



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**A HAZAI MÉZELŐ MÉHEKET BETEGÍTŐ *NOSEMA* FAJOK
ELŐFORDULÁSÁNAK VIZSGÁLATA,
ÉS KIMUTATÁSI MÓDSZERÉNEK FEJLESZTÉSE**

Doktori értekezés tézisei

DOI: 10.54598/002330

CSÁKI TAMÁS

Gödöllő

2022

A doktori iskola

megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdaság-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós egyetemi tanár,
az MTA rendes tagja
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Élettani és Takarmányozástani Intézet,
Takarmánybiztonsági Tanszék

Témavezetők: Dr. Heltai Miklós
egyetemi tanár, DSc
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,
Vadgazdálkodási és Természetvédelmi Intézet

Dr. Békési László Szabolcs
PhD, habil.
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezetők jóváhagyása

1 A munka előzményei, célkitűzések

Korábban úgy gondolták, hogy a Microsporeákhoz (DELPHY 1936) tartozó két egysejtű faj közül a *Nosema apis* (ZANDER 1909) csak a nyugati mézelő méheket, az *Apis mellifera*-t (LINNAEUS 1758), a *Nosema ceranae* (FRIES és mtsai. 1996) csak a keleti mézelő méheket, az *Apis cerana*-t, (FABRICIUS és mtsai. 1792) fertőzi. Közel száz éven keresztül a tavasszal jelentkező, majd a nyár folyamán rendszerint spontán megszűnő dizentéria kórképpel (barna ürülékpöttyök a keretléceken, lépeken és a kijárónyílásokon) hozták párhuzamba a nosemosist (BAILEY 1955; BAILEY 1967). A kétezres évek elejére egyre több méhészet számolt be nyári állománygyengülésről, de az évszakos ciklikusság és a klasszikus tünetek hiányában nem gyanakodtak a noszémásságra. Azonban, a közelmúltban sorra születtek jelentések arról, hogy a *Nosema ceranae* a nyugati mézelő méheket is fertőzi (CHAUZAT és mtsai. 2007; CHEN és mtsai. 2008; DAINAT és mtsai. 2012; FRIES és mtsai. 2006; GIERSCH és mtsai. 2009; HIGES és mtsai. 2006; HUANG és mtsai. 2007; INVERNIZZI és mtsai. 2009; KLEE és mtsai. 2007; NABIAN és mtsai. 2011; PAXTON J. és mtsai. 2007; STEVANOVIC és mtsai 2011; TAPASZTI és mtsai 2009; WILLIAMS és mtsai 2008b). Járványtani szempontból kimutatták, hogy a *Nosema apis* és a *Nosema ceranae* fertőzés tünete és kórtana eltérő képet mutat (HIGES és mtsai. 2010). 2009-ben a guadalajarai COLOSS workshopon elfogadták a javaslatot, hogy betegséget a kórokozó faj függvényében megkülönböztessék (HIGES és mtsai. 2009): *Nosema apis* esetén „A” típusú, *Nosema ceranae* esetén „C” típusú nosemosisról beszélünk. Az „A” típusú nosemosis idült állapota jellemzően tavasszal, a hordás beindulása előtt mutatkozik, ami a dizentéria mellett a kaptár közelében „mászkaló” röpképtelen, vagy már elhullott méhek és a vontatott fejlődés tünet. A „C” típusú nosemosis esetében egyértelmű klinikai tünetek nem mutatkoznak, a spanyolországi feljegyzések szerint előfordulásának nincs szezonálitása, és a kezeletlenül hagyott családok idővel összeomlanak (MARTÍN-HERNÁNDEZ és mtsai.

2007; HIGES és mtsai 2008; HIGES és mtsai 2009; HIGES és mtsai 2010). Azonban a németországi felmérés nem mutatta ki a *Nosema ceranae* folytonos betegítését (GISDER és mtsai 2010).

A *Nosema ceranae* magyarországi jelenlétét először TAPASZTI és munkatársai (2009) mutatták ki. A 2007-ben gyűjtött 38 *Nosema* fertőzött méhminta közül PCR-RFLP módszerrel 37 méhminta esetében csak a *Nosema ceranae*-t mutatták ki. CHEN és munkatársai (2008) az 1995-ben gyűjtött Amerikai Egyesült Államokbeli méhmintákból, PAXTON és munkatársai (2007) 1998-ban gyűjtött finnországi méhmintákból mutatták ki, hogy a *Nosema ceranae* a nyugati mézelő méheket fertőzi. A méhcsalád szintjén a nosemosis súlyosságának megállapításához hagyományosan a méh egyedekre számolt átlag spóraszám számítását használták (FURGALA és HYSER, 1969), ami később egyben a *Nosema apis* fertőzés kimutatási eljárása is lett. FINGLER és munkatársai (1982) vizsgálata szerint méhmintán belül a fertőzött méh egyedek százalékos aránya korrelál a méh egyedekre számolt átlag spóraszámmal.

A spanyolországi vizsgálatok (HIGES és mtsai 2008b; MEANA és mtsai 2010) a *Nosema ceranae* esetében nem igazolták a közvetlen összefüggést a méhegyedekre számolt átlag spóraszám és a méhcsalád fertőzöttségi szintje között. A két *Nosema* faj spóráját a szokványos mikroszkópos alaktani vizsgálat alapján szinte lehetetlen megkülönböztetni (FRIES 1997). Az egyértelmű megkülönböztetéshez molekuláris vizsgálat szükséges, viszont az költséges, különösen a DNS állomány kinyerése a rendkívül ellenálló spóra alakból kereskedelmi kité és az azt kiszolgáló automatizált technológia nélkül (HIGES és mtsai 2009a).

Munkám átfogó céljával mézelő méhek nosemosisát okozó *Nosema* fajok magyarországi területi és szezonális előfordulásának vizsgálatát határoztam meg, valamint a fertőzés diagnosztikájának fejlesztését, megkülönböztetett figyelmet fordítva a termelő méhészetek körében rendszeresen megfogalmazódó alábbi hipotéziseknek:

1. A feltételezés szerint a *Nosema ceranae* Magyarországon 2007-nél korábbi időszakban is jelen volt. Célkitűzésem 2007-nél korábban gyűjtött, mikroszkópos vizsgálat alapján *Nosema spp.* pozitív méhminták fertőzési típusának meghatározása PCR vizsgálattal.
2. A feltételezés szerint az Európán belül közölt független, egymásnak ellentmondó eredmények alapján a *Nosema* fajok közül a *Nosema ceranae* az elterjedtebb. Célkitűzésem a *Nosema* fajok magyarországi elfordulásának vizsgálata több időszakban és nagy területen végzett mintagyűjtés feldolgozásával.
3. A feltételezés szerint ugyanazon méhcsalád esetében a benti és a kijáró méheket megkülönböztető mintavételezés alapján *Nosema* fajokkal kapcsolatos minta feldolgozási módszerek eredménye eltér. Célkitűzésem a nosemosis diagnosztikájában olyan gyakorlati módszer fejlesztése, amivel pontosabban lehet meghatározni a fertőzöttséget méhcsalád szinten, figyelembe véve a mintagyűjtés módszerét is.
4. A feltételezés szerint a *Nosema* fajok kimutatásához és fertőzési típusuk megkülönböztetéséhez alkalmazott molekuláris vizsgálat a kereskedelmi kitt és az azt kiszolgáló automatizált technológia nélkül is kivitelezhető. Célkitűzésem a fertőzési típusok megkülönböztetéséhez alkalmazott triplex PCR vizsgálat teljesítése kereskedelmi kitt és az azt kiszolgáló automatizált technológia nélkül.

Munkámmal a fenti hipotézisek vizsgálatán túl célom az is, hogy a kapott eredményeket értékelve ajánlásokat fogalmazzak meg a betegség kialakulásának korai stádiumban való felismerése, megítélése és kezelése érdekében a *Nosema* fajokkal kapcsolatos mintagyűjtési és minta feldolgozási módszerekre, illetve a molekuláris vizsgálati módszer egyszerűsítésére és gazdaságosabbá tételére.

2 Anyag és módszer

2.1 Archív, konzervált minták gyűjtése

Az KATKI fagyasztott méhmintáit feltárva 2004-ből származó méhmintákat találtunk. A minták megjelölése szerint a 2004-ben végzett mintázáskor legyengült méhcsaládok kaptárjai előtt és aljdeszkájáról méh hullákból gyűjtöttek, összesen 26 mintát. Minták 10 és 20 darab méhhullából álltak, és 11 különböző megyéből származtak.

2.2 Szabadföldi mintavétel 2010-ben

Az Országos Magyar Méhészeti Egyesület szaktanácsadói hálózata, a Gödöllői Kisállattenyésztési Kutatóintézet (ma Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ) és önkéntes méhészetek közreműködésével országos méh mintavételi kampányt szerveztünk 2010. év áprilisban, tavasszal, júliusban, nyáron és októberben, ősszel. A mintavételi kampányban arra törekedtünk, hogy *Nosema apis* és a *Nosema ceranae* prevalenciájának reprezentatív értékeléséhez, hogy a mintavételi helyszínek az ország összes fő földrajzi egységéből származzanak. A mintavételi helyszínek termelő méhészetekben voltak. A mintavételi helyszínek kiválasztása a személyes ismeretség és a méhészek részvételi hajlandósága alapján történt, ezért évszakonként a helyszínek és mintaszámok között minimális szórás volt. Az egész évben a mintázások átfedése 42 helyszín és 126 család volt.

Helyszínenként véletlenszerűen választottunk három-három méhcsaládot a mintázáshoz. Ezekről a méhcsaládokról kétféle méhmintát vettünk. A benti dolgozó méheket a fészekfiókok olyan szélső kereteiről szedtük, amelyek nem tartalmaztak nyitott fiasítást. A kijáró méhek mintázásához a kaptárkijárókat 20 percre bezártuk, és miután a hazatérő méhek a röpdeszán megtelepedtek, onnan söpörtük őket össze. A kijáró méhek mintázását délelőtt 9 óra előtt, vagy délután 3 óra után végeztük azért, hogy ne keveredjenek közéjük a napközben tájoló repülést végző fiatal méhek. Minden minta esetében legalább 60-60 méhegyedet gyűjtöttünk, melyeket később két-két 30 méhegyedes részre osztottunk.

2.3 Mintafeldolgozás a „CAR”-ban

A 2010-ben tavasszal és nyáron gyűjtött méhmintákat a Spanyolországi méhészeti kutatóközpontban (Centro Apicola Regional, Marchamalo) dolgoztam fel. A spórák purifikálásához a méhmintákból egyszerre 30 egész méhegyedet BA6040/STR (Seward) típusú szűrőtasakokba helyeztem és 5 ml molekuláris biológiai minőségű H₂O (MilliQ) adtam hozzá. A szűrőtasakokat Stomacher 80 Biomaster (Seward) készülékkel 2 percig a legnagyobb sebességi fokozatban roncsoltam. A tasakokban a belső háló kiszűrőként szolgált.

Az így megszűrt tartalmat 15 milliliteres cetrifugacsövekben 6 percig 20 °C hőmérsékleten 800 x g sebességen centrifugáltam. A centrifugálást követően a csövek tartalmát dekantáltam, és a centrifugacsövek aljára letapadt pelletet 1 milliliter H₂O-val 3 perc időtartamra vortex mixerrel újra szuszpendáltam.

Minden szuszpenzióból készült keneten fázis kontraszt mikroszkóppal 400 X-os nagyítás mellett az OIE (2008) útmutatás szerint ellenőriztem a *Nosema spp.* előfordulását. A *Nosema* fajok jelenlétének meghatározásához a szuszpenziókon triplex PCR analízist végeztem a QIAGEN kereskedelmi kitt és műszerpark segítségével. A spórák feltárásához TissueLyser II (Qiagen, Inc.) készüléket alkalmaztam, szuszpenzióként 150 mikrolitert mértem 96-well plate-be (Qiagen, Hilden, DE) üvegyöngyökkel (2 miniméteres, Sigma) előre töltött csövekbe, 6 percig 30 hertz fordulaton járatam. A plate utolsó csövébe vak mintának vizet töltöttem, hogy legyen negatív kontroll minta is.

A fehérjebontáshoz a szuszpenzióhoz 30 mikroliter ATL buffert (Qiagen 19076), 20 mikroliter proteináz K-t (Qiagen 19131) mértem, és 12 óra időtartamra 56 °C hőmérsékleten inkubáltam. A DNS izoláláshoz a BS96 DNA tissue extraction protokollt futtattam az egyszerre 96 darab

DNS minta izolálására alkalmas BioSprint 96 (Qiagen) készüléken. Az izolált DNS-t tartalmazó plate-eket -20 °C hőmérsékleten tároltam felhasználásig.

A kivont DNS-t PCR-el elemeztem a *Nosema* fajokra specifikus 218MITOC F/R és 321APIS F/R primerekkel. A vizsgálat során a nyugati mézelőméh DNS citokróm c-oxidáz (COI) génjének előfordulását ellenőrizve állítottam be a pozitív kontrollt a fajra specifikus 118COI F/R primerekkel (MARTÍN-HERNÁNDEZ és mtsai 2007).

A PCR körülmények a következők voltak: 25 mikroliterben 12,5 mikroliter Fast Start Master (No. 04710452001 Roche Diagnostic, Basel, CH), a 218MITOC F/R és 321APIS F/R primerekből 0,4 mikromolt, a 118COI-F/R primerekből 0,2 mikromolt alkalmaztam, 0,2 milligramm/milliliter BSA, 0,1 % Triton X-100 és 2,5 mikroliter DNS templát. A termociklusos program beállítása 95 °C 10 perc, 35 ciklus 95 °C 30 másodperc, 61,8 °C 30 másodperc, és 72 °C 45 másodperc, végső meghosszabbítás 72 °C 7 perc. Ennek a technikának az érzékenységi szintjei 2,5 spóra *Nosema ceranae* vagy 25 spóra *Nosema apis* 150 mikroliter méh szuszpenzióból. A lehetséges szennyeződés kimutatása és a mintafeldolgozás megbízhatóságának felmérése érdekében a DNS izolálás és a PCR elemzési fázisai során a negatív és a pozitív kontrollokat párhuzamosan dolgoztam fel. A PCR programot Eppendorf Mastercycler Ep gradient S 7601 készüléken futtattam.

Minden PCR-terméket nagyfelbontású kapilláris elektroforézis rendszerben Qiagen QIAxcel készülékkel elemeztem, QIAxcel DNS Resolution Kit (QIAgen, 929002 sz.) alkalmazásával.

2.4 Minta feldolgozás a „RET”-ben

A 2004-ből származó archív, konzervált méhminták retrospektív vizsgálatát és a 2010. nyári mintagyűjtésből származó méhmintáminták egy részének, illetve a 2010. őszi mintagyűjtésből származó méhminták vizsgálatát a Szent István Egyetem Gödöllői Regionális Egyetemi Tudásközpontban végeztem. Az archív méhminták 10-20 darab méhegyedből álltak, így az archív méhminták feldolgozásához annyi méhegyedet használtam, amennyi a mintánként rendelkezésre állt. A 2010-ben gyűjtött méhmintákból egyszerre 30 darab méhegyedet használtam. A mintánként összetartozó méhegyedeket LDPE simítózáras (M6080B, Labsystem) típusú tasakba helyeztem és 5 ml molekuláris biológiai minőségű H₂O-t (MilliQ system) adtam hozzá. A tasakokat kézzel dörzsöltem addig, amíg a tartalmuk homogén állapotúvá vált. A tasakok száját nem zártam be, hogy a felesleges levegő távozni tudjon és ne szakadjanak ki a tasakok. Az eljárás mintánként legalább 1 percig tartott. Tasakok tartalmát 50 mikronos nylon szűrőhálón keresztül 15 milliliteres centrifugacsövekbe szűrtem át, ezt követően a csöveket 6 percig 20 °C hőmérsékleten 800 x g sebességen centrifugáltam. A centrifugálást követően a csövek tartalmát dekantáltam, és a centrifugacsövek aljára letapadt pelletet 1 milliliter H₂O-val 3 perc időtartamra vortex mixer segítségével újra szuszpendáltam.

Minden szuszpenzióból készült keneten biológiai fénymikroszkóppal 400 x-os nagyítás mellett ellenőriztem a *Nosema spp.* előfordulását és leszámoltam az egy méhegyedre jutó átlag spóra számot (részletesen „A spóraszám és fertőzött méhek arányának számolása” fejezetben tárgyalom). Az 1 milliliter szuszpenziót ismét centrifugáltam, ez alkalommal 1,5 milliliteres Eppendorf csövekben, 15 perc időtartamra, 4 °C hőmérsékleten, 13000 rpm fordulaton. A csövek tartalmát dekantáltam és a centrifugacsövek aljára letapadt pallethez 300 µl CTAB buffert (CORNMAN és mtsai 2009) és 200 milligramm üveggyöngyöket (425-600 mikrométeres, Sigma-Aldrich) kevertem. Az Eppendorf csöveket tízesével ragasztószalaggal a vortex mixer (ZX3m, Velp Scientific) rezgő fejéhez rögzítettem és maximum fordulaton működtettem 5 perc

időtartamra. A szuszpenziót 1000 milligramm proteináz K hozzáadását követően 12 óra időtartamra 200 rpm fordulaton rázva inkubáltam. A DNS kinyeréséhez 4 ciklus centrifugálást alkalmaztam, ciklusonként 15 perc időtartamra, 4 °C hőmérsékleten, és a ciklusok között a felülúszót (300 mikrolitert) minden alkalommal átmértem új Eppendorf csőbe a következők szerint: első ciklusban egyenlő mennyiségben 1:1 arányban szuszpenzió-fenol keveréket, második ciklusban egyenlő mennyiségben 1:1:1 arányban felülúszó-fenol-kloroform keveréket, harmadik ciklusban egyenlő mennyiségben 1:1 arányban felülúszó-kloroform keveréket, negyedik ciklusban 1:2,5 arányban felülúszó- -20 °C hőmérsékletű etanol keveréket centrifugáltam. A negyedik ciklust követően az etanolt eltávolítottam, az Eppendorf cső aljára letapadt pelletet kiszárítottam és ezt követően 30 mikroliter H₂O-t hozzáadva feloldottam. Az izolált DNS-t tartalmazó Eppendorf csöveket -20 °C hőmérsékleten tároltam felhasználásig. A DNS mennyiségét, minőségét és tisztaságát spektrofotometriásan elemeztem Implen nanofotométerrel (Implen GmbH, Németország), és a koncentrációt vízzel 20 nanogrammm/mikroliterre állítottam be. A kivont DNS-t PCR-rel elemeztem a *Nosema* fajokra specifikus 218MITOC F/R és 321APIS F/R primerekkel (MARTÍN-HERNÁNDEZ és mtsai 2007). A vizsgálat során a nyugati mézelőméh DNS citokróm c-oxidáz (COI) génjének előfordulását ellenőrizve állítottam be a pozitív kontrollt. Az alkalmazott COI primerek szekvenciái a „CAR”-ban alkalmazott primerek szekvenciáival megegyeztek. A 25 mikroliter PCR reakcióelegy komponensei a következők voltak: 1 egység *AmpliTaq Gold* Polymerase buffer (Applied Biosystems), 1.5 mikroliter MgCl (25 mM), 2 mikroliter dNTP (2,5 mM), 2.5 mikroliter BSA (250 mg/ml), 3.3 mikroliter Triton X-100, 0.9 mikroliter minden 218MITOC (10 mM) és 321APIS (10 mM) primerből, 0.2 mikroliter COI-F/R (10 mM) primerek, és 9 mikroliter DNA templát (20 nanogrammm / mikroliter). A PCR termociklusos program beállítás szekvenciái a „CAR”-ban alkalmazott programmal megegyeztek.

A PCR-termékeket agaróz gélelektroforézises eljárással jelenítettem meg.

2.5 A spóraszám és fertőzött méhek arányának számolása

Az átlagos spóraszámot a 2010. év októberi mintagyűjtésből készült szuszpenziók ellenőrzésekor számoltam haemocytometerrel (Bürker, Fein - Optik Jena, Tiefe 1/100mm, 1/400 és 1/25 qmm). Az általam használt standard haemocytometer 3 x 3 nagy kvadrátból áll, hármas vonalakkal elválasztva. A középső nagy kvadrát felett 0,1 mikroliter folyadék réteg van. A középső kvadrát további 25 darab kisebb kvadrátból áll, szintén hármas vonallal elválasztva, amelyek felett 4 nanoliter folyadék réteg van. A 25 darab kvadrát további 16 darab kisebb kvadrátból áll, szimpla vonallal elválasztva, amelyek felett 0,25 nanoliter folyadék réteg van. Ha a 4 nanoliter térfogat alatti kvadrátok esetében a spórák száma első ránézésre is egyértelműen többnek mutatkozott, mint 100 spóra, akkor a 0,25 nanoliter térfogat alatti kvadrátokkal számoltam. A spórákat számolva azok közül, amelyek a vonal fölött helyezkedtek el, csak a bal oldali vonal és a felső vonal fölött elhelyezkedőket számoltam.

CANTWELL (1970) és HUMAN és mtsai (2013) közleményei alapján az eredeti ~30 darab méhegyedhez adott 5 milliliter vizes hígítási arányt követtem. A 4 nanoliter térfogat alatti kvadrátra számolt spórák számából a dolgozatban szereplő 21. ábra szerinti formula alapján számítottam ki a hígítási faktort és az egy méhegyedre jutó átlag spórák számát.

A fertőzött méhek arányát a 2010. év októberi mintagyűjtésből származó minták maradék méhegyedét (n=30) felhasználva számoltam ki.

A mintákból minden méhegyedet külön-külön egyesével dörzsmozsárban 1 milliliter desztillált víz hozzáadásával dörzsöltem szét. A homogén dörzsolékből készült keneteken fénymikroszkóppal 400 X-os nagyítás mellett ellenőriztem a *Nosema spp.* előfordulását. Minden egyes mintán többszörös látómező ellenőrzést alkalmaztam, ha a keneten három különböző látómezőre pozícionálva nem láttam spórát, akkor negatívnak minősítettem.

2.6 Fertőzöttségi kategóriák és kockázati szintek meghatározása

A vizsgálatom során mért adatok feldolgozásakor a fertőzés mértékének hagyományos, kvalitatív és kvantitatív kategorizálást összehangoltam. A fertőzöttségi kategóriák és kockázati szintek meghatározásához a noseosis diagnosztikájában kockázati szint alapú szemikvantitatív értékelési módszert nem találtam, ezért csak részben tudtam az irodalomra támaszkodni. FINGLER közleményében találtam a legnagyobb vizsgált elemszámot, ezért az általa mért értékeiből indultam ki. A legmagasabb értékeit a „már elkéstünk” kategóriába soroltam. Az átlag spóraszámok esetében a FINGLER és mtsai. (1982) legmagasabb értékének négyzetgyök értékét vettem +++-esnek, a legalacsonyabb mért értéket az +-esnek, a ++-es értéket a kettő középértékével határoztam meg. A fertőzött méhek %-os aránya esetén a FINGLER legmagasabb értékének, ami 100% volt, annak a felét, az 50%-ot határoztam extrém kockázatúnak. A közepes kockázati értékhez a 30%-ot pedig utólag a már kapott mérési eredmények szerint határoztam meg (CSÁKI és mtsai. 2015), amikor már leszámoltam az összes mintát. Ezt az eredményeknél tárgyalom.

2.7 Statisztikai elemzés

A független valószínűségek összehasonlítására Z-tesztet végeztem az MS Excel alkalmazásával. Az eloszlások homogenitásának vizsgálatához Khi-négyzet tesztet alkalmaztam szintén az MS Excel alkalmazásával. Az átlagos spóraszám és a fertőzött méhek aránya közötti összefüggés elemzéséhez az MS Excel alkalmazásával végzett lineáris kvantilis regressziót használtam.

3 Eredmények és azok megbeszélése

3.1 Archív, konzervált minták retrospektív vizsgálati eredménye

Mind a 26 minta esetében fénymikroszkópos vizsgálattal igazoltam a *Nosema spp.* előfordulását. A PCR vizsgálatokkal azonban csak 6 (23%) minta esetében tudtam igazolni a *Nosema spp.* előfordulását. A 6 minta közül 5 minta esetében mindkét *Nosema* faj előfordulását igazoltam, és csak egy minta esetében igazoltam a *Nosema ceranae* önálló előfordulását.

3.2 A 2010-ben gyűjtött méhminták vizsgálati eredményei

A 2010. évben gyűjtött méhminták vizsgálatából származó adatok alapján a *Nosema spp.* fertőzött méhcsaládok aránya 95% és 98% között változott. Az évszakonkénti összehasonlításban a fertőzött méhcsaládoknak sem a száma, sem az aránya nem mutatott szignifikáns különbséget (Z-teszt: $P > 0,05$). A *Nosema ceranae* és a *Nosema apis* fertőzési arány eloszlása az évszakok tekintetében homogén (Khi-négyzet-teszt: $\chi^2(2) = 1,11$; $P = 0,57$). A *Nosema ceranae* prevalenciája minden évszak tekintetében szignifikánsan magasabb volt, mint a *Nosema apis* vagy a mindkét faj együttes előfordulása (mindhárom évszakban $Z > 15,3$; $P < 0,001$). A fertőzött mintákban a *Nosema ceranae* fertőzések aránya 95% és 98% között változott. Kiszámítottam az egy egyedre vonatkozó spóraszám-kategóriákban az 5%; 10%; 50%; 90%, és 95%-os fertőzöttség-kvantiliseket a benti méhek mintáiban. A fertőzött méhek aránya szerinti kvantilisekre az egy egyedre jutó spóraszámoktól függő lineáris modellt illesztettem. Számításaim alapján a benti méhek esetében, ha az egy egyedre jutó spóraszám 1,2 millió érték alatt van, akkor a méhcsalád fertőzöttségének kockázati szintje közelítőleg 95% valószínűséggel közepes (ez az, amikor a méhegyedek kevesebb, mint 30%-a fertőzött). Ha az egy egyedre vonatkozó spóraszám 1,2 millió és 3,6 millió között van, akkor a méhcsalád fertőzöttségének kockázati szintje közelítőleg csupán 50% valószínűséggel marad közepes. Ha az egy egyedre vonatkozó spóraszám meghaladja a 3,6 millió értéket, akkor a méhcsalád fertőzöttsége közelítőleg csak 10% valószínűséggel marad közepes, 90% valószínűséggel ennél magasabb kockázatú, és több mint 10% valószínűséggel extrém magas kockázattal kell számolnunk (ez az, amikor a méhegyedek több mint 50%-a fertőzött).

A kijáró méhek mintái esetében is kiszámítottam az egy egyedre vonatkozó spóraszám-kategóriákban az 5%; 10%; 50%; 90%, és 95%-os fertőzöttség-kvantiliseket. A kijáró méhek esetében is a fertőzött méhek aránya szerinti kvantilisekre az egy egyedre jutó spóraszámoktól függő lineáris modellt illesztettem. Számításaim alapján a kijáró méhek esetében, ha az egy egyedre jutó spóraszám 3,6 millió érték alatt van, akkor a

méhcsalád fertőzöttségének kockázati szintje közelítőleg 10% valószínűséggel közepes (amikor a méhegyedek kevesebb mint 30%-a fertőzött). Ha az átlag spóraszám 3,6 millió és 6 millió között van, akkor a méhcsalád fertőzöttségének kockázati szintje csupán 5% valószínűséggel közepes és több mint 50% valószínűséggel extrém magas (amikor a méhegyedek több mint 50%-a fertőzött). Ha az egy egyedre vonatkozó spóraszám meghaladja a 6 millió értéket, akkor a méhcsalád fertőzöttsége 95%-nál nagyobb valószínűséggel magas kockázatú (amikor a méhegyedek 30- 50%-a fertőzött), és több mint 50% valószínűséggel extrém magas (amikor a méhegyedek több mint 50%-a fertőzött).

3.3 A kijáró méhek és a benti dolgozó méhminták összehasonlítása

A regresszióanalízis szignifikáns korrelációt mutat az egy méhre jutó spóraszám és a fertőzött méhek százalékos aránya között ($R_{\text{benti}} = 0,65$; $N = 130$; $R_{\text{kijáró}} = 0,43$; $N = 138$; $P < 0,001$ mindkét esetben). A fertőzött méhek aránya a kijáró méhek mintáiban minden évszakban magasabb volt, mint a benti dolgozó méhek mintáiban, azonban szignifikáns különbségeket nem sikerült kimutatni (Z-próba: $P > 0,05$).

A 2010. évben gyűjtött minták mikroszkópos kiértékelésének eredményeit a PCR-elemzési eredmények támasztották alá. A fáziskontraszt-mikroszkóppal nyert adatok összehasonlíthatók a fénymikroszkóppal nyert adatokkal. A 7. táblázat szerint bármelyik mikroszkópos vizsgálat eredményeihez képest a PCR vizsgálatok eredményei valamivel magasabb fertőzési szintet mutatnak. A tavaszi gyűjtésből származó mintáknál a mikroszkópos vizsgálatok 89%-ának pozitív eredményével szemben a PCR vizsgálatok 95%-a hozott pozitív eredményt. A nyári gyűjtésből származó mintáknál a mikroszkópos vizsgálatok 97%-ának pozitív eredményével szemben a PCR vizsgálatok 98%-a hozott pozitív eredményt. Az őszi gyűjtésből származó mintáknál a mikroszkópos vizsgálatok 95%-ának pozitív eredményével szemben a PCR vizsgálatok 97%-a hozott pozitív eredményt. Azonban a Z-teszt szerint egyetlen szezomban sincs szignifikáns különbség a mikroszkóppal és a PCR-rel kimutatott fertőzési arány között ($P > 0,05$).

Olcsóbb DNS izolálási módszert és multiplex PCR-analízist alkalmazva a két *Nosema* fajt kimutattam és azonosítottam a magyarországi nyugati mézelő méhből. A módszerrel kimutattam a *Nosema spp.* előfordulását azokból a méhmintákból is, amelyek fertőzöttsége fénymikroszkóppal nem volt igazolható.

3.4 Új tudományos eredmények

1. Archív, konzervált méhminták alapján meghatároztam a *Nosema ceranae* faj fertőzését és magyarországi jelenlétét 2004-ben. Az 1. számú hipotézist elfogadom.
2. A 2010. évben tavasszal, nyáron és ősszel Magyarország egész területére reprezentatíván gyűjtött méhmintákon PCR-el végzett vizsgálataim alapján meghatároztam a *Nosema* fajok magyarországi területi elterjedését az évszakok tekintetében. A *Nosema sp.* minden évszakban és minden területen kimutatható, továbbá a *Nosema ceranae* az elterjedtebb. Meghatároztam a „C” típusú nosemosis betegség prevalenciáját. A 2. számú hipotézist elfogadom.
3. A nosemosis diagnosztikájában kockázati szint alapú szemikvantitatív értékelési módszert vezettem be, amivel pontosabban lehet meghatározni a fertőzöttséget méhcsalád szinten. A benti dolgozó és kijáró méhek mintáit eltérően kell értékelní. A 3. számú hipotézist elfogadom.
4. Tudomásom szerint először végeztem a hazai *Nosema spp.* vizsgálatokhoz sikeres triplex PCR vizsgálatot 218MITOC F/R, 321APIS F/R és 118COI F/R primerekkel úgy, hogy ennek során a DNS-kinyeréséhez és tisztításához a kereskedelmi forgalomban lévő szöveti lizátort és sejttörőt helyettesíttem közönséges vortex keverővel és hagyományos fenol-kloroformos keverék centrifugálásával, továbbá az elektroforézist szintén hagyományos agaróz gélen futtattam. E módszer alkalmazásával egyszerű és gazdaságos lett a *Nosema* fajok kimutatásához alkalmazott molekuláris vizsgálat, mellyel megbízható módon lehet megkülönböztetni a *Nosema spp.* fertőzési típusokat. A 4. számú hipotézist igazolom.

4 Következtetések és a javaslatok

Az archív, konzervált minták retrospektív vizsgálatával igazoltam, hogy *Nosema ceranae* legalább 2004. óta létezik Magyarországon. Az, hogy hat pozitívnak talált minta közül ötben mindkét *Nosema* faj jelen volt, az arra is utalhat, hogy nagyjából ebben az időben (nem sokkal korábban) történhetett a *Nosema ceranae* behurcolása, és még nem szorította ki a *Nosema apis*-t. TAPASZTI és mtsai (2009) és a saját 2010-ben végzett vizsgálataim során a 2004-hez képest jóval nagyobb arányban találtunk *Nosema ceranae*-t. A legfrissebb vizsgálatok szerint pedig napjainkra szinte eltűnt a *Nosema apis* a méhészetekből. Az archív, konzervált minták esetében a *nosema* fertőzöttségre pozitív eredmény igazolása a fénymikroszkópos vizsgálati eredményekhez képest a PCR vizsgálatoknál kevesebb volt, amit úgy vélem, hogy a tárolási körülmények okoztak. Ezeket a mintákat az évek során számos alkalommal kiolvastották, és újra lefagyasztották.

Mivel minden évszakban rendkívül alacsony *Nosema apis* előfordulási arányt találtam, véleményem szerint a BAILEY (1955) által közölt *Nosema apis* ciklikus előfordulási elméletét felül lehetne vizsgálni. Ezzel szemben a *Nosema ceranae* előfordulása folyamatos. TAPASZTI és munkatársai (2009) kimutatták, hogy a *Nosema ceranae* a nyári szezonban volt domináns, és a vizsgálataim adatai azt igazolják, hogy a *Nosema ceranae* egész évben domináns.

Annak ismeretében, hogy a *Nosema ceranae* fertőzés egész évben magasabb szinten fennmarad, az a szokványos szezonális kezelési stratégia, amit eredetileg *Nosema apis*-hoz alakítottak, nem lenne megfelelő. Ezt támasztja alá a fertőzés típusán alapuló terminológia, vagyis a „C” típusú nosemosis más, mint az „A” típusú nosemosis. Korábban a nosemosis kezelésére akkor került sor, amikor a klasszikus tünetek kora tavasszal és késő ősszel jelentkeztek. A nyári hónapokban Magyarország minden területén sok méhész figyelt meg váratlan méhcsalád-gyengülést és

elhullást. Mivel nem számítottak a *Nosema ceranae* előfordulására, ezért nem alkalmaztak semmilyen beavatkozást ellene. FORSGREN és FRIES (2010) munkája szerint a két *Nosema* faj között nem lehetnek szignifikáns különbségek a patogenitásban, azonban az egyetlen típushoz idomult kezelési stratégia lehetővé tette a *Nosema ceranae* terjedését. Ez utóbbit más közlemények is megerősítették (MARTÍN-HERNÁNDEZ és mtsai 2011), (HIGES és mtsai 2013), (WILLIAMS és mtsai 2014) és (VAN DER ZEE és mtsai 2014), ezért javaslom a *nosema* fertőzöttség rendszeres ellenőrzését nyári időszakban is.

Tanulmányom eredményei alapján MEANA és munkatársai (2010) javaslatát megerősítem a méhcsaládok egészségi állapotának felmérésével kapcsolatban, ami szerint a fertőzött méhegyedek aránya megbízhatóbb módszer lehet a méhcsalád fertőzöttségi szintjének megállapítására. Ez különösen fontos, mert a *Nosema ceranae* egy egész évben létező probléma. A kijáró méhek mintázásával végzett proaktív monitorozás egy jobb ellenőrzési módszer a *nosemosis* ellenőrzésére, mint a benti dolgozók mintázásával végzett vizsgálati módszer. A méhcsaládok veszélyeztetése és zavarása szempontjából harminc-harminc egyedszamos vizsgálatot javaslok. Véleményem szerint ez az a mintaméret, amit gyakorlatilag bármilyen, az évszaknak megfelelő népességű családtól elvehető komolyabb veszteség nélkül. Azonban a vizsgálatom során sem időzítettem téli hónapra mintázást. Egyrészt, mert télen általában nincsenek kijáró méhek, másrészt télen a benti méhek mintázása kaptárbontással járna, ami olyan drasztikus zavarást jelent egy család esetében, ami már visszafordíthatatlan következményekkel járhat.

ANTÚNEZ (2009) megállapította, hogy a *Nosema spp.* fertőzés következtében a méhekben a vitellogenin szint csökken, különösen a *Nosema ceranae* fertőzés esetén. NELSON (2007) megállapította, hogy a méhekben a vitellogenin befolyásolja a méhek kijárási, gyűjtögetési viselkedését. Kutatási eredménye szerint minél alacsonyabb a méhek

vitellogenin szintje, annál korábban válnak kijáró méhekké. Az előbbi két publikációból arra lehet következtetni, hogy a *Nosema ceranae*-vel megfertőződött méhegyedek vitellogenin szintje lecsökken, ennek következtében korábban válnak kijáró méhekké. Ha ez a következtetés igaz, akkor ez magyarázatot ad arra is, hogy a benti dolgozó méhegyedeknél miért magasabb a kijáró méhekből származó méhmintákban a fertőzött méhegyedek aránya. Ha a méhcsaládon belül a *N. ceranae* fertőzés hatására eltolódik az élettani arány a bent dolgozó és a kijáró méhek között (az utóbbiak javára), akkor ez problémát okozhat a fiasítás gondozásában. Véleményem szerint a probléma először az idősebb, már fedett fiasítás gondozásában merül fel, ugyanis, ha *Nosema* spórás pollennel a legfiatalabb dajkaméhek fertőződnek meg, azok esetében is, ANTÚNEZ (2009) publikációja szerint a fertőződéstől eltelt hetedik napra lesz szignifikánsan alacsonyabb a vitellogenin szint. Hétnapos korában a benti méhek már nem a fiasítás etetésével foglalatostkodnak, de fontos szerepük van az idősebb fiasítás takarásában. A takarás nélkül maradó fiasítás megfázik, elpusztul. Ha a család takarító hajlama ezt nem küszöböli ki, akkor további méhbetegségek is kialakulhatnak a családban. A *N. ceranae* fertőzéstől korábban kijáróvá vált méhek véleményem szerint több okból kifolyólag is rövidebb életűek lesznek, mint azok a társaik, akik a normális életkorukban, *nosema* fertőzéstől mentesen, a 21 napos koruktól válnak kijáró méhekké. Az egyik alapvető ok, hogy vitellogenin szint csökken a *nosema* fertőzés következtében, az a tökéletlen emésztésből fakad. Az ilyen egyed vélhetően minőségi éhezésben, energia deficitben szenved, miközben „gyűjtő bogárként” sokkal intenzívebb aktivitású, mint a benti társai. Az intenzívebb aktivitás mellett, a tökéletlen emésztés miatt a regenerálódás is tökéletlenebb. Ezek az egyedek gyorsabban kopnak, idővel enerváltabban repülnek. Vagy elgyengülés közben haza sem érnek a repülésből, vagy az enervált, lassabb repülésük miatt, hamarabb esnek áldozatul a ragadozóiknak. Ezt a feltételezést alátámasztja HIGES és mtsai.

(2008a) közleménye, amelyben publikálták, hogy a gyurgyalag (*Merops apiaster*) köpetében jellemzően megtalálható a *Nosema ceranae*.

Véleményem szerint, ha a méhcsalád *Nosema* fertőzöttségét időben észreveszik, akkor a dolgozatomban fentebb példaként említett csersav kezelésből adódó peritrof hártya vastagodás nem egyedi, hanem méhcsalád szinten segíthet a gyógyulásban. Ehhez azonban kell a család jó takarító hajlama. A takarító méhek a takarítás során meg fognak betegedni, de a fertőzés elhatalmasodása elodázódik. Ha takarítás intenzitása nagyobb, mint a spórák kaptáron belüli terjedése, akkor a meggyógyulhat a család.

A DNS-kinyeréséhez és tisztításához a kereskedelmi forgalomban lévő szöveti lizátort és sejtörőt helyettesítettem közönséges vortex keverővel és fenol-kloroformos keverék centrifugálásával. A helyettesítő módszer kapacitása a kísérletben vizsgált nagy mintaszámhoz képest alacsonynak mondható, de a szerényebb műszerparkkal rendelkező laboratóriumok számára alkalmi vizsgálatokhoz elegendő. A TAPASZTI és munkatársai (2009) által alkalmazott PCR-RFLP módszer esetében egyszerre egy PCR termék futtatható, valamint a PCR és az elektroforézis között még két lépés szükséges, egy tisztítás és egy emésztés lépés. Az általam alkalmazott triplex PCR esetében egy PCR programban három PCR terméket is lehetett futtatni, továbbá a PCR program után közvetlenül futtatható az elektroforézis.

A nosemosis magyarországi vizsgálatait ki kell egészíteni a méhállomány százalékos fertőzöttsége és az összeomlott méhcsaládok száma közötti korreláció vizsgálatával, illetve annak alakulására vonatkozó adatok gyűjtésével. Szintén javaslom a *Nosema ceranae* által okozott méhcsalád mortalitás és a méztermelés kiesés nyomonkövetését.

5 A szerzőnek az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációi

5.1 Angol nyelvű referált folyóiratban megjelent közlemények

1. GRAY A. BRODSCHNEIDER R. ADJLANE N. BALLIS A. BRUSBARDIS V. CHARRIÈRE J.-D. CHLEBO R. F. COFFEY M. CORNELISSEN B. AMARO DA COSTA C. **CSÁKI T.** DAHLE B. DANIHLÍK J. DRAŽIĆ M. M. EVANS G. FEDORIAK M. FORSYTHE I. DE GRAAF D. GREGORC A. JOHANNESSEN J. KAUKO L. KRISTIANSEN P. MARTIKKALA M. MARTÍN-HERNÁNDEZ R. MEDINA-FLORES C. A. MUTINELLI F. PATALANO S. PETROV P. RAUDMETS A. RYZHIKOV V. A. SIMON-DELSON N. STEVANOVIC J. TOPOLSKA G. UZUNOV A. VEJSNAES F. WILLIAMS A. ZAMMIT-MANGION M. és SOROKER V. (2019): Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *Journal of Apicultural Research* **58**. (szám 4). o. 479–485.
2. HUANG S. K. **CSÁKI T.** DOUBLET V. DUSSAUBAT C. EVANS J. D. GAJDA A. M. GREGORC A. HAMILTON M. C. KAMLER M. LECOCQ A. MUZ M. N. NEUMANN P. ÖZKIRIM A. SCHIESSER A. SOHR A. R. TANNER G. TOZKAR C. Ö. WILLIAMS G. R. WU L. ZHENG H. és CHEN Y. P. (2014): Evaluation of Cage Designs and Feeding Regimes for Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Laboratory Experiments. *Journal of Economic Entomology* **107**. (szám 1). o. 54–62.
3. WILLIAMS G. R. ALAUX C. COSTA C. **CSÁKI T.** DOUBLET V. EISENHARDT D. FRIES I. KUHN R. MCMAHON D. P. MEDRZYCKI P. MURRAY T. E. NATSOPOULOU M. E. NEUMANN P. OLIVER R. PAXTON R. J. PERNAL S. F. SHUTLER D. TANNER G. VAN DER STEEN J. J. M. és

- BRODSCHNEIDER R. (2013): Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research* **52**. (szám 1). o. 1–36.
4. **CSÁKI T. HELTAI M. MARKOLT F. KOVÁCS B. BÉKÉSI L. LADÁNYI M. PÉNTEK-ZAKAR E. MEANA A. BOTÍAS C. MARTÍN-HERNÁNDEZ R. és HIGES M.** (2015): Permanent prevalence of *Nosema ceranae* in honey bees (*Apis mellifera*) in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica* **63**. (szám 3). o. 358–369.
 5. **CSÁKI T. HELTAI M. és SZABÓ GY.** (2011): The opportunities of large scale beekeeping in Hungary. *Hungarian Agricultural Research: Environmental Management Land Use Biodiversity* **20**. (szám 4). o. 4–8.

5.2 Magyar nyelvű referált folyóiratban megjelent közlemények

1. **CSÁKI T. HELTAI M. és BÉKÉSI L.** (2011): Labor- és szabadföldi kísérletek a mézelő méhekkel. *Animal Welfare Etológia És Tartástechnológia* **7**. , (szám Klnsz). o. 209–214.
2. **CSÁKI T. HELTAI M. és SZABÓ GY.** (2009): A nagyüzemi méhészkedés lehetőségei Magyarországon. *Animal Welfare Etológia És Tartástechnológia* **5**. (szám 4). o. 423-430.
3. **CSÁKI T. és Oreskovic G.** (2009): A nagyüzemi méhészkedés feltételei egy Amerikai Egyesült Államokbeli (Wisconsin és Florida) méhészet alapján. *Animal Welfare Etológia És Tartástechnológia* **5**. (szám 3). o. 209-230.

5.3 Magyar nyelvű könyv, szerkesztőként

5. **BROSS P. CSUJA L. HEGEDŰS D. RÁDI T. SZABÓ GY. CSÁKI T. (szerk.)** (2015): Méhegészségügy az ökológiai méhészetben. *Ökológiai*

Mezőgazdasági Kutatóintézet, Budapest, Magyarország. ISBN: 9786158024716

6. BROSS P. CSUJA L. ERDÉLYI T. RÁDI T. SZABÓ GY. CSÁKI T. (szerk.) (2015): Szakmai feladatok az ökológiai méhészetben. Ökológiai Mezőgazdasági Kutatóintézet, Budapest, Magyarország. ISBN: 9786158024709

5.4 Magyar nyelvű könyvrészlet

1. CSÁKI T. (2015): Varroa atka elleni ökológiai védekezési módszerek on-farm vizsgálata. In: DREXLER D. (szerk.) On-farm kutatás 2014. A harmadik év eredményei. Ökológiai Mezőgazdasági Kutatóintézet, Budapest, Magyarország. o. 97-110.
2. DREXLER D. PAPP O. CSÁKI T. (2015): Az ÖMKi on-farm kutatási hálózata. In: DREXLER D. (szerk.) On-farm kutatás 2014: A harmadik év eredményei. Ökológiai Mezőgazdasági Kutatóintézet, Budapest, Magyarország. o. 2-3.
3. CSÁKI T. DREXLER D. (2014): Varroa atka elleni ökológiai védekezési módszerek on-farm vizsgálata. In: DREXLER D. (szerk.) On-farm kutatás 2013: A második év eredményei. Ökológiai Mezőgazdasági Kutatóintézet, Budapest, Magyarország. o. 139-146.
4. DREXLER D. PAPP O. CSÁKI T. (2014): Az ÖMKi on-farm kutatási hálózata. In: DREXLER D. (szerk.) On-farm kutatás 2013: A második év eredményei. Ökológiai Mezőgazdasági Kutatóintézet, Budapest, Magyarország. o. 2-3.
5. DREXLER D. PAPP O. CSÁKI T. (2013): Az ÖMKi on-farm kutatási hálózata. In: DREXLER D. (szerk.) On-farm kutatás 2012: Az első év eredményei. Ökológiai Mezőgazdasági Kutatóintézet, Budapest, Magyarország. o. 2-3.

5.5 Konferencia kiadványban megjelent közlemények

5.5.1 Angol nyelvű előadás

1. **CSÁKI T. DREXLER D (2016):** Hungarian on - farm research program for Varroa control in organic beekeeping. Madarász, B; Tóth, A (szerk.) International Conference on Conservation Agriculture and Sustainable Land Use : Book of Abstracts. Budapest, Magyarország : MTA CSFK Földrajztudományi Intézet o. 27-27.
2. **CSÁKI T. DREXLER D (2015):** Hungarian on-farm research program for Varroa control in organic beekeeping. ACTA FYTOTECNICA ET ZOOTECHNICA 18. o. 157-159.
3. **CSÁKI T. DREXLER D (2014):** Hungarian on-farm research program for Varroa control in organic beekeeping. Rahmann, G; Aksoy, U (szerk.) Building Organic Bridges. Proceedings of the 4th ISOFAR Scientific Conference at the Organic World Congress and 18th IFOAM ORGANIC WORLD CONGRESS, Braunschweig, Németország: Johann Heinrich von Thünen-Institut (2014) o. 583-586. , 4 p.
4. **CSÁKI T. DREXLER D (2013):** On-farm research program for Varroa control in organic beekeeping. In: Dóra, Drexler (szerk.) 4th International Conference on Organic Agriculture Sciences (ICOAS) Budapest, Magyarország, Eger, Magyarország o. 32
5. **CSÁKI T. KRISTÓF É. (2012):** The domination of medical treatments' budget on the hungarian national program for beekeeping. REVIEW ON AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT 2012 : 1 O. 159-163.
6. **CSÁKI T. HARKA L. BÉKÉSI L. SÜTŐ J. (2012):** Evaluation of protein utilization of a pollen substitute and a natural pollen mixture by measuring total protein content of the honeybee (*Apis mellifera*). In: Benjamin, Barth; Holger, Scharpenberg; Robin, FA Moritz (szerk.) The Fifth European Conference of Apidology. Bern, Svájc: University of Bern Paper: P.3.26

7. **CSÁKI T. HARKA L. BÉKÉSI L.** (2012): Changes of the two year COLOSS Questionnaire in Hungary. COLOSS Workshop on monitoring of colony losses 2011-2012 - temporal and spatial patterns. o. 7 Paper: ECOST-MEETING-FA0803-011012-014080
8. **CSÁKI T. BÉKÉSI L. MARKOLT F.** (2012): The reliability of diagnosing and a theory of reducing *Nosema* infections in the Honey bees COLLOS Workshop on *Nosema*, from knowledge to experimental setup o. 13 Paper: ECOST-MEETING-FA0803-030312-014083
9. **CSÁKI T. SCHILLER M. BÉKÉSI L.** (2012): Treatment efficiency in higher need of protein sources. COLOSS Workshop on honey bee nutrition. Szabadka, Szerbia (2012) O. 29 Paper: ECOST-MEETING-FA0803-151012-014146
10. **WILLIAMS GR. ALAUX C. CSÁKI T. DOUBLET V. EISENHARDT D. KUHN R. MCMAHON DP. MURRAY TE. NATSOPOULOU ME. NEUMANN P.** (2012): Recommendations from the COLOSS BEEBOOK for maintaining adult workers in laboratory cages. Benjamin, Barth; Holger, Scharpenberg; Robin, FA Moritz (szerk.) The Fifth European Conference of Apidology. Bern, Svájc: University of Bern o. 240
11. **CSÁKI T. SZALAINÉ MÁTRAI E. BÉKÉSI L.** (2011): Introduction of some methods and use of lab and field work with honey bees in hoarding cages. COLOSS Workshop on diagnostic surveys o. 20. ECOST-MEETING-FA0803-250811-008757
12. **CSÁKI T. SZALAINÉ MÁTRAI E. BÉKÉSI L.** (2011): Wintering report from Hungaryan apiaries 2009/2010. COLOSS Workshop: Coloss questionnaire from question formulation to data analysis. o. 5 Paper: ECOST-MEETING-FA0803-210311-006292

5.5.2 Magyar nyelvű előadás

1. **CSÁKI T.** (2016): *Nosema apis* és *ceranae* kialakulása, kezelése. NÉBiH Méhegészségügyi továbbképzés, Pécs, 2016.02.19.

2. **CSÁKI T. HELTAI M. BÉKÉSI L. SZALAINÉ MÁTRAI E. HIGES M. MARTÍN-HERNÁNDEZ R. MEANA A.** (2011): A *Nosema apis* és a *Nosema ceranae* eloszlása Magyarországon a 2010 során gyűjtött méhminták alapján. Akadémiai beszámolók: Paraziológia, állattan, halkórtan o. 32

5.5.3 Angol nyelvű poszter

1. **CSÁKI T. DREXLER D** (2015): Hungarian on-farm research program for Varroa control in organic beekeeping. 5th International Conference on Organic Agriculture Sciences., Bratislava, Szlovákia: 2015.10.14-2015.10.17.
2. **CSÁKI T. DREXLER D** (2014): Hungarian on-farm research program for Varroa control in organic beekeeping. 18th IFOAM World Congress, ICC, and 4th ISOFAR Scientific Conference at the Organic World Congress 13-15 October 2014