de avlider (Pedersen et al. 2020).

### SBV ("*Sacbrood virus*")

SBV är ett globalt förekommande virus hos främst honungsbin som leder till att drottninglarver misslyckas med förpuppningen och får ett säckliknande utseende. Precis som för SBPV och ABPV har studier visat att *V. destructor* även kan ha en bidragande faktor till smittspridningen, men bevisen för detta samband är mindre än för de övriga virusen. SBV har återfunnits i humlor, men är mer frekvent påträffat hos honungsbin och är därför främst associerat med arter inom *Apis* (McMahon et al. 2018).

### DWV ("*Deformed wing virus*")

DWV är ett av de mest prevalenta virusen för honungsbin och leder ofta till att vuxna bin får deformerade vingar och missbildade kroppar. Viruset har även det visat sig spridas genom *V. destructor*. DWV återfinns också hos humlor, kolonier som solitära, och studier tyder på att viruset kan reproducera sig i många av dessa arter (McMahon et al. 2018).

### CBPV ("*Chronic bee paralysis virus*")

CBPV, med det fullständiga engelska namnet "Chronic bee paralysis virus" är ett RNA virus som främst smittar honungsbin och som orsakar minskning av arbetande bin i främst stora kolonier. Viruset är väl etablerat globalt sett och karakteriseras av förlamning, saknad av flygförmåga och hårlösa bukar (Dittes et al. 2020).

### LSV1-4 ("*Lake Sinai virus*")

Virusets upptäcktes relativt nyligen och då först som varianterna LSV1 och LSV2. Under tidens gång har fler varianter upptäckts av viruset och inkluderar bland annat LSV3 och LSV4 (Daughenbaugh et. al. 2015) vilket samtliga testades i denna undersökning.

Än vet man föga lite om virusets patologi, men i två studier från USA och Spanien har förekomsten av patogenen hos samhällen för honungsbin påvisat en ökad risk för kollaps av honungsbikolonier. I flera studier har man dessutom funnit ett samband med att en högre prevalens av LSV medför en lägre kolonistorlek av honungsbin (Hou et. al. 2023).



### 2.2.3 Protozoer

Protozoer är encelliga eukaryota organismer som livnär sig på mikroorganismer, dött organiskt material eller på andra djur. De tre viktigaste protozoerna är *Nosema bombi*, *Crithidia bombi* och *Apicystis bombi* som främst förekommer hos humlor (Pedersen et al. 2020). I denna studie har primers för att detektera komplex av patogenerna använts då både honungsbin och humlor analyserats och därav finns flera arter för samtliga protozoer specifikt för arten.

#### *Apicystis*

*Apicystis* är en parasit som har hittats i närmare 20 arter av *Bombus*. *Apicystis bombi* anses leda till fysiska problem för humlor som störande av fettvävnader, men även till att orsaka minskad reproduktionsframgång och kommunikation i kolonier. Studier har också kunnat påvisa att dödlighet hos arbetande bin ökar med *Apicystis* (Plischuk et al. 2011).

#### *Nosema*

Det finns 81 arter av *Nosema* beskrivna och i Sverige förekommer tre arter, nämligen *Nosema apis*, *Nosema ceranae* och *Nosema bombi*. De två förstnämnda orsakar främst sjukdomar hos honungsbin medan *Nosema bombi* är varianten av den encelliga organismen som förekommer hos humlor. Det har dock kunnat konstateras i en studie från Storbritannien att *N. ceranae* även hittats i humlor och då påverkat deras överlevnad och beteende väsentligt (Pedersen 2020). *Nosema* infektioner sker främst genom intag av sporer med födan (Chen 2009). Infektion av *N. apis*, *N. ceranae* och *N. bombi* leder för både humlor och honungsbin till kortare livslängd, färre drottningar och mindre kolonier (Chen et al. 2009) (Pedersen et al. 2020).

#### *Crithidia*

Parasiten *Crithidia bombi* återfinns i baktarmen hos humlor och minskar deras fitness med upp till 40 % (Cisarovsky et al. 2014). Den smittar främst drottningar som får svårt att etablera en koloni. Om humledrottningen skulle lyckas bilda en koloni så är sannolikheten stor att smittan förs vidare till arbetarna. Smitta av *C. bombi* sker både inom och mellan kolonier och kan bland annat smittas genom kontaminering av blommor (Yourth et al. 2006).

## 2.2.4 Nematoder

Nematoder är rundmaskar som är mikroskopiska djur som befinner sig i flertalet olika miljöer eller som parasiter på andra djur (Pedersen et al. 2020). Till denna studie testades en nematod på samtliga bin, *Sphaerularia bombi*.

### *Sphaerularia bombi*

Nematoden *Sphaerularia bombi* påverkar endast drottningar hos humlor och dessa infekteras när de övervintrar i marken. Förökningen av nematoden sker i hemolymfan och sprids vidare med drottningarnas avföring. Symptomen är att äggstockutvecklingen avstannar och leder till att utvecklingen av nya kolonier förhindras (Pedersen et al. 2020).

## 2.3 Dissekering och homogenisering

### *Syftet med homogeniseringen*

Eftersom rören som användes till extraktionerna av nukleinsyra inte rymmer mer än 20 mg behövde honungsbin och humlor dissekeras och homogeniseras (Meeus, Paxton 2016). Homogenisering innebär att de använda komponenterna finfördelas och blandas med varandra och blir enhetlig. Homogenatet användes därefter till senare extraktioner av RNA och DNA.

### *Utförande*

Proverna, det vill säga alla bin, hade förvarats i frys sedan insamlingen och transporterades från Lund till Sveriges lantbruksuniversitet på torris. Därefter lades de in i ett frysrum (-20°C). När det var dags att använda proverna togs de ur frysen och vägdes på en våg med fyra decimalers noggrannhet. Det är i biets bakdel som

flest patogener finns närvarande (Meeus, Paxton 2016). Därför dissekerades biet för att bara använda bakkdelen till homogeniseringen. Denna lades sedan ner i ett provrör som rymde 2 ml.

Till rören tillsattes en TBS buffert (50 mM TRIS.CL (pH 7.5)/150 mM NaCl) som hade adderats med RNA250 med en koncentration på 10 ng/mL och pJET1.2 med en koncentration på 1 ng/mL. RNA250 användes som en passiv kontroll för senare Realtids- PCR-analys för att räkna ut bortfallet av RNA efter arbetets gång. pJET1.2 hade samma uppgift för DNA:t. För honungsbin tillsattes 500 µL TBS buffert medan 800 µL TBS buffert användes till humlorna. Anledningen till att mer buffert användes till humlorna berodde på att dessa var större till storleken än vad honungsbina var.

Även 200 µL glaspärlor med en diameter på 1 mm adderades till provrören. Glaspärlornas funktion var att sönderdela biets bakdel vid homogeniseringen och för att blanda med bufferten.

Därefter användes en ”Precellys homogenizer” för att skaka om rören med komponenterna för att frambringa homogenatet. För samtliga 176 prov användes samma program där proverna skakades i 1 minut och 30 sekunder (intervall om 30 sekunder, 3 gånger med 5 sekunders paus) på 8000 rpm. Efter skakningen lades rören in i en centrifug på 8000 rpm i en minut för att separera vätskan från bakkdelen och glaspärlorna.

## 2.4 Extraktion av RNA

### *Syftet med RNA-extraktionen*

För att kunna genomföra en RT-PCR behövde RNA extraheras. Extraktion är en metod som används för att separera nukleinsyra från celler eller vävnader då det inte förekommer fritt i ett prov (RISE u.å.). Till detta användes ”RNeasy® Mini kit” från märket Qiagen. Genom att använda olika buffertlösningar kan RNA renas. Först används en denaturerande guanidin-tiocyanatinnehållande buffert som inaktiverar RNA:t så det hålls intakt. Därefter tillsätts etanol för att tvätta bort oönskade biprodukter (Qiagen, 2019). Kitet innehåller både de buffrar och rör som behövs för en RNA-extraktion. RNA:t utvanns från samtliga prover för att kunna genomföra test av virusen.

### *Utförande*

Till RNA extraktionen adderades 100 µL av homogenatet till 1,5 ml provrör med RLT buffert och DTT. Därefter pipetterades RLT-blandningen till en ”Qiagen-

shredder spin column” med tillhörande tilläggsrör för att därefter centrifugeras på 7500 rpm i två minuter. Efter centrifugeringen behölls vätskan i uppsamlingsrören som filtrerats ut och blandades ut med 250 µL 99,7 procentig etanol. Den nya blandningen pipetterades till en ”RNEasy® spin column” med uppsamlingsrör för att centrifugeras på 10 000 rpm i en minut. Istället för att spara vätskan hälldes den ut ur uppsamlingsrören och tilläggsröret lades i uppsamlingsröret på nytt. Därefter tillsattes 700 µL av RW1 och två tvättar med 500 µL RPE och mellan varje tillsättning centrifugerades rören i en minut på 10 000 rpm.

För att se till att det inte fanns någon etanol kvar så centrifugerades rören utan tillsatt vätska i en minut på 14 000 rpm. Därefter lades tilläggsrören från varje uppsamlingsrör till nya sterila rör inför det sista steget. Då adderades 50 µL sterilt vatten (RNase-free water från Qiagen kitet) till tilläggsrören. Eftersom det är i filtret på tilläggsrören som RNA:t fanns samlat så var det viktigt att se till att hela filtret blöttes med vattnet. För att säkerställa att hela filtret blötts ned pipetterades vattnet med extra noggrannhet direkt på filtret och därefter inkuberades rören i rumstemperatur i fem minuter innan de återigen centrifugerades på 10 000 rpm. Vätskan som därefter hamnat i rören var därmed det utvunna RNA:t som senare användes till Real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

## 2.5 Extraktion av DNA

### *Syftet med DNA-extraktionen*

För att testa patogenerna *Crithidia*, *Nosema*, *Apicystis* och *Sphaerularia* behövde DNA utvinnas från humlorna och honungsbina. Därför genomfördes även extraktioner av DNA. ”DNeasy® Blood & Tissue” från Qiagen var kiten som användes. Först lyserades proverna med Proteinase K för att därefter tillsätta buffert för att DNA:t ska kunna binda till rören. Precis som för extraktionerna av RNA tvättades de med etanol för att rena DNA:t (Qiagen, 2020).

### *Utförande*

100 µL av homogenatet tillsattes till 1,5 mL provrör med 180 µL Enzymatisk lyseringsbuffert och vortexades. Därefter lades provrören på inkubering på en värmeplatta i 30 minuter på 37 °C. När 30 minuter hade passerat så adderades först 25 µL Proteinase-K lösning och därefter 200 µL AL buffert. Efter varje tillsättning

vortexades varje provrör för att därefter återigen inkuberas på värmeplatta i 30 minuter på 56 °C.

Efter den andra inkuberingen tillsattes 200 µL 99,7 procentig etanol och därmed påbörjades tvättningen av proverna. Vätskan tillsattes därefter till en "QIAshredder spin column" med tillhörande uppsamlingsrör och centrifugerades i en minut på 8000 rpm. Vätskan som hamnat i uppsamlingsrören kasserades och det tillhörande tilläggsröret lades i uppsamlingsrören på nytt. Först tillsattes AW1, centrifugerades på 8000 rpm i en minut, och därefter adderades AW2 till rören och centrifugerades på 14 000 rpm i tre minuter. För att se till att all etanol försvunnit kördes en centrifugering utan tillsatt vätska i en minut på 14 000 rpm.

När all etanol antogs vara borta så lades tilläggsrören i nya sterila provrör och AE buffert pipetterades ner. För honungsbin användes 70 µL AE buffert medan det för humlorna användes 100 µL. Proverna inkubades därefter i en minut i rumstemperatur innan de lades ner för centrifugering en sista gång på 8000 rpm i en minut.

## 2.6 Kontrollerandet av renhet av DNA och RNA

För att undersöka hur renat extraktionerna av RNA och DNA var användes metoden spektrofotometri som utfördes med hjälp av en Nanodrop. Med Nanodropen kunde tre specifika våglängder beräknas. Vid 260 nm har nukleinsyra sin absorbanstopp och där kan man utläsa hur mycket DNA/RNA som har utvunnits i enheten ng/ µL. Nanodropen beräknade också vid våglängden 280 nm, där proteiner har sin topp, och vid 230 nm där fenoliska föreningar kan detekteras. Om absorbansen var under 2 i intervallen A260/A280 så indikerade det att proverna var kontaminerade med proteiner. Om absorbansen var under 2 för intervallet A260/A230 var det en indikator på att den var kontaminerad med fenoler.

Innan 2 µL av samtliga prov pipetterades på Nanodropens analysplatta användes blankprover av ribonukleasfritt vatten för RNA-proverna och AE- bufferten för DNA-proverna. När absorbansen var beräknad överfördes RNA och DNA proverna till frystålga rör och markerades med etiketter för att kunna skilja varje individs DNA och RNA ifrån varandra. Därefter placerades rören i en frys på -22 °C innan RT-PCR testerna genomfördes.

## 2.7 RT-PCR

### 2.7.1 cDNA syntes (omvänd transkription)

#### *Syftet med omvänd transkription*

För att göra det möjligt att testa för RNA-virus i RT-PCR så behövde RNA:t göras om till cDNA. Detta gjordes genom omvänd transkription.

”M-MuLV Reversed Transcriptase” användes som ett enzym i syntesen. ”RiboLock RNase Inhibitor” skyddade RNA från nedbrytning när temperaturen översteg 55 °C. ”Random hexamer primers” funktion var att syntetisera cDNA från RNA:t i proverna. Det utvunna cDNA:t kunde användes direkt till realtids-PCR.

#### *Utförande*

Först gjordes en mastermix utan templatens som sedan adderades till PCR- plattorna. Därefter tillsattes 2 µL av templatens innan syntesen av cDNA utfördes med T100 Thermal Cycler (Bio Rad). Programmet var utformat på följande vis: För att syntetisera random hexamer primer så inkuberades proverna i fem minuter på 25 °C vilket därefter följdes av 60 minuter på 37 °C. Reaktionen avslutas med att proverna värmdes upp till 70 °C i fem minuter, vilket slutligen ledde till utvunnet cDNA.

## 2.7.2 RT-PCR

### *Syftet med RT-PCR*

Polymerase chain reaction är en teknik som bygger på att kunna amplifiera många kopior av ett specifikt segment av DNA för att kunna studera det (Ghannam & Varacallo, 2023). Med flera kopior är det exempelvis möjligt att undersöka patogenförekomst. I denna studie användes kvalitativ PCR-metod, vilket innebär att det kontrollerades om patogenen förekom eller inte beroende på om de amplifierades (Evans et al. 2013). Genom att använda en supermix med färgämne (SSOFast EvaGreen supermix), primers, templaten och steriliserat vatten kunde proverna testas för patogenförekomst med hjälp av realtids-PCR.

### *Utförande*

Alla komponenter, exclusive templaten, blandades till en mastermix. För sekvenserna för de primers som användes, se tabell 1. Därefter tillsattes först 18  $\mu\text{L}$  av mastermixern till alla 96 brunnar på plattan och därefter adderades 2  $\mu\text{L}$  av de enskilda templaten i 88 av brunnarna. I de sista åtta brunnarna tillsattes en spädningsserie av positiva kontroller för den aktuella patogenen i sju av brunnarna (1 ng/  $\mu\text{l}$  – 1 fg/ $\mu\text{l}$ ) medan den sista brunnen späddes ut med 2  $\mu\text{L}$  ribonukleasfritt vatten som då fungerade som en negativ kontroll.

Tabell 1: Sekvenserna (forward och reversed) för samtliga primers för detektering av patogenerna. RNA250 och pJET1.2 fungerade som passiva kontroller för att kontrollera kvaliteten på proverna inför RT-PCR.

Assay	Forward Sequence 5'-3'	Reversed Sequence 5'-3'
DWV	TACTAGTGCTGGTTTTTCCTTT	CAAGTATCCTTCAAACAATC
BQCV	AGTGGCGGAGATGTATGC	GGAGGTGAAGTGGCTATATC
ABPV	GAGGAAATTTCCAATAAACT	GTTTCCACATCATGAAAGG
SBPV	GYGCTTTAGTTCAATTRCC	ATTATRGGACGTGARAATATAC
CBPV1	CAACCTGCCTCAACACAG	AATCTGGCAAGGTTGACTGG
LSV1-4	CGTGCGGACCTCATTCTTCATGT	CTGCGAAGCACTAAAGCGTT
SBV	GCTCTAACCTCGCATCAAC	TTGGAACCTACGCATTCTCTG
<i>Nosema complex</i>	TATGCCGACGATGTGATATG	CACAGCATCCATTGAAAACG
<i>Crithida complex</i>	CTTTTGGTCGGTGGAGTGAT	GGACGTAATCGGCACAGTTT
<i>Apicystis complex</i>	CCAGCATGGAATAACATGTAAGG	GACAGCTTCCAATCTCTAGTCG
<i>Sphaerularia bombi</i>	CGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGA	GAAGCCTAGTGCGCACCTAAA
<b>RNA250 (kontroll)</b>	TGGTGCCTGGGCGGTAAAG	TGCGGGGACTCACTGGCTG
<b>pJET1.2 (kontroll)</b>	CGAGGTTTAGAGCAAGCTTC	ACACTTTATGCTTCCGGCTC

Efter tillredningen användes instrumentet ”CFX Connect Real-Time PCR Detection System” till att utföra RT-PCR. Protokollet var utformat på följande vis: Först värmdes plattan upp till 95 °C i 30 sekunder för denaturering av DNA. Det gör det möjligt för DNA-strängarna att separera från varandra och förbereder det då för nästa steg, nämligen annealingssteget. Vid temperaturen 58 °C i fem sekunder blir det möjligt för primers att fästa till DNA-strängarna. Sista steget i cykeln var DNA syntetisering som frambringades när temperaturen ökade till 72 °C i 30 sekunder. De beskrivna cykelstegen upprepades 34 gånger för att åstadkomma fler kopior. När alla cykler var genomförda utfördes en temperatursänkning till 65 °C för att därefter fortsätta upp till 95 °C för att få fram smältkurvor. När programmet hade kört klart kunde man med hjälp av grafer för samtliga prover notera patogenförekomsten genom att jämföra med kontrollernas



kurvor. En smältpunktskurva användes också i analyserna. Detta för att detektera falska prov. Om ett prov visade topp på flera temperaturer eller hade en skild smältpunkt från kontrollerna ansågs resultatet för provet i fråga vara falskt.

### 2.7.3 Statistiska Analyser

För att jämföra patogenförekomsten hos proverna som användes i undersökningen användes prevalens som ett mått på infektion. Först jämfördes de vilda humlornas förekomst med honungsbin för att testa om honungsbin hade högre prevalens av virus och humlorna hade högre prevalens av *Nosema*, *Crithidia*, *Apicystis* och *Sphaerularia bombi*. Därefter testades hypotesen om att prevalensen skulle vara högre hos de vilda humlorna som hittades närmast honungsbisamhällena i jämförelse med de längre ifrån. Detta för att undersöka om kommersiella honungsbin kan bidra till ökad patogenförekomst hos det vilda beståndet.

Slutligen jämfördes honungsbinas prevalens med kommersiella jordhumlor för att undersöka om prevalensen var högre av virusen hos honungsbin än hos andra kommersiella pollinatörer. I samtliga fall presenterades resultaten i form av stapeldiagram.

För att undersöka om resultaten var statistiskt signifikant gjordes t-test. Nollhypotesen var att det inte fanns någon signifikant skillnad i patogenförekomst beroende på avståndet från honungsbisamhällena. Mothypotesen var att det fanns en signifikant skillnad i patogenförekomst mellan grupperna och att prevalensen var högre närmare honungsbisamhället. Signifikansnivån som användes i detta fall var  $\alpha = 0,05$ . För att undersöka hur patogenprevalensen skiljde sig mellan två kolonier av olika arter av kommersiella bin gjordes en jämförelse i patogenförekomst mellan jordhumlor och honungsbin.

### 3. Resultat

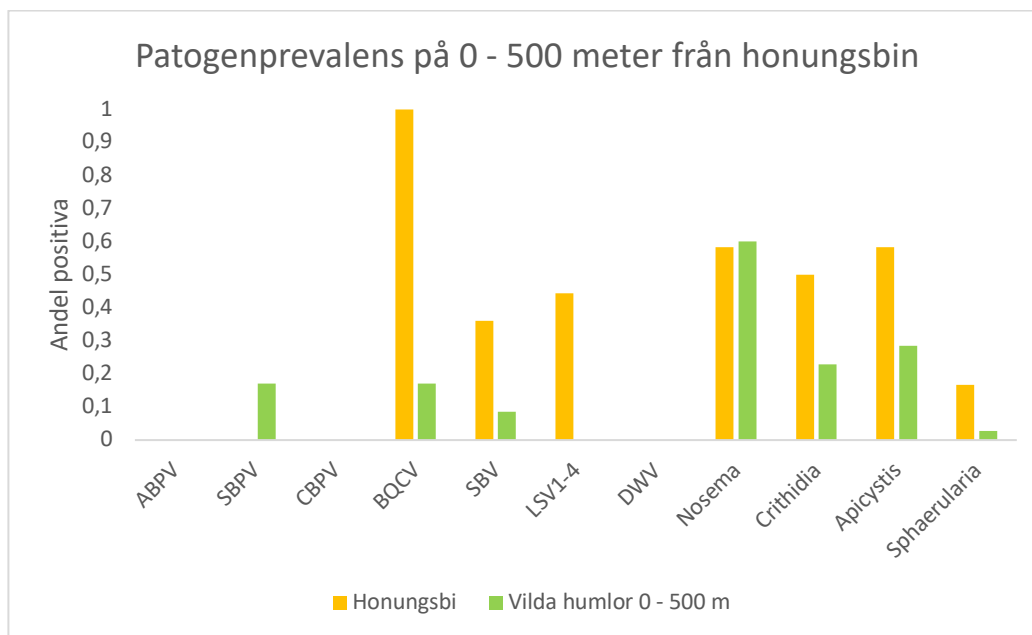
Efter genomfört RT-PCR test kunde samtliga amplifieringskurvor utläsas med en tillhörande smältkurva. Fluorescenströskelvärdet (RFU) sattes till mellan 100 - 200 för att utesluta falska resultat. Se bilaga 1 – 4 för demonstration för hur dessa kurvor såg ut. Eftersom de passiva kontrollerna RNA250 och pJET1.2 saknades helt i sju av proverna uteslöts dessa från analysen. Det ledde till att 169 prover användes till analysen. 36 stycken *Apis mellifera*, 37 stycken *Bombus terrestris*, 96 stycken vilda humlor (36 stycken *Bombus sylvarum* och 60 stycken *Bombus pascuorum*. Gemensamt för alla individer som testades i studien (honungsbin, vilda humlor och jordhumlor) var att virusen ABPV, DWV och CBPV saknades helt.

#### *0 – 500 meter*

Resultatet från jämförelsen mellan patogenförekomst hos honungsbin och vilda humlor på avståndet 0 – 500 meter ifrån bikuporna presenteras i figur 1.

I honungsbisamhället var prevalensen 0 för patogenen SBPV medan det hos vilda humlor på avståndet 0 - 500 m från honungsbisamhället förekom hos 17.1% av individerna och skillnaden var därmed statistisk signifikant ( $p > 0,01$ ). 100 % av de insamlade honungsbina bar på viruset. För de vilda humlorna var det en signifikant mindre del, 17,1 %, som visade förekomst av viruset. För viruset SBV var prevalensen signifikant högre för honungsbin än för vilda humlor då prevalensen var 36,1 % respektive 8,6 % ( $p = 0,005$ ). LSV1-4 återfanns inte i de vilda humlorna på avståndet 0 – 500 meter, men var mer förekommande hos de undersökta honungsbina där prevalensen var 44,4 % Det var ingen skillnad i *Nosema* mellan honungsbin och vilda humlor på avståndet 0 – 500 meter ( $p = 0,309$ ). Däremot var skillnaden i prevalens mellan *Crithidia* och *Apicystis* 2,3 respektive 2,4 gånger högre hos honungsbin än hos de vilda humlorna ( $p > 0,05$ )

Prevalensen för positiva honungsbin av *Sphaerularia* var 5,8 gånger större än hos de vilda humlorna på avståndet 0 – 500 meter ( $p > 0,05$ ).



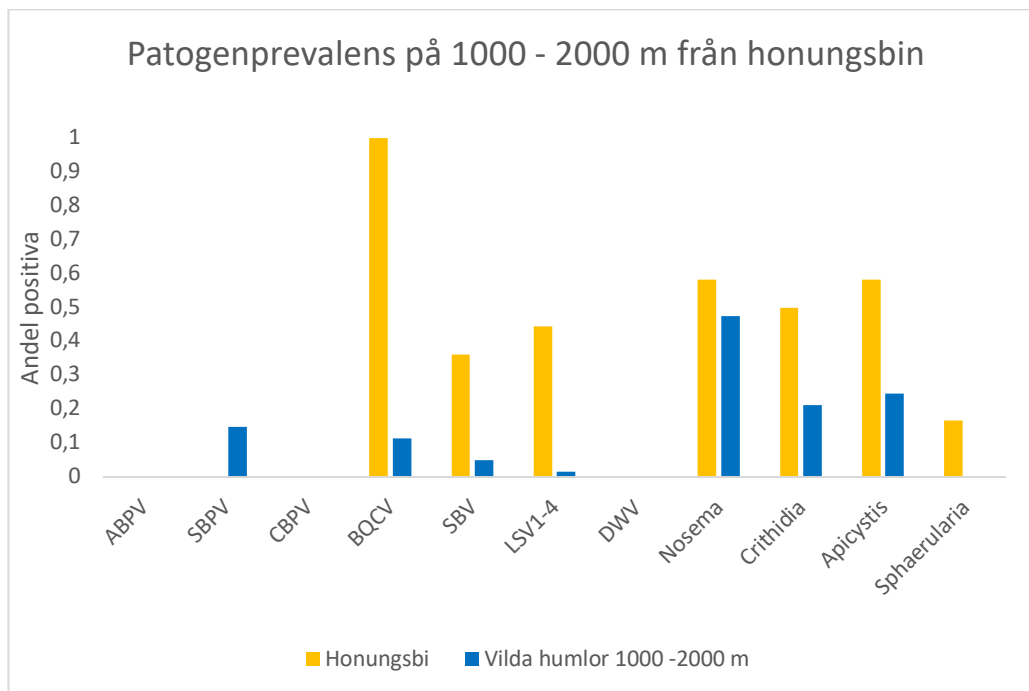
Figur 1: Skillnad i prevalens av elva patogener mellan honungsbin och vilda humlor på ett avstånd av 0 - 500 meter från utsatt bikupa. För SBQV, BQCV, SBV, LSV1-4, Crithidia, Apicystis och Sphaerularia var skillnaden signifikant mellan grupperna.

### 1000 – 2000 meter

Resultatet från prevalensen mellan honungsbin och vilda humlor på avstånd 1000 – 2000 meter ifrån samhällena visas i figur 2.

Prevalensen för SBPV var 14,8 % hos vilda humlor och förekom inte alls hos honungsbin och skillnaden var därmed signifikant ( $p > 0,002$ ). Förekomsten av BQCV, SBV och LSV1-4 var 100 %, 36,1 % respektive 44,4 % hos honungsbin av samtliga virus, medan den var 11,5 %, 4,9 % och 1,6 % för motsvarande patogener hos de vilda humlorna. Det medförde att prevalensen var 8,7, 7,4 respektive 27,8 gånger högre hos honungsbin och skillnaden var därmed signifikant.

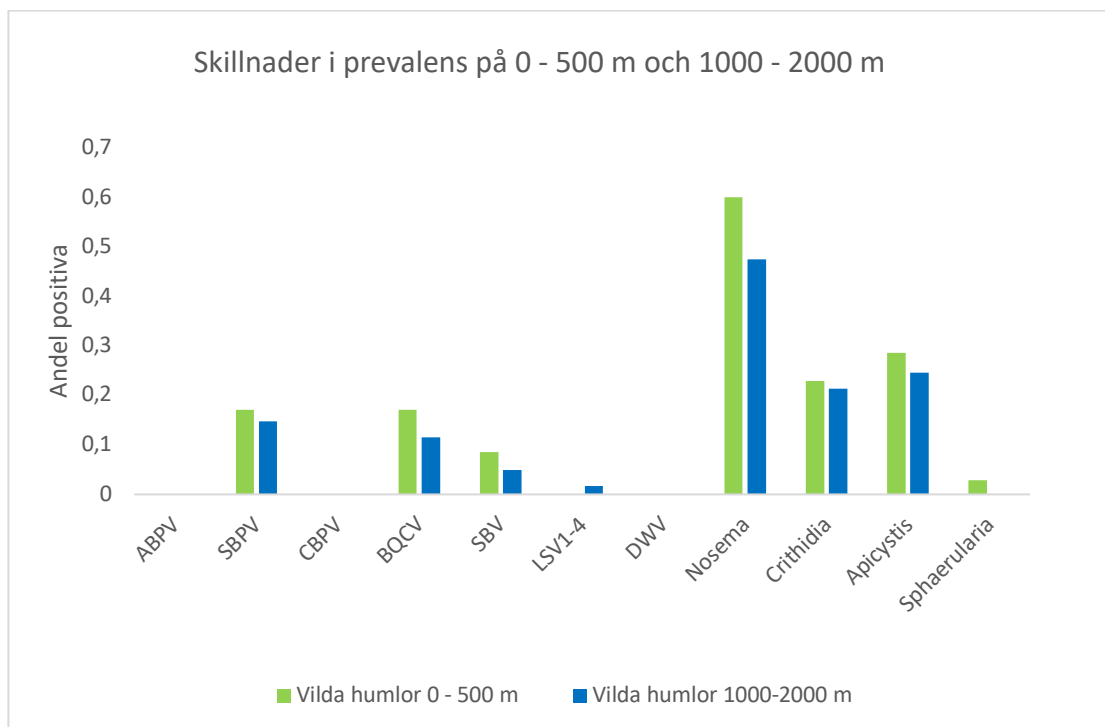
Skillnaden i prevalens mellan *Nosema* hos honungsbin och vilda humlor på avståndet 1000 – 2000 meter visade efter genomfört t-test ingen skillnad mellan honungsbin och de vilda humlorna ( $p > 0,309$ ). Patogenerna *Crithidia*, *Apicystis* och *Sphaerularia* visade däremot på en signifikant skillnad i patogenförekomst mellan arterna (0,005, 0,001 respektive 0,012). Prevalensen var 2,3 gånger högre hos honungsbin än hos de vilda humlorna av *Crithidia* och 2,4 gånger högre för *Apicystis*. Hos de vilda humlorna kunde inga förekomster av *Sphaerularia* detekteras.



Figur 2: Skillnad i patogenprevalens av elva patogener mellan honungsbin och vilda humlor på ett avstånd av 1000 - 2000 meter från samhällen av honungsbin. För SBPV, BQCV, SBV, LSV1-4, Crithidia, Apicystis och Sphaerularia var skillnaden signifikant.

#### 0 – 500 meter och 1000 – 2000 meter

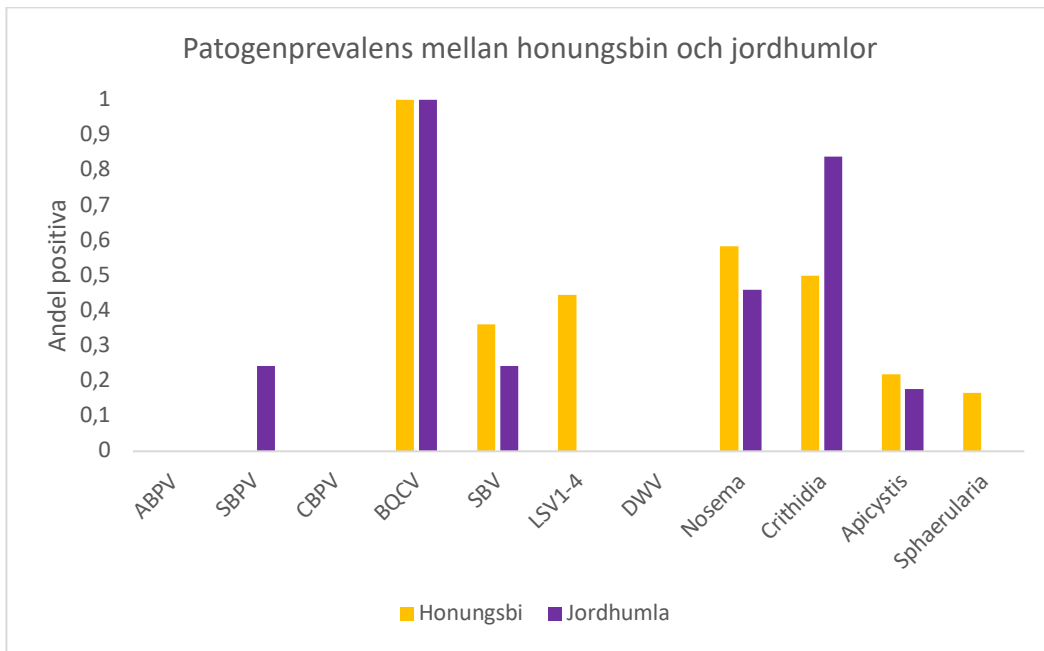
Jämförelse av prevalensen mellan de vilda humlorna i de två avståndsintervallen presenteras i figur 3. Ingen skillnad kunde påvisas av patogenförekomst mellan de två grupperingarna efter genomfört t-test. Visserligen kan konstateras att prevalensen var högre av patogenerna SBPV, BQCV, SBV, *Nosema*, *Crithidia*, *Apicystis* och *Sphaerularia bombi* hos vilda humlor närmast honungsbisamhällena, men skillnaden var så pass liten att det inte går att utesluta att resultatet uppstått utifrån en slump. Vidare var prevalensen 0 av LSV1-4 för vilda humlor på avståndet 0 – 500 meter medan den var 1,6 % längre ifrån för LSV1-4.



Figur 3: Skillnaden i patogenprevalens hos vilda humlor på avstånden 0 - 500 och 1000 - 2000 m från honungsbisamhället. Det fanns ingen signifikant skillnad mellan grupperna för någon av patogenerna.

### Jordhumlor och honungsbin

Resultatet från jämförelsen av prevalens mellan jordhumlor och honungsbin visas i figur 4. Precis som för övriga grupper kunde inte patogenerna ABPV, CBPV och DWV detekteras hos jordhumlorna. Dessutom hittades ingen patogenförekomst av LSV1-4 eller *Sphaerularia* hos jordhumlorna, vilket återfanns hos honungsbin. Med ett t-test kunde det konstateras att skillnaderna var signifikanta för LSV1-4 eller *Sphaerularia* mellan honungsbin och jordhumlor och att nollhypotesen kunde förkastas. Prevalensen för SBPV var 0 för honungsbin medan den var 0,243 för jordhumlorna och skillnaden visade sig vara signifikant ( $p > 0,001$ ). Förekomsten av patogenerna SBV, *Nosema* och *Apicystis* var högre i gruppen med honungsbin än för jordhumlor, men för alla tre patogener visade t-testet att det inte fanns någon signifikant skillnad mellan grupperna i förekomsten. Slutligen testades skillnaden i mängd av *Crithidia* mellan grupperna vilket visade på en signifikant skillnad ( $p > 0,002$ ). Prevalensen var 83,8 % för *Crithidia* hos jordhumlorna medan den var 50 % för honungsbin.



*Figur 4: Patogenprevalens hos honungsbin och jordhumlor (kommersiella). Skillnaden i patogenförekomst var signifikant för patogenerna SBPV, LSV1-4, Crithidia och Sphaerularia*

## 4. Diskussion

Honungsbin och vilda humlor visade skillnader i prevalens av de patogener som undersöktes. I båda grupperna av vilda bin kunde en signifikant skillnad i prevalens detekteras i jämförelse med honungsbin för patogenerna BQCV, SBPV, SBV, LSV1-4, *Crithidia*, *Apicystis* och *Sphaerularia*. För sex av dessa var prevalensen högre för honungsbin. Hypotesen som lades fram var att prevalensen skulle vara högre hos honungsbin för virusen medan de övriga protozoerna och nematoden skulle ha en högre prevalens hos vilda humlorna. Det var endast tre virus som visade en signifikant högre andel hos honungsbin än hos vilda humlorna av det totalt sju testade. Tre av dessa saknades helt hos både vilda humlor och honungsbin och SBPV saknades helt hos honungsbin. Att prevalensen av SBPV var 0 hos honungsbin motsatte hypotesen, men resultatet är inte helt oväntat. I Jordbruksverkets rapport från 2020 står det nämligen att SBPV är relativt sällsynt hos honungsbin medan det är vanligare hos humlor, och då främst trädgårdshumlor (Pedersen et al. 2020). Det kan också förklaras utifrån informationen som delgivits tidigare i texten av att SBPV sällan hinner spridas i kolonier innan den smittade individen hunnit avlida. Däremot verkar viruset spridas genom *V. destructor*, som är ett problem hos honungsbin, vilket inte förklarar hur viruset sprider sig hos humlor. Detta pekar mot att kunskapen kring SBPV än inte är helt klarlagd och fler studier krävs för att påvisa dess livscykel.

Prevalensen av *Crithidia* och *Apicystis* var högre hos honungsbin vilket inte var väntat. Något som kan förklara resultaten är att de primers som användes för detekteringen av patogenerna var komplex och inte för specifika arter av dessa. För att undersöka vilken art av patogen som finns hos respektive biart behöver resultaten skickas på sekvensering.

Hypotesen var att de vilda humlorna närmast honungsbisamhällena skulle ha en högre prevalens av virus vilket inte kunde påvisas från undersökningen. Det fanns ingen skillnad i prevalens mellan de två avståndsintervallen av vilda humlor och resultatet kan därför inte visa på att närvaro av honungsbin skulle ha en negativ påverkan på vilda humlor i form av ökad patogenförekomst.

Vidare måste fortsatt forskning göras för att ta reda på om det är möjligt att korssmitta mellan arterna. Det finns i dagsläget för få studier på detta ämne och

därav är det svårt att dra några slutsatser kring huruvida smittan skett mellan arterna.

Mellan jordhumlor och honungsbin är skillnaden i prevalensen av SBPV, LSV1-4, *Crithidia* och *Sphaerularia* signifikant. Båda grupperna är kommersiella vilket gör det intressant att jämföra för vilken grupp som potentiellt kan överföra smitta till inhemska bin. Däremot går det inte att göra en avståndsbaserad analys från jordhumlesamhällen från där de vilda humlorna hittades då samhällen av jordhumlor sattes ut på samtliga avstånd där de vilda humlorna insamlades. Däremot går det att göra en jämförelse av prevalensen mellan jordhumlor och honungsbin för att se om honungsbisamhällena har en högre mängd patogener i jämförelse med andra samhällen av andra arter.

Hos honungsbinsamhällena återfanns LSV1-4 och *Sphaerularia* vilket saknades helt hos jordhumlorna. LSV1-4 återfanns i en prevalens på 0,016 i gruppen vilda humlor på avståndet 1000 – 2000 meter medan den var 0 på avståndet 0 – 500 m. Att det saknas helt i gruppen på ett närmare avstånd till honungsbisamhället gör att hypotesen om att kommersiella honungsbin skulle leda till ökad smittspridning inte kan styrkas. Då borde i sådana fall prevalensen av LSV1-4 vara högre i gruppen av humlor närmast samhällena. För *Sphaerularia* var prevalensen 0,029 för gruppen närmast de kommersiella honungsbina medan prevalensen var 0 på avståndet 1000 – 2000 meter. Detta skulle kunna tyda på att smittoöverföring skett av honungsbin till vilda beståndet. Däremot är skillnaden inte signifikant mellan grupperna av vilda humlor vilket gör att det inte går att dra den slutsatsen av resultatet.

SBPV saknades helt hos honungsbin vilket förekom på en prevalens av 0,243 hos jordhumlorna. I båda grupperna av vilda humlor kunde SBPV detekteras vilket gör det möjligt att det är jordhumlor som bidragit till ökad smittomängd hos grupperna. För att undersöka teorin behöver man utforma undersökningen annorlunda så att samhällen av jordhumlor inte sätts ut på varje avstånd där de vilda humlorna fanns. Prevalensen av *Crithidia* var högre hos jordhumlor än hos honungsbin. Däremot var skillnaden inte signifikant och därmed kan inte slutsatser dras kring förekomsten.

Att prevalensen för ABPV, CBPV och DWV var 0 för honungsbin, jordhumlor och vilda humlor är ett tecken på att patogenerna saknas helt i samtliga områden. Ingen patogen återfanns i endast vilda humlor vilket pekar mot att smittspridningen sker mellan arter i samma område.

I denna undersökning kunde inte hypotesen om att smittspridningen av patogener skulle öka i närvaro av kommersiella bin styrkas. Det finns dock exempel på forskning där man sett detta. I en studie i Kanada, i sydvästra Ontario, samlades humlor från sex platser på sommaren mellan åren 2004 och 2005. Målet var att undersöka hur patogenprevalensen skiljde sig mellan vilda humlor av fyra olika patogener (*Apicystis bombi*, *Crithidia bombi*, *Nosema bombi* och *Locustacarus buchneri*) beroende på om dom vilda humlorna fångades nära växthus där



kommersiella humlor användes eller på ett avstånd längre bort. Resultatet visade att prevalensen var högre för *Crithidia bombi* och *Nosema Bombi*. Författarna förklarar detta med att dessa patogener kan överföras mellan individer genom blommor och att det genom att pollinera samma blommor innebär att kommersiella humlor bidragit till den högre prevalensen hos de vilda bestånden. Där tar de även upp en tidigare jämförelse i patogenprevalens mellan kommersiella humlor och vilda humlor och visar således hur patogenprevalensen är markant högre för tre av patogenerna i jämförelse med de vilda humlorna (Colla et.al. 2005). Däremot saknas data kring patogenprevalensen hos de kommersiella humlorna i den aktuella studien vilket hade varit bra för att styrka att smittan kommit från just dessa.

I en artikel som publicerades 2014 beskrivs en undersökning som gjordes på honungsbin och där man undersökte möjlig smittspridning till inhemska humlor och hur DWV och *Nosema ceranae* hos honungsbin och humlor är kopplade. De menar att eftersom prevalensen av DWV är signifikant högre hos honungsbin, och att humlor och honungsbin infekteras av samma DWV-stammar, kan det påvisa att Apis med stor sannolikhet kan vara källan till patogenförekomsten hos vilda humlor. För att undersöka om honungsbin kunde korssmitta genomfördes ett ympningsexperiment av DWV och *N. ceranae* till utvalda individer ifrån arten *Bombus terrestris* och man kunde därmed konstatera att det fanns en signifikant skillnad i DWV infektioner efter inokulering jämfört med ett kontrollsamhälle utan tillsatt smitta. De kunde, efter insamling och genomförda tester, konstatera att prevalensen av DWV blev högre för dessa humlor och drog därmed slutsatsen att prevalensen hos humlorna berodde på honungsbinas förekomst (Brown et al. 2014). I denna studie kunde ingen förekomst av DWV dektekteras vilket gör det svårt att dra några slutsatser kring om hypotesen i fråga kan antas stämma eller inte.

Resultatet från denna studie kan inte påvisa att importerade honungsbin skulle ha en negativ påverkan på vilda humlor med ökad patogenförekomst då det inte är en styrkt skillnad i prevalens hos individerna närmast honungsbinens samhällen. Utifrån tidigare studier verkar dessutom olika patogener närvara hos olika arter, vilket gör det möjligt att spridningen inte sker mellan arter utan inom arterna. Däremot förekom många av de funna patogenerna hos både honungsbin och humlor, vilket skulle motsäga att smittspridning inte sker mellan arterna.

Genom fortsatt reglering av kommersiella humlor och honungsbin där kontroll av patogenförekomst hos dessa studeras kan smittspridningen minska. Vidare krävs mer forskning om både patogenerna i sig och dess smittväg för att komma underfund med hur problemet kan lösas.

## Referenser

- Ahrné, K., Borgström, P., Johansson, N. (2018). *Pollinatörer och pollinering i Sverige – värden, förutsättningar och påverkansfaktorer*. Rapport 6841. Stockholm: Naturvårdverket.
- A.M. Lindström, S., G. Smith, H. (2022) *Konkurrens mellan honungsbin och vilda bin – evidens, kunskapsluckor och möjliga åtgärder*. (CEC rapport nr 06). Lund: Centrum för miljö- och klimatvetenskap, Lunds universitet.
- Ball, B.V., Bailey, L. (1999). Honey Bee Viruses. *Encyclopedia of virology (Second Edition)*. Sida 743 – 749. <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0139>
- Bernhardsson, O., G. Smith, H., Kendall, L. (2022). *Konkurrens mellan vilda bin och honungsbin – fördjupande fältförsök 2022*. Lund: Centrum för miljö- och klimatvetenskap, Lunds universitet
- Brown M.J.F., Fürst, M.A., McMahon D.P., Osborne J.L., Paxton R.J. (2014). *Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators*. Nature 506, 364 – 366.
- Chen, Y.P. Evans, J.P., Murpy C., Gutell, R., Zuker, M., Gundensen-Rindal, D., Pettis, J.S. (2009). Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from European honey bee, *Apis mellifera*. J Eukaryot Microbiol. 56(2): 142–147. doi: 10.1111/j.1550-7408.2008.00374.x
- Colla, S.R., Gegear, R.J., Otterstatter, M.C., Thomson, J.D. (2005). *Plight of the bumble bee: Pathogen spillover from commercial to wild populations*. Biological conservation 129, 461-467.
- Daughenbaugh, K.F., Martin, M., Butscher, L.M., Cavigli, I., Garcia, E., Flenniken, M.L. (2015). Honey Bee Infecting Lake Sinai Viruses. 3285-3309. PMCID: PMC4488739. doi: 10.3390/v7062772
- Dittes, J., Schäfer, M.O., Aupperle-Lellbach, H., Mülling, C.K.W., Emmerich, I.U. (2020). Overt Infection with chronic Bee Colonies. Vet Sci. 7(3): 142. PMCID: PMC7559786. doi: 10.3390/vetsci7030142
- Evans, J.D., Schwarz, R. S., Chen Y.P., Budge, G., Cornman, R.S., De la Rúa, P., de Miranda, J.R., Foret, S., Foster, L., Gauthier, L., Genersch, E., Gisder, S., Jarosch, A., Kucharski, R., Lopez, D., Man Lun, C., Moritz, R.F.A., Maleszka, R., Muñoz, I., Pinto, M.A. (2013). *Standard methods for molecular research in Apis mellifera*. Journal of Apicultural Research 52(4). DOI: [10.3896/IBRA.1.52.4.11](https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.11)
- Ghannam, M.G., Varacallo, M. (2023). *Biochemistry, Polymerase Chain Reaction*. Penn Highlands Healthcare System

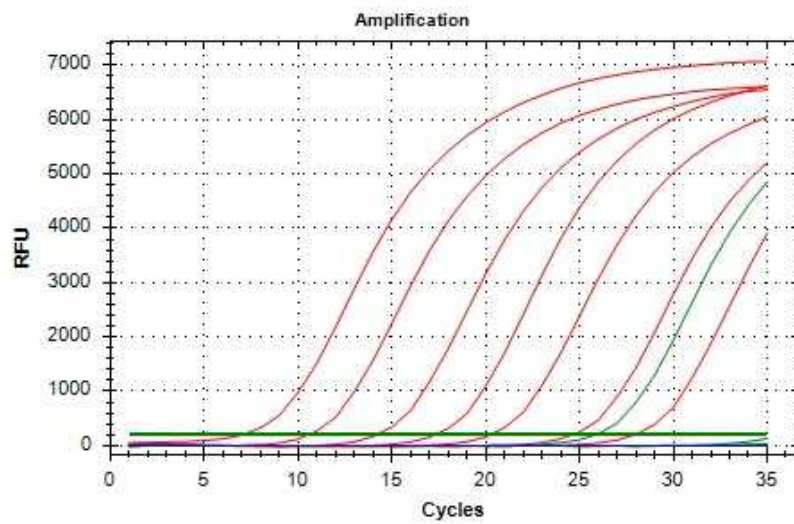
- Hou, C., Liang, H., Chen, C., Zhao, H., Zhao, P., Deng, S., Li, B., Yang, D., Yang, S., Wilfert, L. (2023). *Lake Sinai virus is a diverse, globally distributed but not emerging multi-strain honeybee virus*. Molecular Ecology: John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/mec.16987>
- Jordbruksverket (2022). Bin och humlor. <https://jordbruksverket.se/djur/ovriga-djur/bin-och-humlor> [2023-04-26]
- Knolhoff, L.M., Onstad, D.W. (2007). *Resistance by Ectoparasites*. Insect Resistance Management. ISBN: 978-0-12-373858-5. Elsevier Ltd.
- Lundmark, A. (u.å.). *Referenslaboratorium för bihälsa*. <https://www.slu.se/institutioner/ekologi/resurser1/bihalsa/> [2023-05-03]
- McMahon, D.P., Wilfert, L., Paxton, R.J., Brown, M.J.F., (2018). Emerging Viruses in Bees: From molecules to Ecology. *Advances in Virus Research*, volume 101. Sida 215-291. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.008>
- Meeus, I., Paxton, R. (2016). *Super-B. Protocols for assessing the taxonomic and geographic distribution of pathogens in Hymenopteran pollinators across Europe*. Version: 29 March 2016.
- Morley, N.J. (2012). *The effects of radioactive pollution on the dynamics of infectious diseases in wildlife*. School of Biological Science, Royal Holloway, University of London: Egham, Surrey
- Nanetti, A., Bortolotti, L., Cilia, G. (2021). *Pathogens Spillover from Honey Bees to Other Arthropods*. 10(8):1044. doi: 10.3390/pathogens10081044. PMID: 34451508; PMCID: PMC8400633.
- Ocepek, M P., Toplak, I., Zajc, U., Bevk, D. (2021). *The Pathogens Spillover and Incidence Correlation in Bumblebees and Honeybees in Slovenia*. 10(7):884. doi: 10.3390/pathogens10070884. PMID: 34358034; PMCID: PMC8308815.
- Pedersen, T.R., Forsgren, E., Henriksson, J., Herbertsson, L., Karlsson, I., de Miranda, J.R., Sahlin, U., Smith, H.G., Aiéro, M., Blomqvist, S., Dudaniec, R., Granberg, F., Hjort, C., Lindström, S., Olsson, O., Olsson, P., Rundlöf, M., Winter, C., Yourstone, J. (2020) *Biologiska hot mot humlor*. Rapport 2020:14, pp 1–140. Jordbruksverket, Sverige
- Qiagen. (2020). *DNeasy® Blood & Tissue Handbook*. HB-2061-003. Qiagen
- Qiagen. (2019). *RNeasy® Mini Handbook*. HB-0435-006. Qiagen
- SFS 1974:211. *Bisjukdomslag*. RSL: Landsbygds- och infrastrukturdepartementet
- SFS 1974:212. *Bisjukdomsförordning*. RSL: Landbygds- och infrastrukturdepartementet
- Spurny R., Přidal, A., Pálková, L., Kiem, H.K.T., de Miranda, J.R., Plevka, P. (2017) *Virion Structure of Black Queen Cell Virus, a common Honeybee Pathogen*. J Virol- 28;91(6): e02100-16. doi: [10.1128/JVI.02100-16](https://doi.org/10.1128/JVI.02100-16)
- Tantillo, G., Bottaro, M., Di Pinto, A., Martella, V., Di Pinto, P., Terio, V. (2015). *Virus Infections of Honeybees Apis Mellifera*. Ital J Food Saf. 2015 Sep 25;4(3):5364. doi: 10.4081/ijfs.2015.5364. PMID: 27800411; PMCID: PMC5076640.

Yourth C.P., Schmid-Hempel, P. (2006) *Serial passage of the parasite Crithidia within a colony of its host, Bombus terrestris, reduces success in unrelated hosts.* Proc Biol Sci, 273, p. 655 – 659.

# Tack

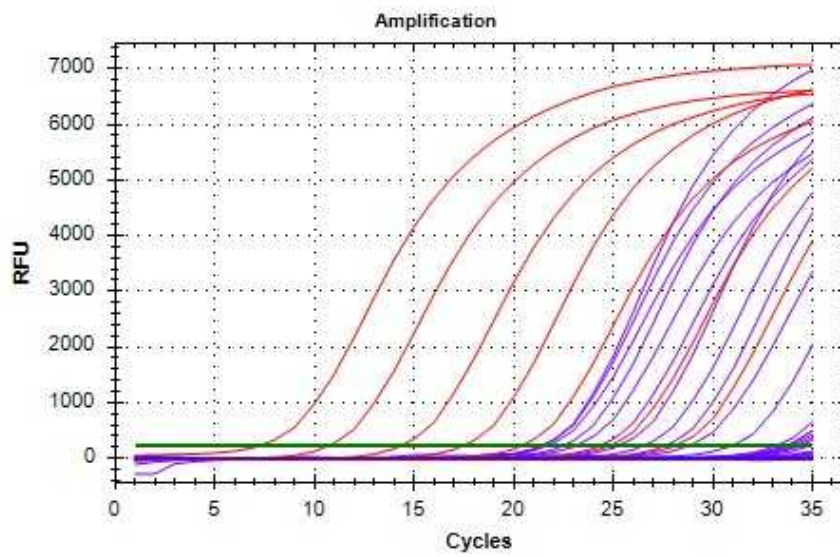
Jag vill ge ett stort tack till alla i bigruppen i C-korridoren på ekologicentrum för hjälpen jag fått under mina laborativa veckor. Ett extra stort tack till min handledare Joachim de Miranda för all kunskap och stöttning under arbetets gång som han tillgivit mig, och Karl Johansson från NRL som varit till stor hjälp med mina laborativa delar.

## Bilaga 1



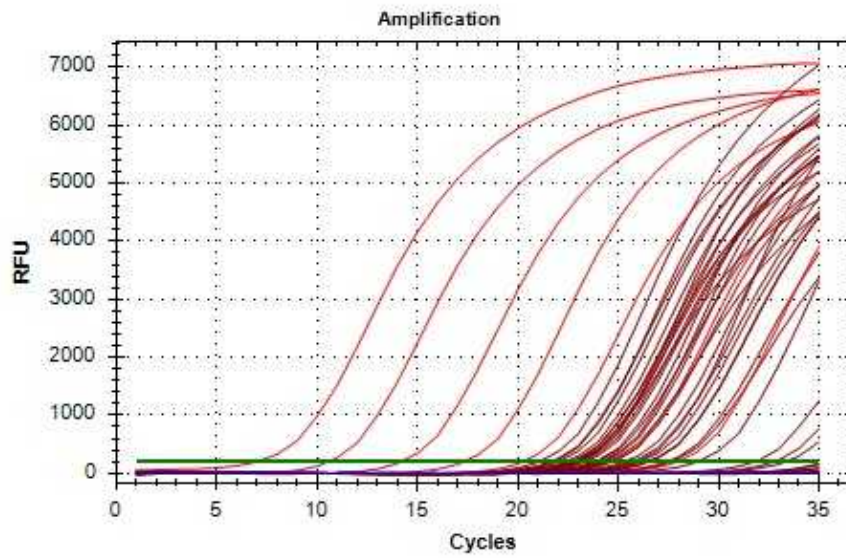
*Figur 5: Amplifieringskurvor för Crithidia. Gröna kurvorna är vilda humlor och de röda kurvorna är positiva kontroller.*

## Bilaga 2



Figur 6: Amplifieringskurva för *Crithidia*. Lila kurvorna visar förekomst hos jordhumlor medan de röda kurvorna är positiva kontroller.

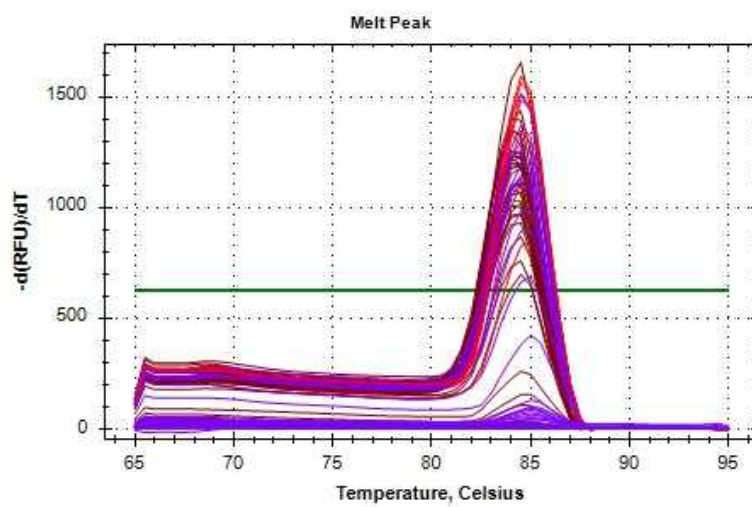
## Bilaga 3



*Figur 7: Amplifiering av Crithidia. Mörkröda kurvor är förekomsten hos honungsbin och de röda kurvorna är positiva kontroller.*



## Bilaga 4



Figur 8: Smältpunktstoppar för proverna. För samtliga prover är smältpunkten vid 85 grader vilket tyder på att inget av resultaten var falskt.

## Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.