



EESTI MAAÜLIKOOL
Põllumajandus- ja keskkonnainstituut

Aile Rummel

**EBI FUNGITSIIDI MÕJU NÄRVIMÜRGIST PÕHJUSTATUD
SUBLETAALSETELE HÄIRETELE KIMALASTES**
THE EFFECT OF AN EBI FUNGICIDE ON DISORDERS CAUSED
BY A NERVE POISON IN BUMBLEBEES

Bakalaureusetöö
Põllumajandussaaduste tootmise ja turustamise õppekava

Juhendajad: Risto Raimets, *MSc*

Teadur Reet Karise, *PhD*

Tartu 2018

Eesti Maaülikool Kreutzwaldi 1, Tartu 51014		Bakalaureusetöö lühikokkuvõte	
Autor: Aile Rummel		Õppekava: Põllumajandussaaduste tootmine ja turustamine	
Pealkiri: EBI FUNGITSIIDI MÕJU NÄRVIMÜRGIST PÕHJUSTATUD SUBLETAALSETELE HÄIRETELE KIMALASTES			
Lehekülgi: 31	Jooniseid: 4	Tabeleid: 0	Lisasid: 2
<p>Osakond: Põllumajandus- ja keskkonnainstituut, Taimeterwise õppetool</p> <p>Uurimisvaldkond: B390</p> <p>Juhendajad: Risto Raimets MSc, teadur Reet Karise PhD</p> <p>Kaitsmiskoht ja -aasta: Tartu, 2018</p>			
<p>Kimalased on kiletiivaliste seltsi kuuluvad putukad, kes toituvad õietolmust ja nektarist. Mesilaslaadsete arvukus on hakanud langema ning sellele on arvatud mitmeid põhjuseid: monokultuurid, elupaikade killustumine, pestitsiidide laialdane kasutamine. Eestis ja mujal maailmas on leitud õietolmust võetud proovidest erinevate pestitsiidide jääke. Mitme kemikaali kokkusattumisel võib tekkida sünergia, mis mõjutab organismi toitumist, käitumist ja teisi parameetreid.</p> <p>Töö eesmärgiks on välja selgitada fungitsiid tebukonasooli ja insektitsiidi tau-fluvalinaadi ja nende kahe aine segu mõju kimalaste elueale, toitumisele ja immuunsüsteemile. Katses kasutati karukimalasi, keda hoiti üheksa päeva inkubaatoris ning jälgiti nende toitumist ja suremust. Lisaks mõõdeti karukimalaste melanisatsioonitaset, peale kindla aja möödumist pestitsiidiga kokkupuutel. Uurimistöö tulemusena ei mõjutanud subletaalsed doosid kimalaste eluiga ja melanisatsiooni taset. Erinevus avaldus tarbitud toidu hulgas, kui kontrollgrupp tarbis oluliselt suurema koguse söödasiirupit, võrreldes teiste töötlusgruppidega. Lisaks puudus katses kasutatud kahe pestitsiidi vahel sünergeetiline mõju.</p> <p>Töö tulemusest järeldab autor, et Eesti põllumajandusmaastikest leitud pestitsiidi jääkide kogused ei ole kimalastele surmavad, kuid omavad siiski subletaalseid mõjusid, mis põhjustavad putukas stressi.</p>			
Märksõnad: karukimalane (<i>Bombus terrestris</i> L.), püretroid, EBI fungitsiid, sünergism			

Estonian University of Life Sciences		Abstract of bachelor's Thesis	
Author: Aile Rummel		Speciality: Production and marketing of agricultural products	
Title: THE EFFECT OF AN EBI FUNGICIDE ON DISORDERS CAUSED BY A NERVE POISON IN BUMBLE BEES			
Pages: 31	Figures: 4	Tables: 0	Appendixes: 2
Department: Institute of Agricultural and Environmental Sciences Uurimisvaldkond: B390 Supervisors: Risto Raimets <i>MSc</i> , Reet Karise <i>PhD</i> Place and date: Tartu, 2018			
<p>Bumblebees are pollinating insects belonging to the order Hymenoptera. They feed on pollen and nectar. The abundance of bees has begun to decline and it's supposed because of several causes: monocultures, fragmentation of habitats, and the widespread use of pesticides. Variety of pesticide residues have been found in samples of pollens collected in Estonia and elsewhere in the World. Different pesticide cocktails may cause a synergy which may lead to changes in bee nutrition, behavior and other parameters.</p> <p>The aim of this work is to determine the effects of the fungicide tebuconazole and insecticide tau-fluvalinate and the mixture of these two substances on the lifespan of the bumblebees, their nutrition and immune system. The experiment is carried out using buff-tailed bumblebees (<i>Bombus terrestris</i>), which were held in an incubator throughout the experiment. During nine days their food consumption and mortality was daily monitored. In addition, bumblebee melanization level was measured after a certain time following their contact with the pesticide. As a result of the study, sublethal doses did not affect the lifespan of the bumblebees nor their melanization level. Differences appeared in the amounts of consumed food as the control group consumed significantly more syrup compared to other treatment groups. Furthermore, there was no synergistic effect between the two pesticides used in the feeding test.</p> <p>From the results of the work, the author concludes that the quantities of pesticide residues found in Estonian agricultural landscapes are not fatal to bumblebees but may induce sublethal effects and stress, which may lead to colony collapse in perspective.</p>			
Keywords: bumblebee (<i>Bombus terrestris</i> L.), pyrethroid, EBI fungicide, synergism			

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Kimalased	7
1.2. Tolmeldajate arvukuse langus	7
1.3. Kokkupuute võimalus pestitsiididega	8
1.4. Subletaalsed doosid	10
1.5. Pestitsiidide koostoime	10
2. MATERJAL JA METOODIKA.....	13
2.1. Kimalased	13
2.2. Pestitsiidid	13
2.3. Töötlused	13
2.4. Pestitsiidide mõju kimalaste toitumisele.....	14
2.5. Pestitsiidide mõju kimalaste suremusele	14
2.6. Pestitsiidide mõju kimalaste immuunsüsteemile	14
2.7. Andmete statistiline analüüs	15
3. TULEMUSED	16
3.1. Pestitsiidide mõju ja koosmõju suremusele.....	16
3.2. Pestitsiidide mõju toitumisele	17
3.3. Immuunvastuse tase	19
4. ARUTELU.....	20
KOKKUVÕTE.....	23
SUMMARY.....	24
KASUTATUD KIRJANDUS	25
LISAD	29
Lisa 1. Kimalaste poolt tarbitud keskmine toidu kogus päevade lõikes.	30
Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavakstegemiseksning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta	31

SISSEJUHATUS

Mesilaselaadsed putukad on ühed kõige olulisemad putuktolmeldajad. Putukate tolmeldamisteenust kasutab ligi 90% õitsvatest taimedest (Saunders 2018).

Tolmeldajate arvukus on viimastel aastakümnetel olnud languses. Selle põhjusteks on pakutud näiteks elupaikade killustumist, monokultuure ning laialdast pestitsiidide kasutamist (Rice 2017). Põllumehed kasutavad suurema saagi saamiseks pestitsiide, mis võivad ka mõjutada mesilasi. Eestis kui ka mujal maailmas võetud erinevatest mesindussaaduste proovidest on leitud pestitsiidijääke, mis on ületanud piirnorme (Karise aastaaruanne 2014; Mullin *et al.* 2010). Kokkupuude pestitsiididega ei pruugi koheselt tähendada mesilasele surma, vaid võib tingida muutusi tema korjekäitumises, toitumises ja muudes näitajates, mis on olulised ühe organismi normaalseks funktsioneerimiseks. Lisaks on tõestatud, et erinevate pestitsiidide segud on oluliselt ohtlikumad kui üksikud ained (Johnson *et al.* 2013; Raimets *et al.* 2017).

Pestitsiidide mõjud võivad mesilastes avalduda väga paljudel erinevatel viisidel. Muutused käitumises (Thompson 2003) toovad kaasa korje ja perede juurdekasvu vähenemise. Muutused immunsüsteemi (Brandt *et al.* 2016) tasemel viivad selleni, et hukuvad mesilased, kes tavalises situatsioonis suudavad ühe või teise haigustekitajaga toime tulla. Uuritud on küll mitmeid erinevaid pestitsiide ja nende segusid, kui samas on olemas näiteid sellest, et ka samasse toimeainegrupi kuuluvad pestitsiidid võivad putukatele mõjuda täiesti erinevalt (Raimets *et al.* 2017). Seetõttu, et aru saada ja selgitada pestitsiidide segude mõju mesilaselaadsetele putukatele, tuleb neid alati uurida regioonispetsiifiliselt (igas piirkonnas enam levinud) ja ka vastavates doosides nagu need reaalselt mesilastega kokku puutuda võivad. Lisaks on oluline selgitada ainete mõju mitmel erineval tasandil.

Käesolevas töös uuriti kahe Eestis laialdaselt kasutatava pestitsiidi mõjusid karukimalaste (*Bombus terrestris* L.) elueale, toitumisele ja immuunvastusele. Kasutatud pestitsiidid olid fungitsiid tebukonasool ja insektitsiid tau-fluvalinaat. Tebukonasool on põllumajanduses kasutatav EBI-tüüpi agrokemikaal, millega tõrjutakse taimede seenhaigusi. Ergosterooli biosünteesi inhibiitor (EBI) fungitsiid takistab mesilase kehas olevate toksiliste lagundavate ensüümide tööd ning selle tulemusena muutub mesilane teiste pestitsiidide suhtes, nagu näiteks tau-fluvalinaat, haavatavamaks (Meled *et al.* 1998). Tau-fluvalinaat on kahjurite hävitamiseks mõeldud kemikaal põllumajanduses, ning lisaks kasutatakse seda ka mesinduses varroalesta tõrjel.

Töö hüpoteesid:

- insektitsiid mõjutab kimalaste toitumiskäitumist, eluiga ja immuunsüsteemi
- fungitsiid ei mõjuta kimalaste toitumiskäitumist, eluiga ega immuunsüsteemi
- fungitsiidi tebukonasool tõstab tau-fluvalinaadi toksilisuse taset kimalastes

Töö eesmärgiks on välja selgitada tebukonasooli, tau-fluvalinaadi ja nende kahe aine segu subletaalsete dooside mõju kimalaste elueale, toitumisele ja immuunsüsteemile.

Tänuavaldus isikutele, kes on kaasa aidanud mu bakalaureusetöö valmimisele:

Risto Raimets, kes aitas mind katsete läbiviibimisel ning ühtlasi oli minu lõputöö juhendaja

Reet Karise, kes aitas andmeanalüüsiga ning ühtlasi oli minu lõputöö kaasjuhendaja

Anne Must, kes aitas katsete läbiviimisel

Enno Merivee, kes aitas katsete läbiviimisel

Johanna Rummel, kes aitas mind tõlkimisel

Käesolevat uurimustööd on rahaliselt toetanud HTM IUT36-2 ja MEM rakendusüriing T13055PKTK.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Kimalased

Kimalased (*Bombus sp.*) on kiletiivaliste seltsi kuuluvad putukad, kelle kehaehitus koosneb peast, rindmikust ja tagakehast. Kimalastel on kuus jalga, mis kinnituvad rindmiku külge ja nende lennuvõime tagavad seljal asetsevad kaks tiivapaari (Chinery 2005). Emakimalased, kes on talve üle elanud ja viljastatud, rajavad kevadel üheaastaseid peresid (Chinery 2005). Kimalaste keha katavad karvad, mis moodustavad erinevaid värvikombinatsioone. Kimalasi saab liigitada vastavalt seljalt leiduvate värvide järgi. Nende seljalt võib leida erinevaid värvikombinatsioone mustast, valgest, punasest, oranžist, hallist, kollasest või pruunist. (Viik, Mänd 2012)

Kimalased toituvad nektarist ja õietolmust, millega toidavad ka vastseid. Nad on olulised looduslike taimede kui ka põllukultuuride tolmeldajad (Sherry, Strang 2014). Kimalased külastavad ühe korjelennu käigus mitut erinevat taimeliiki. Nad vajavad toiduresse kevadest- sügiseni. Kimalaste eeliseks meemesilaste ees on tihedam karvkate, mis võimaldab toitu koguda ka vihmaste ja jahedamate ilmadega, mil nad suudavad läbi viia ka tolmeldamist (Viik, Mänd 2012). Kimalaste korjekäitumises on täheldatud, et nad eelistavad toitu koguda taime suurematelt õitelt (Stout 2000).

1.2. Tolmeldajate arvukuse langus

Tolmeldajate arvukus on Euroopas, Kanadas ja Ameerika Ühendriikides märgatavalt langenud (Neumann, Carreck 2010; Currie *et al.* 2010). Euroopa statistika andmetel on 68 kimalase liigist 24% väljasuremisohus (Euroopa komisjon 2014). Euroopas on Suurbritannia näitel väga hästi

dokumenteeritud kimalaste arvukuse muutused alates 1960ndatest aastatest (Williams 1996). Sama tendentsi näitab ka pikema perioodi võrdlus (Marshall *et al.* 2018).

Arvukus on muutunud kõige enam just kitsa toiduvalikuga kimalastel (Williams 1996). Arvukuse muutused on sageli kaasas käinud just põllumajanduslike kultuuride kasvatamise muutustega. Näiteks Inglismaal vähendati drastiliselt punase ristiku kasvatamist, mille tagajärjel hakkasid kiiresti kaduma eelkõige pikasuiselised kimalaseliigid (Williams 1996). Ohustatud liikide seas on ka Eestis elav kõige pikemate suistega kimalane ristikukimalane (*Bombus distinguendus*) (Hatfield 2016). Ameerika Ühendriikides leiduva kimalase *B. affinis* arvukus on 20 aastaga vähenenud koguni 90%. Põhja- Ameerikas on mitme kimalase liigi nagu näiteks *B. affinis*, *B. terricola*, *B. pensylvanicus* arvukus drastiliselt langenud (Rice 2017).

Uuringud on näidanud, et eelmainitud kimalaste arvukuse vähenemist on enim mõjutanud liigne pestitsiidide kasutamine ja elu- ja toitumispakade kadumine. Pestitsiidid mõjutavad nii üksikuid kimalasi kui ka terveid peresid (Szabo *et al.* 2012). Eelnimetatutele lisaks räägitakse viimasel ajal ka monokultuuride liigset kasvatamist ning erinevate parasiitide ja haiguste leviku muutusi (Rice 2017).

1.3. Kokkupuute võimalus pestitsiididega

Kimalased koguvad endale toiduvarusid korjemaalt, mille tähtsateks tunnusteks on mitmekesine taimeliikide olemasolu ja korjeala kaugus tarust. Mida lähemal on looduses õitsvad taimed tarudele, seda suurema koguse nektarit ja õietolmu viivad kimalased tarusse. Põllumajanduses kasutatavad pestitsiidid on ohuks kimalastele ja teistele tolmeldajatele, kes õisi korjelendude käigus külastavad (Brown 2017).

Eestis on läbi viidud uuring, mille tulemused näitasid, et mitmeid pestitsiidide jääke on leitud nii mesilastes, vahas, õietolmus ja suiras. (Karise aastaaruanne 2014). Tolmeldajad puutuvad pestitsiididega kokku erinevatel viisidel. Üheks kokkupuute viisiks on kimalase poolt õiest

kogutud juba pestitsiidi jääke sisaldav nektar ja õietolm, mille kimalane viib tarusse (Rortais *et al.* 2017). Põhja-Ameerikas mesilaste peredest kogutud 350 õietolmu proovist leiti keskmiselt 7,1 erineva pestitsiidi jääki ühe proovi kohta ning enim leitud pestitsiid oli fluvalinaat, mida esines 309 õietolmust võetud proovist (Mullin *et al.* 2010).

Mesilaslaadsed putukad, nii meemesilased kui ka kimalased, kasutavad järglaste kasvatamiseks õietolmu ja nektari segust moodustatud suira (Riis, Karise 2015). Taimekaitsevahendite kasutamine põldudel on reguleeritud erinevate seadustega, millest peab taimekasvataja kinni pidama. Eestis üks enim kasvatatav õitsev ning tolmeldajatele atraktiivne põllukultuur on raps, mida pritsitakse erinevate pestitsiididega, tõrjumaks erinevaid haiguseid ja kahjureid (Brown 2017). Pestitsiidide väärkasutus võib viia tervete mesilasperede hukkumiseni (Simson 2012).

Kuigi pestitsiide kasutatakse peamiselt vaid kultuurtaimedel, kasvab põldude sees ka palju umbrohtusid, mis paratamatult saavad ka pestitsiididega kokku, ning millel mesilased palju korjel käivad. Lisaks on näidatud, et pestitsiidijäägid levivad põldudelt kaugemale eemale nii põllu mulla lendumise, põhjavette leostumise kui ka pinnasevee liikumise kaudu maad mööda või aurumise läbi õhus (Krupke *et al.* 2012; Hladik *et al.* 2016). Samuti puutuvad mesilased kokku pestitsiidide jääkidega läbi puhitud seemnete külvil tekkinud tolmu kandumise ümbritsevatele aladele (Pohorecka *et al.* 2013; Kasiotis *et al.* 2014).

Lisaks pestitsiididele on nii looduslike tolmeldajate kui ka meemesilaste arvukuse üheks languse põhjusteks pakutud ka erinevaid haiguseid. Haiguste ja parasiitide tõrjumine mesiniku poolt aitab omakorda kaasa kokkupuutele pestitsiididega, kuna mesinduses kasutatavatel ravimitel on toimeaineks sageli samad ained, mida kasutatakse põldude pritsimisel (Johnson *et al.* 2013). Varroatoosi arvatakse üheks peamiseks arvukuse languse teguriks ning mida põhjustab Varroa lest, kes liigub täiskasvanud mesilasega haudmesse enne selle kaanetamist. Pärast haudme kaanetamist muneb varroa lest kärjekannus olevale vaglale 4-6 muna, kellest esimene on isaslest ning ülejäänud emaslestad. Emaslest ja tema vastsed toituvad mesilasvaglast ja hiljem arenenud nukust. Nende väljumine kärjekannust toimub koos mesilasega. Haudmes nakatunud mesilane võib kannatada arengukahjustuste all – deformeerunud tiivad, mille tõttu ei saa mesilane lennata. Võrreldes lestavaba mesilasega on tema eluiga oluliselt lühem. Kui lestade arvukus tõuseb tarus

kõrgeks, võib see põhjustada koloonia hävimist. Parasiitide ravis kasutatud toimeained kuhjuvad tarudes ning jätavad lisaks mesilastele ka mesindussaadustesse jääke. Nende kaudu puutuvad mesilased toksiliste ainetega kokku pikema perioodi jooksul (Capri *et al.* 2013; Oherd, Vari 2015).

1.4. Subletaalsed doosid

Pestitsiidide subletaalsed doosid ei pruugi mesilast koheselt tappa, kuid mõjutab tema käitumist, füsioloogiat ja arengut (Doublet *et al.* 2014). Jones *et al.* (2005) leidis oma töös, et ka erinevatel temperatuuridel on oluline mõju mesilaste füsioloogiale. On leitud, et erinevate agrokemikaalide subletaalsete dooside kasutamine madalatel temperatuuridel on väga kahjulik mesilaste bioloogilisele toimele. (Vandame, Belzunces 1998) 2015.aastal tehti katse, kus uuriti kahe patogeeni ja pestitsiidi subletaalse doosi koostoimet mesilastele. Katse tulemusena põhjustas kahe patogeeni koosmõju täiskasvanute mesilaste kiiret suremust. Samuti suurendas mesilaste suremust patogeenide ja pestitsiidi koosmõju (Doublet *et al.* 2014). Mesilaspere on võimeline tuvastama pestitsiididega saastunud korjemesilast, mistõttu ei pruugita teda tarru (López *et al.* 2017). Blacquiére *et al.* (2013) viis läbi laboratoorse katse, kus uuris pestitsiidide subletaalsete dooside mõju kimalaste toitumisele ja elueale. Katse tulemustest ta järeldas, et kasutatud neonikotinoiidide kontsentratsioonid vähendavad oluliselt kimalaste toitumist (Blacquiére *et al.* 2013).

1.5. Pestitsiidide koostoime

Erinevate pestitsiidide koostoime võib mesilastele olla oluliselt ohtlikum nende üksikute ainete mõjudest. Näiteks fungitsiidi liitmisel insektitsiidiga võib see suurendada viimase toksilisuse taset mesilases oluliselt (Thompson, Wilkins 2003). Raimets *et al.* (2017) viisid Inglismaal,

Exeteri Ülikoolis läbi katse, kus uuriti EBI fungitsiidi imazolili ja nelja erineva insektitsiidi segude mõjusid karukimalaste (*B.terrestris* L.) suremusele ja toitumisele. Katse tulemustest selgus, et fungitsiid tõstis kolme kasutatud insektitsiidi toksilisust kimalastes oluliselt, mistõttu nende suremus suurenes oluliselt. Sama töö tulemustest selgus, et kasutatud pestitsiidid ja nende segud küll vähendasid kimalaste poolt tarbitava toidu kogust, kuid sünergeetilisi mõjusid ei tuvastatud. Kreekas tehti katse, kus katsetati fungitsiidi ja insektitsiidi mõjusid eraldi ja koos nii suve kui ka talvituvate meemesilaste peal. Katse tulemustes selgus, et fungitsiidi ja insektitsiidi koosmõju mesilaste suremusele on oluliselt suurem üksikute ainete mõjudest. Lisaks selgus, et suvised mesilased on pestitsiidide mõjudele vastuvõtlikumad kui talvituvad mesilased (Meled *et al.* 2009).

Nebraska Ülikoolis uuriti erinevatesse klassidesse kuuluvate pestitsiidide koosmõjusid meemesilastele. Tulemustest selgus, et kõige tugevamat mõju meemesilaste suremusele avaldas prokloraasi ja tau-fluvalinaadi segu. Lisaks prokloraasile, sünergeerus tau-fluvalinaat teiste fungitsiididega, mille tulemusel meemesilaste suremus suurenes oluliselt (Johnson *et al.* 2013).

Tsütokroom P-450 on mesilase kehas asuv oluline ensüümide süsteem, mis aitab lagundada ja ohutuks muuta toksilisi ühendeid, nagu näiteks insektitsiidid (Johnson *et al.* 2013). EBI fungitsiidid takistavad mesilase kehas tsütokroom P-450 tööd, mistõttu on insektitsiidide detoksifikatsioon häiritud. Johnson *et al.* (2006) viisid läbi katse, mille tulemustest selgus, et piperonüülbutoksiid(PBI) kasutamisel suurenes kõigi kolme püretroidi toksilisus. Kõige suurem sünergia oli piperonüülbutoksiidil ja tau-fluvalinaadil.

Lisaks suremusele, võivad pestitsiidide subletaalsed doosid mõjutada mesilastes ka teisi parameetreid nagu näiteks immuunvastuse intensiivsust. Brandt *et al.* (2016) uurisid oma töös kolme populaarse neonikotinoidi (tiaklopriidi, imidaklopriidi ja klotianidiini) mõju mesilaste immuunsüsteemile. Selgus, et kõik kolm eelmainitud subletaalsetes doosides neonikotinoidi mõjutasid olulisel määral mesilaste immuunsüsteemi, mistõttu vähenes nende kehas hemotsüütide arv, nõrgenes kapseldumise võime ning vähenes olulisel määral antimokroobne aktiivsus mesilaste hemolümfis.

Pestitsiidide subletaalsete doosidega kokkupuutel võib mesilastes tekkida käitumishäireid ning nad võivad ka muutuda haigustele vastuvõtlikumaks. Meemesilased kes olid varasemalt töödeldud insektitsiidiga fiproniil muutusid oluliselt vastuvõtlikumaks noseematoosile mis põhjustab mesilastel kõhulahtisust (Aufauvre *et al.* 2012).

2. MATERJAL JA METOODIKA

2.1. Kimalased

Antud katses kasutatud karukimalaste tarud (N=2) osteti Belgia ettevõttest Biobest (Ilse Velden 18, 2260 Westerlo, Belgium). Kimalased olid paigutatud transportimiseks pappkasti sisse, mis oli varustatud söödaga. Tarusid hoiti pimedas ruumis, kus oli temperatuur 24 ± 1 °C.

2.2. Pestitsiidid

Töös lisati pestitsiididena söödasegudele tau-fluvalinaati kontsentratsioonis 95 µg/kg ja tebukonasooli kontsentratsioonis 412 µg/kg. Tebukonasooli kasutatakse põllumajanduses fungitsiidina, mille jääke on leitud õietolmust. Tau-fluvalinaati kasutatakse põllumajanduses insektitsiidina, aga ka mesinduses varroalesta tõrjel. Antud katses kasutatud pestitsiidi lahuste kontsentratsioonid on leitud Eesti erinevatest mesilastest võetud õietolmu proovidest (Karise aastaaruanne 2014). Töös kasutati ka tau-fluvalinaadi ja tebukonasooli segu ja kontroll-sööta.

2.3. Töötlused

Antud katse jaoks moodustati 100 minitaru (igas töötelses 25 minitaru), mis varustati kahe 2 ml eppendorffidega, mis sisaldasid söödasegu ja destilleeritud vett. Söödasegu koosnes suhkrust ja veest. Moodustatud minitarud jagati nelja töötluse rühma: tau-fluvalinaat, tebukonasool, kahe aine segu ja kontroll. Lisaks sisaldasid töös kasutatud söödasegud 1% atsetooni. Seejärel asetati väikesed minitarud inkubaatorisse, kus oli püsiv temperatuur 32° C ning õhuniiskus 60%.

2.4. Pestitsiidide mõju kimalaste toitumisele

Pestitsiidide mõju määramine kimalaste toitumisele toimus igapäevaste kaalumiste, tulemuste fikseerimise ning hiljem analüüsimise teel. Kaalumine toimus iga päev samal ajal, mille jälgimisel tuli eemaldada minitarult eppendorf ning see ära kaaluda ning kaal fikseerida. Vajadusel täideti eppendorfe uuesti siirupiga. Jälgiti ka vee olemasolu.

2.5. Pestitsiidide mõju kimalaste suremusele

Suremuse määramine toimus igapäevaste kontrollide käigus, mil tuli lugeda kui palju on ühe ööpäeva jooksul kimalasi ära surnud. Surnud kimalased eemaldati katsest.

2.6. Pestitsiidide mõju kimalaste immuunsüsteemile

Katse alguses valmistati ette söödapuurid, mis varustati juba eelnevalt mainitud söödasegude ja vett sisaldavate eppendorffidega. Kimalased jaotati töötusgruppidesse ning paigutati üksikult 24 tunniks söödaga varustatud puuridesse. Järgmisel päeval uimastati kimalased külmikus, misjärel paigutati tagakeha 3. ja 4. lüli vahele implantaat (tamiil 2 mm), et mõõta kimalaste immuunreaktsiooni tugevust. Nelja tunni möödudes eemaldati kimalastest implantaadid ning neid pildistati mikroskoobi all 3 erineva nurga alt, ning tamiili melaniseerumise taset analüüsiti programmiga NIS-Elements Analysis (D.4.40.00). Mõõdetakse värvuse tumedust skaalal 0-255, kus 0 tähistab täiesti musta ja 255 täiesti valget.

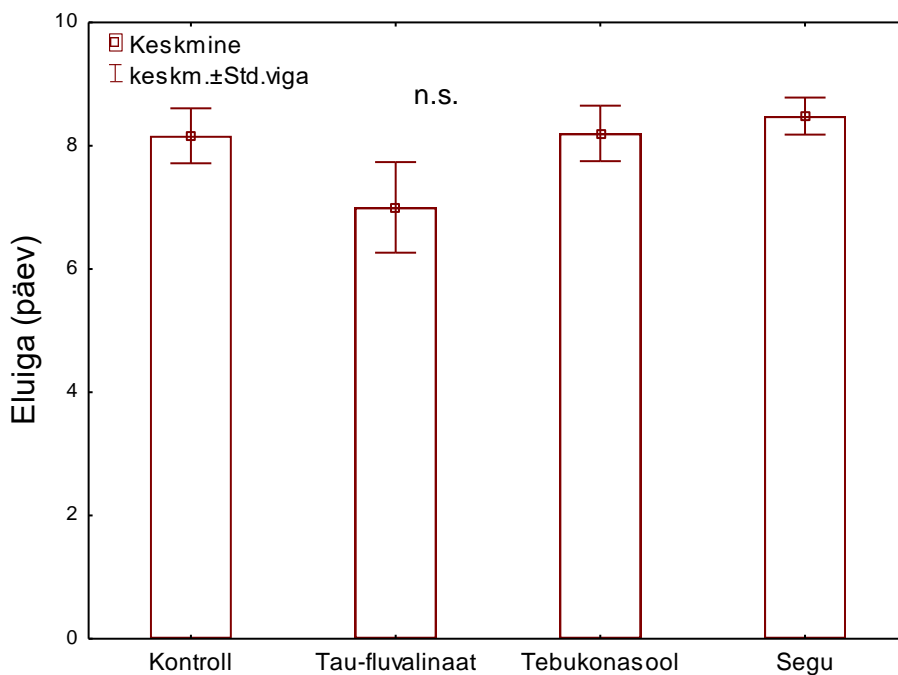
2.7. Andmete statistiline analüüs

Andmete statistilisel analüüsil kasutati programmi Statistica 13 (TIBCO Software) ning pestitsiidide mõju immuunvastusele uurimisel kasutati ühefaktorilist dispersioonanalüüsi. Gruppide omavahelisel võrdlusel kasutati *post hoc* Fischer'i testi. Toitumise ja suremuse muutuste uurimisel kasutati Kruskal-Wallise mitte-parameetrilist analüüsi koos gruppide omavahelise võrdlemisega. Kõik statistilised testid loeti oluliselt erinevaks, kui p-väärtus oli väiksem kui 0,05. Joonistel on esitatud keskmised koos standardveaga.

3. TULEMUSED

3.1. Pestitsiidide mõju ja koosmõju suremusele

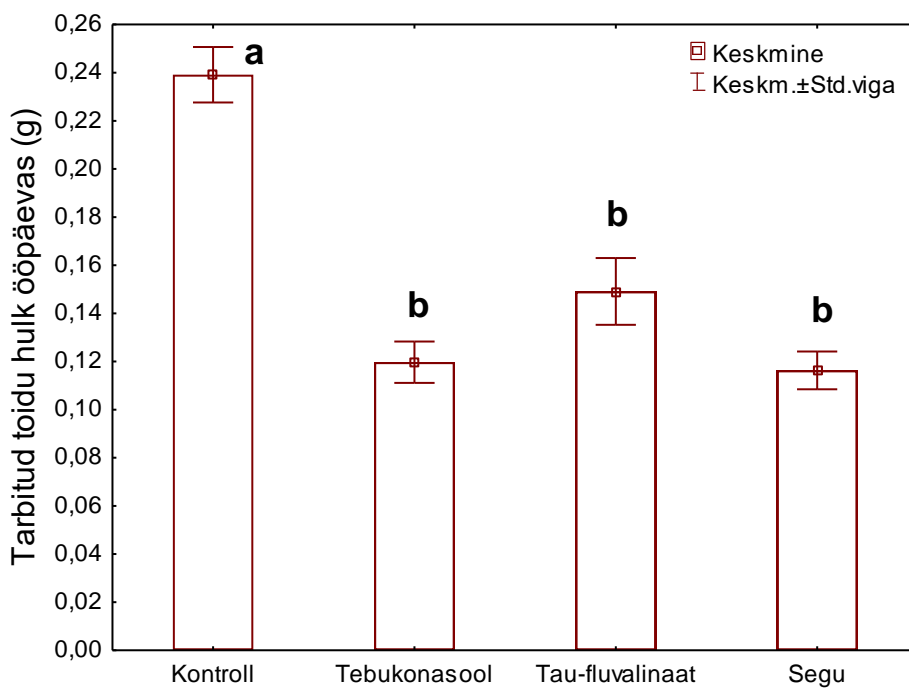
Katseperioodi 9 päeva jooksul ei ilmnenud tau-fluvalinaadi, tebukonasooli ega ka nende segul statistiliselt olulist mõju kimalaste suremusele ($KW-H(3;100) = 2,52$; $p = 0,47$) (Joonis 1). Katseperioodi jooksul varieeruvad erinevate töötluste puhul keskmine suremus $7 \pm 0,7$ ja $8,48 \pm 0,3$ päeva.



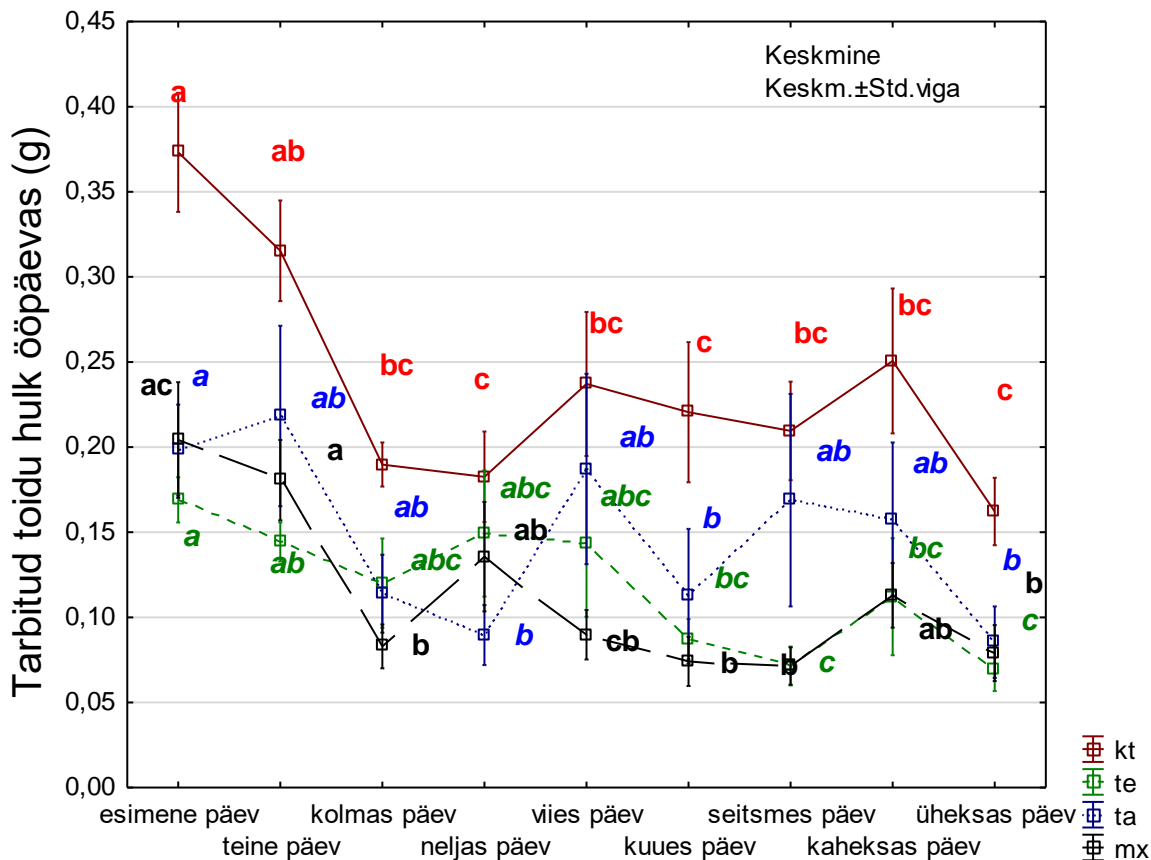
Joonis 1. Pestitsiidide ühekaupa või segu mõju kimalaste elueale 9 päeva jooksul ($p=0,47$).

3.2. Pestitsiidide mõju toitumisele

Ööpäevane sööda tarbimine sõltus töötlustest($KW-H(3;796) = 128,94; p < 0,001$). Kontrollgrupi kimalaste tarbitud toidu hulk erines oluliselt kõikide teiste gruppide kimalaste tarbitud toidu hulgast, kusjuures kumbki aine ega nende segu omavahel oluliselt ei erinenud (Joonis 2).



Joonis 2. Erinevate pestitsiidide mõju kimalaste keskmiselt tarbitud toidu hulgale ($p < 0,001$).



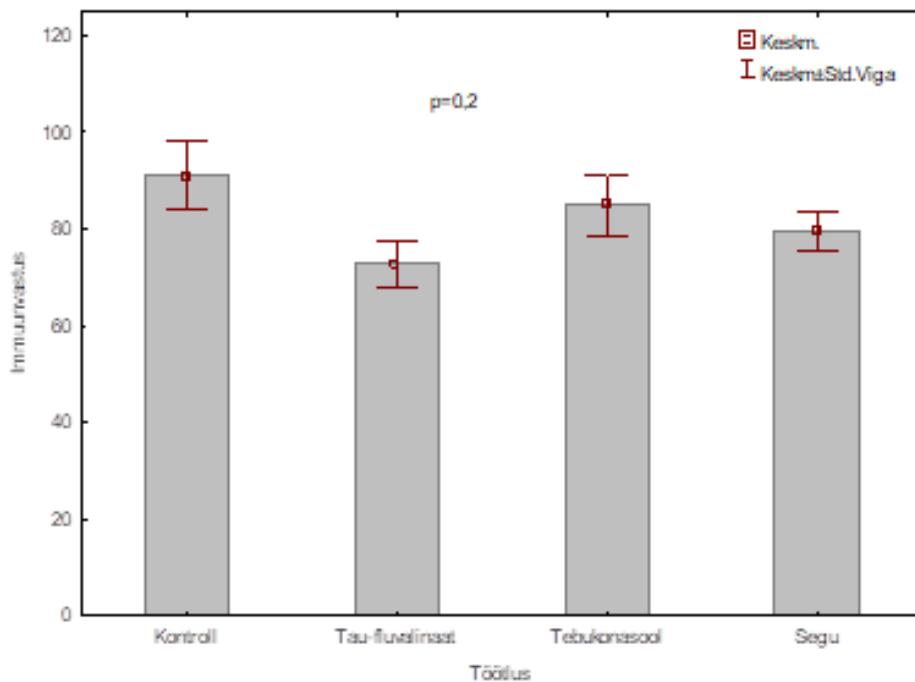
Joonis 3. Kimalaste poolt tarbitud toidu hulk ööpäevas katseperioodi iga päeva lõikes ($p < 0,01$).
 kt- kontroll; te- tebukonasool; ta- tau-fluvalinaat; mx- segu.

Iga päeva lõikes erinesid töötusgrupid üksteisest oluliselt (iga päeva kohta $p < 0,01$). Kõige suurem oli erinevus (keskmised: 0,38 kontrollil ja 0,2 tau ja tebu ning 0,217 segu puhul) esimesel päeval. Teisel päeval vähenes töötusgruppide erinevus kontrolliga võrreldes, kuid statistiliselt oluline erinevus jäi alles (Lisa1).

Iga töötusgrupi puhul jäi toidu tarbimine aja jooksul väiksemaks. Kontrollgrupi puhul ilmnas statistiliselt oluline toidu tarbimise vähenemine kolmandaks päevaks, nagu ka kahe aine segu tarbinud kimalaste puhul. Tebukonasooli tarbinud kimalaste toitumisaktiivsuse vähenemine ilmnas alles kuundal päeval ning tau-fluvalinaadi puhul neljandal päeval. Samas oli just tebukonasooli tarbivate kimalaste toimumisaktiivsus läbi kogu vaatlusperioodi väiksem (Joonis 3).

3.3. Immuunvastuse tase

Antud pestitsiidide doosid ei mõjutanud kimalaste immuunvastuse taset (ANOVA: $F(3, 61)=0,04$, $p=0,2$). Erinevate töötlusgruppide vahel puudus statistiliselt oluline erinevus.



Joonis 4. Erinevate pestitsiidide mõju kimalaste immuunvastuse tasemele (must-valgel skaalal 0-255) ($p = 0,2$).

4. ARUTELU

Antud bakalaureuse tööst selgub, et käesolevas töös kasutatud pestitsiidide kontsentratsioonid kimalaste suremust oluliselt ei mõjutanud. Samuti ei leitud mõju kimalast immunsüsteemile, kuid muutused ilmsid toitumisaktiivsuses. Kõikide töötlusvariantide puhul oli kimalaste sööda tarbimine ligi kaks korda kõrgem läbi kogu vaatlusperioodi ning kõige vähem sööta tarbisti, kui see sisaldas kahe aine segu. Samas uuritud insektitsiidi ja fungitsiidi sünergeetilist mõju ei tuvastatud.

Tebukonasoolil üksiku ainenähtena puudus oluline mõju kimalaste elueale võrreldes kontrolliga. Tau-fluvalinaat üksiku ainenähtena ei näidanud samuti olulist erinevust võrreldes kontrolliga. Tuues välja terve katseperioodi keskmise tulemuse, siis ainult tau-fluvalinaadiga töödeldud toitu tarbinud kimalased elasid võrreldes teiste töötlustega küll vähem, kuid statistiliselt oluline erinevus puudus. Samuti puudus statistiliselt oluline mõju kimalaste elueale kahe aine segu tarbimisel. Johnson *et al.* (2013) katse tulemusena oli insektitsiidil ja fungitsiidil sünergeetiline mõju, mille tulemusena langes meemesilaste eluiga oluliselt. Suurim sünergia ilmsid, kui tau-fluvalinaati kasutati segus prokloraasiga, mis kuulub samasse EBI fungitsiidide gruppi. Samuti Raimets *et al.* (2017) teatud katse tulemustes esines sünergeetiline mõju EBI fungitsiidi ja erinevate insektitsiidide subletaalsete dooside vahel. Fungitsiid avaldas sünergeetilist mõju kolme kasutatud insektitsiidiga, mille tulemusel kimalaste eluiga langes oluliselt. Antud katsete tulemused võisid erineda nii Johnson *et al.* (2013) seetõttu, et Johnsoni katses oli kasutatud kimalaste asemel meemesilasi. Meemesilased on küll samasse sugukonda kuuluvad mesilaslaadsed putukad, kuid nad on väiksemad ning nende kehas on vähem varuaineid talletatud, kui kimalastel (Thompson 2003). Võrreldes antud bakalaureusetöö katsetulemuse Raimets *et al.* (2017) tulemustega, võis kimalaste eluea pikkuse erinevuse tingida erinevus kasutatud pestitsiidide ja kontsentratsioonide vahel.

Uurides antud töös pestitsiidide mõju kimalaste keskmiselt tarbitud toidu hulgale ööpäevas, leidis erinevate töötlusgruppide vahel olulisi erinevusi. Tebukonasooliga töödeldud toitu tarbisid kimalased oluliselt vähem kui kontrollsööta tarbinud kimalased. Tau-fluvalinaadiga töödeldud toitu tarbisid kimalased võrreldes kontrollgrupiga samuti oluliselt vähem. Kontrollgrupi keskmine tarbitud toidu koguse hulk ööpäevas oli eelmainitud pestitsiididest peaaegu kaks korda kõrgem. Kahe aine segu tarbinud kimalastel sünergeetilist mõju toidu tarbimisele ei täheldatud, kuigi võrreldes kontrollgrupiga tarbisid nad toitu oluliselt vähem. Sarnase tulemuse leidis ka Raimets *et al.* (2017) oma töös, kus erinevate insektitsiidide ja fungitsiidiga töödeldud toitu tarbisid kimalased küll vähem, kuid sünergeetilist mõju ei täheldatud.

Toitumise katse puhul ilmnid olulised erinevused töötlusgruppide vahel juba pärast esimest päeva. Suurim erinevus tarbitud toidu koguses töötlusgruppide vahel ilmnidki pärast esimest päeva, hiljem tarbitava toidu kogused küll ühtlustusid, kuid statistiliselt oluline erinevus jäi siiski püsima. Antud tulemuse kohta ei oska töö autor kindlat põhjust pakkuda, kuid oletab, et ühe võimalusena mängis olulist rolli nälg. Päeva möödudes olid kimalased juba sunnitud saastunud toitu tarbima, et elus püsida. Cresswell *et al.* 2012 viis läbi katse, kus jälgis kimalaste toitumise taset päevade lõikes. Katse tulemusena langes kimalaste toitumine oluliselt, kui imidaklopriidi kontsentratsiooni siirupis tõsteti.

Melanisatsiooni taseme tulemustes puudus kontrollgrupil erinevus tebukonasooliga. Samuti puudus statistiline erinevus tau-fluvalinaadiga. Kontroll ei erinenud ka kahe pestitsiidi koosmõju tulemustest. Võrreldes töötlusgruppide üksikute ainete mõjusid omavahel, siis puudus oluline erinevus. Kahe aine seguna kasutatud kontsentratsioonil ei olnud samuti erinevusi üksikute ainete mõjudest. Brandt *et al.* (2016) uurisid oma töös neonikotinoidide mõju meemesilaste immuunvastusele ja leidsid, et kõik kolm kasutatud pestitsiidi (imidaklopriid, thiaklopriid ja klotianidiin) nõrgestasid oluliselt mesilaste immuunvastust. Erinevused kahe töö vahel võib tingida asjaolu, et ühel juhul kasutati meemesilast ja teise katse puhul kimalast. Lisaks võivad neonikotinoidid võrreldes püretroidi ja fungitsiidiga oluliselt erinevalt mõjutada mesilaste immuunvastust. Ära tasub märkida ka asjaolu, et Brandt *et al.* (2016) kasutas oma töös võrdlemisi kõrgeid pestitsiidide kontsentratsioone, mis võiski tingida olulised muutused.

Kokkuvõttes võib öelda, et Eestis tavapärasest põllumajandusmaastikust kogutud õietolmust leitud pestitsiidijääkide doosid võivad kimalastele lisastressi põhjustada. Samas otseselt suremuse tõusu ega ka immunsüsteemi tugevuse muutusi antud töös ei täheldatud. Siiski võib käesoleva uurimustöö tulemuste põhjal järeldada, et praegu keskkonda viidavate pestitsiidide koguhulk mõjutab tolmeldajaid ning tuleks taimekaitse jaoks oleks vaja leida keskkonnale ohutumaid lahendusi.

KOKKUVÕTE

Tolmeldajate arvukus on endiselt languse trendis erinevais maailma paigus. Intensiivse põllumajandusega seoses kasutatakse põldudel laialdaselt pestitsiide, mis on üheks peamiseks tolmeldajate arvukuse languse põhjuseks. Pestitsiidide kasutamise tagajärjel mõjutavad subletaalsed doosid mesilaste käitumist ja arengut. Antud bakalaureuse töös uuriti tau-fluvalinaadi ja tebukonasooli mõjusid karukimalasele (*B. terrestris*). Katses kasutatud kontsentratsioonide kogused olid samad, mida on leitud Eesti põllumajandusmaastikest asuvatest mesilatest kogutud proovidest. Töös uuriti kahe pestitsiidi ja nende segude mõju kimalaste elueale, toitumisele ja immuunvastusele.

Antud bakalaureuse tööst selgus, et käesolevas töös kasutatud pestitsiidide kontsentratsioonid kimalaste eluiga oluliselt ei mõjutanud. Katse tulemusena ei mõjutanud tebukonasooli ega tau-fluvalinaat üksiku ainena kimalaste eluiga oluliselt. Samuti puudub oluline mõju ka kimalaste elueale kahe pestitsiidi segu kasutamisel. Tarbitud toidu hulk kontrollgrupil erines oluliselt teistest gruppidest. Katse tulemusi vaadeldes puudus tebukonasooli ja tau-fluvalinaadi töötlusgruppide vahel oluline erinevus. Kahe pestitsiidi segu küll vähendas kimalaste poolt tarbitava toidu kogust oluliselt, kuid sünergeetilist mõju ei täheldatud. Tarbitud toidu kogused ööpäeva lõikes erinesid üksteisest oluliselt. Esimesel päeval oli erinevus kõige suurem ning järgnevatel päevadel erinevus vähenes kontrollgrupi ja töötlusgruppide vahel, kuid oluline mõju püsis. Immuunvastuse taseme mõõtmisel ei olnud kasutatud pestitsiidide kontsentratsioonidel kimalastele olulist mõju. Gruppide vahel puudus oluline erinevus.

Eestis tavapärasest põllumajandusmaastikust kogutud õietolmust leitud pestitsiidijääkide doosid võivad kimalastele lisastressi põhjustada. Samas otseselt suremuse tõusu ega ka immuunsüsteemi tugevuse muutusi antud töös ei täheldatud. Siiski võib käesoleva uurimustöö tulemuste põhjal järeldada, et praegu keskkonda viidavate pestitsiidide koguhulk mõjutab tolmeldajaid ning tuleks taimekaitse jaoks oleks vaja leida keskkonnale ohutumaid lahendusi.

SUMMARY

The abundance of pollinators is still in decline in different parts of the World. Pesticides are widely used in intensively managed agricultural fields and are considered as one of the main causes of it. The sublethal pesticide doses affect the behaviour and development of bees. In this bachelor's thesis, the effects of tau-fluvalinate and tebuconazole on the buff-tailed bumblebees, also known as the large earth bumblebee (*B. terrestris*), were studied. The concentrations of pesticides used in the experiment were the same as those found from samples collected from apiaries from different Estonian agricultural landscapes. The study examined the effects of two pesticides and their mixtures on the bumblebee lifespan, feeding rate and immune response.

This bachelor thesis shows that the concentrations of pesticides used did not have any significant effect on the lifespan of bumblebees. Test results indicate that used concentration of tebuconazole and tau-fluvalinate did not affect bumblebees' longevity. There was also no significant effect on bumblebees' longevity when using the two pesticides mixture in food. However, the amount of food consumed by the control group was significantly different from the other treatment groups. When observing test results, there was no significant difference between the fungicide tebuconazole and the insecticide tau-fluvalinate. The two pesticide mixture decreased bumblebees' feeding rate, although no synergistic effects were observed. The amount of food consumed per day differed substantially from each other. On the first day, the difference between the control and treatment groups was the greatest and in the following days the difference began to reduce. In measuring the level of Immune response, used pesticide concentrations had no significant effect on bumblebees.

The pesticide residues in pollen from common agricultural landscape may affect bumble bees at the sublethal level. However, no direct impact was revealed nor on survival neither the immune response of the bumblebees. As a conclusion it might be stated that the cumulative amount of pesticides taken every year to the nature, may affect bumblebees and thus more environmentally friendly plant protection measures would be needed.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Aufauvre, J., Biron, D.G., Vidau, C., Fontbonne, R., Roudel, M., Diogon, M., Vigue`s, B., Belzunces, L.P., Delbac, F., Blot, N.** (2012). Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. – *Scientific Reports* Nr.2: 326,, pp 1-7.
- Blacquiére, T., Smagghe, G., Gestel, C.A.M., Mommaerts, V.** (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. – *Ecotoxicology*, 21, pp. 973-992.
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., Büchler, R.** (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). – *Journal of Insect Physiology*, 86, pp. 40-47.
- Brown, M.** (2017). The pesticides that are increasing risk of extinction for bumblebee populations. – *Independent*. <http://www.independent.co.uk/environment/pesticides-increase-extinction-risk-for-bumblebee-populations-a7896126.html> (11.02.2018)
- Capri, E., Higes, M., Kasiotis, K., Machera, K., Marchis, A., Martin, S. J., Pistorius, J., Steeger, T., Thompson, H., Wilkins, S., Alix, A., Campbell, P., Judson, J., Maus, C., Miles, M., Kafka, A., Kent, Y., Corbo, C.** (2013). Bee health in Europe - Facts & figures and policy. – *OPERA Research Center*, pp. 1-64.
- Chinery, M.** 2005. Euroopa putukad. – *Eesti Entsüklopeediakirjastuse AS*, pp. 250.
- Cresswell, J.E., Pagea, C.J., Uyguna, M.B., Holmberghb, M., Li, Y., Wheeler, J.G., Laycocka, I., Pooka, C.J., Ibarra, N.H., Smirnoff, N., Tyler, C.R.** (2012). – Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). – *Zoology*, 115, pp. 365-371.
- Currie, R. W., Pernal, S. F., Guzmán-Novoa, E.** (2010). Honey bee colony losses in Canada. – *Journal of Apicultural Research*, 49(1), pp. 104–106.
- Doublet, V., Labarussias, M., Miranda, J.R., Moritz, R.F.A., Paxton, R.J.** (2015). Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. – *Environmental Microbiology*. 17(4), pp. 969-983.
- Euroopa Komisjon.** (2014). Mesilaste tervis- mida EL selleks teeb? – MEMO/14/260 http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-14-260_en.htm (21.01.2018)
- Hatfield, R., Jepsen, S., Thorp, R., Richardson, L., Colla, S.** (2016). *Bombus distinguendus*, Northern Yellow Bumble Bee. – *The IUCN Red List of Threatened Species*, pp. 1-9.

- Hladik, M.L., Vandever, M., Smalling, K.L.** (2016). Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. – *Science of the Total Environment*, 542(A), pp. 469-477
- Johnson, R.M., Wen, Z., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R.** (2006). Mediation of Pyrethroid Insecticide Toxicity to Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) by Cytochrome P450 Monooxygenases. – *Journal of Economic Entomology*, 99(4), pp.1046-1050.
- Johnson, R.M., Dahlgren, L., Siegfried, B.D., Ellis, M.D.** (2013). Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). – *PLoS ONE*, 8(1).
- Jones, J.C., Helliwell, P., Beekman, M., Maleszka, M., Oldroyd, B.P.** (2005). The effects of rearing temperature on developmental stability and learning and memory in the honey bee, *Apis mellifera*. – *Journal of Comparative Physiology*, 191, pp 1121-1129.
- Karise aastaaruanne.** (2014). Põllumajanduslikud rakendusuringud ja arendustegevus aastatel 2009-2014).
- Kasiotis, K.M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., Machera, K.** (2014). Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees.– *Science of the Total Environment*, 485–486(1), pp. 633–642.
- Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K.** (2012). Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. – *PLoS ONE*, 7(1).
- López, J.H., Krainer, S., Engert, A., Schuehly, W., Riessberger-Gallé, U., Crailsheim, K.** (2017). Sublethal pesticide doses negatively affect survival and the cellular responses in American foulbrood-infected honeybee larvae. – *Scientific Reports*, 7:40853.
- Marshall, L., Biesmeijer, J.C., Rasmont, P., Vereecken, N.J., Dvorak, L., Fitzpatrick, U., Francis, F., Neumeyer, J., Odegaard, F., Paukkunen, J.P.T.** (2018). The interplay of climate and land use change affects the distribution of EU bumblebees. – *Global change biology*, 24(1), pp. 101-116
- Meled, M., Thrsyvoulou, A., Belzunce, L.P.** (2009). Seasonal variations on susceptibility of *Apis mellifera* to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin. – *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(12), pp. 2517-2520.
- Mullin, C.A., Frazier1, M., Frazier1, J.L., Ashcraft1, S., Simonds, R., Engelsdorp, D., Pettis, J.S.** (2010). High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. – *PLoS ONE*. Nr.5(3): e9754.
- Neumann, P., Carreck, N. L.** (2010). Honey bee colony losses. – *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 1–6.
- Oherd, A., Vari, L.** (2015). Varroatoosi ja kaasnevate mesilashaiguste tõrje. – *Eesti mesinike liit, Tallinn*

https://mesinikud.ee/MPvoldikud/varroatoosi_ja_kaasnevate_mesilashaiguste_torje_2015.pdf
(02.02.2018)

- Pohorecka, K., Skubida, P., Semkiw, P., Mischczak, A., Teper, D., Sikorski, P., Zagibajlo, K., Skubida, M., Zdanska, D., Bober, A.** (2013). Effects of exposure of honey bee colonies to neonicotinoid seed-treated maize crops. – *Journal of apicultural science*, 57(2), pp. 199-208.
- Raimets, R., Karise, R., Mänd, M., Kaart, T., Ponting, S., Songc, J., Cresswell, J.E.** (2017). Synergistic interactions between a variety of insecticides and an ergosterol biosynthesis inhibitor fungicide in dietary exposures of bumble bees (*Bombus terrestris* L.). – *Pest Management Science*, 74(3), pp. 541-546.
- Rice, D.** (2017). Trouble, What if all bumblebees went extinct? We'd be in 'a world of trouble. – *USA TODAY*. https://www.usatoday.com/story/tech/sciencefair/2017/03/24/what-if-all_bumblebees-went-extinct-wed-world-trouble/99582888/ (05.02.2018)
- Riis, M., Karise, R.** (2015). Mesilaste korjetaimed ja taimede tolmeldamine mesilaste abil. – *Eesti mesinike liit, Tallinn*, pp. 78.
- Rortais, A., Arnold, G., Dorne, J.L., More, S.J., Sperandio, G., Streissl, F., Szentes, C., Verdonck, F.** (2017). Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: Principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. – *Science of the Total Environment*, Vol. 587-588, pp. 524-537.
- Saunders, M.E.** (2018). Insect pollinators collect pollen from wind-pollinated plants: implications for pollination ecology and sustainable agriculture. – *Insect conservation and diversity*, Vol. 11(1), pp. 13-31
- Sherry, D.F., Strang, C.G.** (2014). Contrasting styles in cognition and behaviour in bumblebees and honeybees. – *Behavioural Processes*, 117, pp. 59-69.
- Simson, K.** (2012). Kas mürk tappis tarutäie mesilasi? – *Maaleht 17 Juuli, 2012*. <http://maaleht.delfi.ee/news/maamajandus/uudised/kas-murk-tappis-tarutaie-mesilasi?id=64688386> (12.05.2018)
- Szabo, N.D., Colla, S.R., Wagner, D.L., Gall, L.F., Kerr, J.T.** (2012). Do pathogen spillover, pesticide use, or habitat loss explain recent North American bumblebee declines? – *Conservation Letters*, 5, pp. 232-239.
- Stout, J.C.** (2000). Does size matter? Bumblebee behavior and the pollination of *Cytisus scoparius* L. (Fabaceae). – *Apidologie*, 31, pp. 129-139.
- Thompson, H.M.** (2003). Behavioural effects of pesticides in bees – their potential for use in risk assessment. – *Ecotoxicology*, 12, pp. 317–330.

- Thompson, H.M., Wilkins, S.** (2003). Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures – *Bulletin of Insectology*, 56(1), pp. 131-134.
- Vandame, R., Belzunces, L.P.** (1998). Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation – *Neuroscience Letters*. 251, pp. 57-60.
- Viik, E., Mänd, M.** (2012). Eesti kimalased. *Põllumajandusuuringute keskus*.
- Williams, P.H.** (1996). Mapping variations in the strength and breadth of biogeographic transition zones using species turnover – *Royal society b-biological sciences*, 263(1370), pp. 579-588

LISAD

Lisa 1. Kimalaste poolt tarbitud keskmine toidu kogus päevade lõikes.

Vaatlus- päev	Töötlus				Test		
	Kontroll	Tebukonasool	Tau- fluvalinaat	Segu	N	H	P =
1.	0,37±0,035 a	0,17±0,013b	0,19±0,027b	0,20±0,034b	95	29,2	<0,001
2.	0,32±0,030 a	0,144±0,012b	0,22±0,053b	0,18±0,023b	93	22,3	<0,001
3.	0,18±0,013a	0,12±0,026b	0,11±0,023b	0,08±0,013b	92	27,4	<0,001
4.	0,18±0,027a	0,15±0,037ab	0,09±0,018b	0,14±0,032ab	90	13,6	0,0035
5.	0,24±0,042a	0,14±0,043ab	0,19±0,056ab	0,09±0,015b	89	14,4	0,0024
6.	0,22±0,041a	0,09±0,012b	0,11±0,040b	0,07±0,014b	87	16,4	0,001
7.	0,21±0,029a	0,07±0,011b	0,17±0,062b	0,07±0,011b	84	20,5	<0,001
8.	0,25±0,043 ac	0,11±0,034 b	0,16±0,045bc	0,11±0,019 b	83	13,6	0,0036
9.	0,16±0,020a	0,07±0,013b	0,09±0,021b	0,08±0,016b	83	16,3	0,001

Lisa 2. Lihtlitsents lõputöö salvestamiseks ja üldsusele kättesaadavakstegemiseks ning juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Mina, Aile Rummel

01.06.1995

1. annan Eesti Maaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud lõputöö

EBI fungitsiidi mõju närvimürgist põhjustatud subletaalsetele häiretele kimalastes

mille juhendaja on Risto Raimets, Reet Karise

1.1.salvestamiseks säilitamise eesmärgil,

1.2.digiarhiivi DSpace lisamiseks ja

1.3.veebikeskkonnas üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile;

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Lõputöö autor _____

allkiri

Tartu, 23/05/2018

Juhendaja(te) kinnitus lõputöö kaitsmisele lubamise kohta

Luban lõputöö kaitsmisele.

(juhendaja nimi ja allkiri)

(kuupäev)

(juhendaja nimi ja allkiri)