

3. ZNANSTVENO POSVETOVANJE O ČEBELAH IN ČEBELARSTVU POKLUKARJEVI DNEVI

Zbornik prispevkov

**3rd SCIENTIFIC SYMPOSIUM ON BEES AND BEEKEEPING
POKLUKAR'S DAYS
Book of proceedings**

Ljubljana, 4. - 5. oktober 2018

In Ljubljana, 4th - 5th October 2018



Zbornik prispevkov
3. ZNANSTVENO POSVETOVANJE O ČEBELAH IN ČEBELARSTVU
POKLUKARJEVI DNEVI
Ljubljana 2018

Book of proceedings
3rd SCIENTIFIC SYMPOSIUM ON BEES AND BEEKEEPING
POKLUKAR'S DAYS
Ljubljana 2018

Organizator / Organised by
Slovensko akademsko čebelarsko društvo (SAČD)
Kmetijski inštitut Slovenije (KIS)

Izdajatelj / Published by
Slovensko akademsko čebelarsko društvo (SAČD)
Kmetijski inštitut Slovenije (KIS)

Direktor KIS / director AIS
Izr. prof. dr. Andrej Simončič

Predsednica SAČD / President SAČD
Dr. Maja Ivana Smodiš Škerl

Urednika / Editors
Maja Ivana Smodiš Škerl
Ajda Moškrič

Vsi prispevki v zborniku so recenzirani / All the contributions are reviewed

Recenzenti / Reviewers
Dr. Danilo Bevk, dr. Janko Božič, dr. Peter Kozmus, prof. dr. Vlasta Jenčič, dr. Ajda Moškrič, dr. Janez Prešern,
dr. Maja Ivana Smodiš Škerl, izr. prof. dr. Ivana Tlak Gajger

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v
Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani
COBISS.SI-ID=297181440
ISBN 978-961-6998-22-2 (pdf, Kmetijski inštitut
Slovenije)

ORGANIZACIJSKI ODBOR /ORGANISING COMMITTEE

Slovenija / Slovenia

- Mag. Amalija BOŽNAR, blagajničarka SAČD, Slovenija / treasurer of SAČD, Slovenia
- Jernej BUBNIČ, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija / Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Slovenia
- Dr. Ajda MOŠKRIČ, Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija / Agricultural Institute of Slovenia, Slovenia
- Marjan PAPEŽ, član upravnega odbora SAČD, Slovenija / Member of executive committee SAČD, Slovenia
- Dr. Janez PREŠERN, Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija / Agricultural Institute of Slovenia, Slovenia
- Dr. Maja Ivana SMODIŠ ŠKERL, Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija / Agricultural Institute of Slovenia, Slovenia

Hrvaška / Croatia

- Izr. prof. dr. Ivana TLAK GAJGER, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska / Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia
- Izr. prof. dr. Emil GJURČEVIĆ, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska / Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia
- Doc. dr. Krešimir MATANOVIĆ, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska / Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

PROGRAMSKI ODBOR / PROGRAMME COMMITTEE

- Dr. Danilo BEVK, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana, Slovenija / National Institute of Biology, Ljubljana, Slovenia
- Dr. Janko Božič, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija / Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Slovenia
- Dr. Peter KOZMUS, Čebelarska zveza Slovenije, Lukovica, Slovenija / Slovenian Beekeepers' Association, Lukovica, Slovenia
- Prof. dr. Vlasta JENČIČ, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija / Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Slovenia
- Dr. Ajda MOŠKRIČ, Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija / Agricultural Institute of Slovenia, Slovenia
- Dr. Janez PREŠERN, Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija / Agricultural Institute of Slovenia, Slovenia
- Dr. Maja Ivana SMODIŠ ŠKERL, Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija / Agricultural Institute of Slovenia, Slovenia
- Izr. prof. dr. Ivana TLAK GAJGER, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska / Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia

*Človek se uči le na dva načina:
eno je branje,
drugo pa je druženje s pametnejšimi od sebe.
(Will Rogers)*

V spomin dr. Janezu Poklukarju (1960 -2004)



Na tretjem, zdaj že tradicionalnem znanstvenem posvetovanju o čebelah in čebelarstvu Poklukarjevi dnevi 2018, se je predstavilo več kot dvajset novih strokovnih in znanstvenih prispevkov s področja čebelarstva. Slovensko akademsko čebelarско društvo (SAČD), ki je naslednik Sekcije za čebelarstvo pri društvu kmetijskih inženirjev in tehnikov, tako nadaljuje delo dr. Janeza Poklukarja in mnogih, ki so se družili in nesebično združili moči za dobrobit in napredek slovenskega čebelarstva.

Nova znanja in spoznanja referentov iz Slovenije in tujine kažejo, da bo čebelarjenje v našem in širšem evropskem, ne nazadnje tudi svetovnem prostoru, v prihodnosti še bolj zahtevno. Po eni strani zaradi podnebnih sprememb, po drugi zaradi novih bolezni in škodljivcev, po tretji zaradi vse bolj negotovih čebeljih paš itd.

Prispevki, zbrani v tokratnem zborniku, v nadaljevanju skušajo odgovoriti na katerega izmed omenjenih izzivov, seznanjajo o novostih in dobrih praksah na področju čebelarstva in znanja o opravevalcih na slovenskem in v sosednjih državah.

Organizacijski odbor posveta

PROGRAM POSVETOVANJA

Četrtek, 4. oktober 2018

7:45 Registracija, Kava

9:00 Pozdravni nagovori

SEKCIJA 1 Moderatorja: Janko Božič & Janez Prešern

9:20 *Marjan Papež* Četrto stoletje po predstavitvi predloga razvojnega projekta »OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA«

9:40 *Peter Kozmus* Kako lahko s pomočjo Svetovnega dne čebel zagotovimo boljše pogoje za preživetje čebel?

10:00 *Matej Mandelj* Razvoj – Hiša kranjske čebele v Višnji Gori

10:20 *Irfan Kandemir* Čebelarjenje v Turčiji: trenutni razvoj

10:40 *Damjana Grobelšek* Predstavitev Slovenske čebelarke akademije

11:00-11:20 Odmor za kavo

SEKCIJA 2 Moderatorja: Danilo Bevk & Peter Kozmus

11:20 *Darja Šolar* Primer dobre prakse: mlada prevzemnica čebelarke kmetije

11:40 *Mojca Korošec* Zaznava arome medu med mladimi potrošniki

12:00 *Špela Zarnik* Kakšne so možnosti pridobivanja matičnega mlečka in hkratnega vzrejanja matic z uporabo istega vzrejnega gradiva

12:20 *Matjaž Deželak* Med kot zdravilo, ne sladilo! (Bio)kemijski označevalci v medu za potrebe standardizacije, preverjanje avtentičnosti ter ugotavljanja učinka na zdravje

12:40 *Lazo Dimitrov* Ocena ekonomskega vpliva zimskih izgub družin v Avstriji, Češki Republiki in Republiki Makedoniji

13:00-14:00 Kosilo

SEKCIJA 3 Moderatorja: Ajda Moškrič & Vlasta Jenčič

14:00 *Anton Gradišek* Analiza temperature satja z zalego v gnezidih čmrljev in spremljanje dnevne aktivnosti čmrljev z uporabo mikrofona

14:20 *Danilo Bevk* Razumevanje pomena opravevanja in pestrosti opravevalcev

14:40 *Cecilia Costa* Vpeljava meritev lastnosti odpornosti proti varojam v lokalni vzrejni program za *A. m. ligustica*

15:00 *Ajda Moškrič* Izolacija dednine iz neinvazivnih bioloških virov pri maticah kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*)

15:20 *Gordana Glavan* Negativni učinki srebrovih nanodelcev na kranjsko čebelo

15:40 *Laura Šimenc* Prvi dokaz prisotnosti virusa Lake Sinai pri čebelah in čmrljih v Sloveniji

16:00-16:20 Odmor za kavo

SEKCIJA 4 Moderatorja: Vlasta Jenčič & Metka Pislak Očepek

16:20 *Jorge Rivera Gomis* Preizkus VarroMed®-a v južni Evropi za zatiranje *Varroa destructor* v družinah medonosne čebele (*Apis mellifera*)

16:40 *Ivan Toplak* Medonosna čebela in čmrlji se okužujejo z istimi virusnimi sevi

17:00 *Lucija Žvokelj* Prisotnost praživali iz družine Trypanosomatidae pri medonosni čebeli v Osrednjeslovenski regiji

17:20 *Jerica Vreček Šulgaj* Huda gniloba čebelje zalege – izzivi na terenu

17:40 *Marco Pietropaoli* Sladkor v prahu kot nov medij za diagnostiko virusov medonosne čebele (*Apis mellifera*) v sklopu dobre čebelarke prakse po sladkornem testu za detekcijo varoje

18:00 *Giovanni Formato* Dobra čebelarke praksa: prvi poskus definicije, klasifikacije in ocenjevanja na mednarodnem nivoju

18:20-18:30 Zaključek posveta

PROGRAM

Thursday, 4th October 2018

7:45 Registration, Coffee

9:00 Welcome talks

SECTION 1 Chairs: Janko Božič & Janez Prešern

9:20 *Marjan Papež* Quarter of century after the presentation of the proposal of developing project »Improvement and development of Slovenian beekeeping«

9:40 *Peter Kozmus* How can we ensure better conditions for the survival of bees by means of the World Bee Day?

10:00 *Matej Mandelj* Development – House of Carniolan bee in Višnja Gora

10:20 *Irfan Kandemir* Beekeeping in Turkey: current developments

10:40 *Damjana Grobelšek* Presentation of Slovenian Beekeeping Academy

11:00-11:20 Coffee break

SECTION 2 Chairs: Danilo Bevk & Peter Kozmus

11:20 *Darja Šolar* Good practice example: young acquirer of the beekeeping farm

11:40 *Mojca Korošec* Perception of honey aroma among young consumers

12:00 *Špela Zarnik* What are the possibilities of simultaneous rojal jelly production and queen rearing from the same grafting material

12:20 *Matjaž Deželak* 'Honey – from sweetener to remedy' Standardization of honey using (bio)chemical markers for its authentication, determination of origin, and assessment of health-related effects

12:40 *Lazo Dimitrov* Economic impact assessment of honey bee winter colony losses in Austria, Czech Republic and the Republic of Macedonia

13:00-14:00 Lunch

SECTION 3 Chairs: Ajda Moškrič & Vlasta Jenčič

14:00 *Anton Gradišek* Analysis of temperature in combs with brood in the nests of bumble bees and monitoring of daily activities using microphone

14:20 *Danilo Bevk* Understanding the value of pollination and pollinator diversity

14:40 *Cecilia Costa* Introducing measurement of varroa resistance traits in a local breeding programme for *Apis mellifera ligustica*

15:00 *Ajda Moškrič* Isolation of genetic traits from noninvasive biological sources in queens of Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica*)

15:20 *Gordana Glavan* Negative impacts of silver nanoparticles on Carniolan honey bee

15:40 *Laura Šimenc* First proof of virus Lake Sinai presence in bees and bumble bees in Slovenia

16:00-16:20 Coffee break

SECTION 4 Chairs: Vlasta Jenčič & Metka Pislak Ocepek

16:20 *Jorge Rivera Gomis* VarroMed® performances in Southern Europe for *Varroa destructor* control in honeybee (*Apis mellifera*) colonies during winter

16:40 *Ivan Toplak* Honey bees and bumble bees are infected with the same strains of viruses

17:00 *Lucija Žvokelj* Presence of Protozoa, family Trypanosomatidae, in honey bee in Central Slovenian region

17:20 *Jerica Vreček Šulgaj* American foulbrood – challenges in the field

17:40 *Marco Pietropaoli* Powder sugar as new matrix for diagnosis of honeybee (*Apis mellifera*) viruses in the context of the Good Beekeeping Practice of the varroa infestation level assessment

18:00 *Giovanni Formato* Good Beekeeping Practices: first attempt of definition, classification and evaluation at the international level

18:20-18:30 Conclusion

POGRAM - POKLUKARJEVI DNEVI 2018 – ZAGREB

Petek, 5. oktober 2018

7:45 –	Odhod z avtobusom izpred Kmetijskega inštituta Slovenije, Hacquetova ulica 17, Ljubljana
10:00	Prihod gostov na Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela (Vajalnica Zavoda)
10:10 – 10:20	Pozdravni nagovor Predstojnika Zavoda
10:25 – 10:30	Pozdravni nagovor Dekana Veterinarske fakultete
10:35 – 10:55	I. Tlak Gajger (predstavitev delovanja Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela in aktivnosti Laboratorija za bolesi pčela – APISlab-a)
11:00 – 11:45	(v dveh skupinah) Ogled APISlab-a, Ogled Zavoda
11:45 – 12:00	Odmor
12:00 – 12:30	I. Tlak Gajger, V. Jenčič, M. Smodiš Škerl (Povijesni prikaz znanstveno-stručnih aktivnosti suradničkih hrvatsko-slovenskih institucija na području pčelarstva)
12:30 – 12:45	Razprava
13:00 – 15:00	Kosilo, Restavracija „Kod Vukušića“
15:00 – 17:00	Vodeni ogled Zagreba
17:00 –	Povratek v Ljubljano

Lokalni organizacijski odbor:

Predsednik: Ivana Tlak Gajger

Člani: E. Gjurčević, K. Matanović

PROGRAM – POKLUKAR'S DAYS 2018 – ZAGREB

Friday, 5th Oct 2018

7:45 –	Bus departure, Agricultural institute of Slovenia, Hacquetova ulica 17, Ljubljana
10:00	Arrival of guests to Department for Biology and Pathology of Fish and Bees
10:10 – 10:20	Welcome talk: Head of Department
10:25 – 10:30	Welcome talk: Dean of Veterinary faculty
10:35 – 10:55	I. Tlak Gajger (Introduction of Department for Biology and Pathology of Fish and Bees, and Laboratory for bee diseases – APISlab)
11:00 – 11:45	(in two groups) Visit of APISlab, Visit of Department
11:45 – 12:00	Break
12:00 – 12:30	I. Tlak Gajger, V. Jenčič, M. Smodiš Škerl (Historical display of scientific – expert activities of collaboration of croatian – slovenian institutions in the field of beekeeping)
12:30 – 12:45	Discussion
13:00 – 15:00	Lunch at the Restaurat „Kod Vukušića“
15:00 – 17:00	Guided tour of Zagreb City Center
17:00 –	Departure to Ljubljana

Local organising committee:

President: Ivana Tlak Gajger

Members: E. Gjurčević, K. Matanović

KAZALO

Četrto stoletje po predstavitvi predloga razvojnega projekta »OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA«	11
Kako lahko s pomočjo svetovnega dne čebel zagotovimo boljše pogoje za preživetje čebel?	18
Razvoj – Hiša kranjske čebele v Višnji gori	23
Čebelarjenje v Turčiji: trenutni razvoj	29
Predstavitev delovanja slovenske čebelarske akademije: vizija, pomen in poslanstvo	31
Primer dobre prakse: mlada prevzemnica čebelarske kmetije	35
Zaznava arome medu med mladimi potrošniki	37
Kakšne so možnosti pridobivanja matičnega mlečka in hkratnega vzrejanja matic z uporabo istega vzrejnega gradiva	45
‘Med kot zdravilo, ne sladilo!’ Standardizacija medu z (bio)kemijskimi označevalci za preverjanje botanične in geografske pristnosti ter ugotavljanje učinka na zdravje	52
Ocena ekonomskega vpliva zimskih izgub čebeljih družin v Avstriji, Češki Republiki in Republiki Makedoniji	62
Analiza temperature satja z zalego v gnezdih čmrljev	64
Spremljanje dnevne aktivnosti čmrljev z uporabo mikrofona	70
Razumevanje pomena opráševanja in pestrosti opráševalcev	77
Vpeljava lastnosti odpornosti proti varojam v lokalni rejski program za <i>Apis mellifera ligustica</i>	83
Izolacija dednine iz neinvazivnih bioloških virov pri maticah kranjske čebele (<i>Apis mellifera carnica</i>)	85
Negativni učinki srebrovih nanodelcev na kranjsko čebelo	93
Prvi dokaz prisotnosti virusa Lake Sinai pri čebelah in čmrljih v Sloveniji	100
Delovanje zdravila VarroMed® za zatiranje varoj (<i>Varroa destructor</i>) pozimi ob umetni prekinitvi zaleganja v južni Evropi	104
Medonosna čebela in čmrlji se okužujejo z istimi virusnimi sevi	108
Prisotnost praživali iz družine Trypanosomatidae pri medonosni čebeli v osrednjeslovenski regiji	114

Huda gniloba čebelje zalege – izzivi na terenu	119
Sladkor v prahu kot nov medij za diagnostiko virusov medonosne čebele (<i>Apis mellifera</i>) v sklopu dobre čebelarske prakse po sladkornem testu za detekcijo varoje	123
Povijesni prikaz nastavnih, znanstvenih i stručnih aktivnosti suradničkih hrvatsko-slovenskih institucija na področju pčelarstva	124
Dobra čebelarska praksa: prvi poskus definicije, klasifikacije in ocenjevanja na mednarodnem nivoju	127
SPONZORJI	128



ČETRTO STOLETJE PO PREDSTAVITVI PREDLOGA RAZVOJNEGA PROJEKTA »OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA«

Marjan PAPEŽ¹

Izveček

Čebelarstva in tudi širša javnost zaznavata v zadnjih petindvajsetih letih dinamično dogajanje v slovenskem čebelarstvu, ki pa se ni zgodilo samo od sebe. V veliki meri je posledica temeljitega, sistematičnega dela in systemskega razmišljanja, ki ga je konec osemdesetih let prejšnjega stoletja začela Sekcija za čebelarstvo pri Društvu kmetijskih inženirjev in tehnikov Slovenije, dokončala pa v maju 1992 z javno predstavitvijo. Predlog razvojnega projekta »OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA« je med sedmimi izbranimi nalogami, s katerimi bi odgovorili na vprašanje, kaj storiti, da se bo izboljšal položaj v čebelarstvu, in izpostavili vzpostavitev znanstvenega in visokošolskega vrha, svetovalne službe ter močne čebelarske organizacije. Ocenjujemo, da je bilo v letu 1992 v čebelarstvu iz javnih in društvenih virov v celoti zaposlenih 12 ljudi, delno pa se je s čebelarstvom poleg drugih dejavnosti ukvarjalo še 11 ljudi. Po nam dostopnih podatkih je dandanes v čebelarstvu iz javnih virov in članarine v okviru Čebelarske zveze Slovenije v celoti financiranih 39 ljudi, delno pa še 32. Po dobrega četrto stoletja lahko rečemo, da je čebelarstvo kadrovsko močno, in da je ta cilj izpolnjen.

Ključne besede: Dušan Kresal, razvojni projekt, slovensko čebelarstvo, znanstveni in visokošolski vrh, Zveza čebelarskih društev Slovenije/Čebelarska zveza Slovenije

QUARTER CENTURY AFTER THE PRESENTATION OF PROPOSED DEVELOPMENTAL PROJECT »RECONSTRUCTION AND DEVELOPMENT OF SLOVENIAN BEEKEEPING«

Abstract

Beekeeping and the general public has seen a number of diverse and dynamic events in Slovenian beekeeping in the past twenty-five years, which did not happen on its own.

A large part of it is a result of a through, systematic work and systematic thinking, which has started at the end of 1980s, and then became public in May 1992, by the Section for Beekeeping at the Society of Agricultural Engineers and Technicians of Slovenia. Proposal of the development project »RECONSTRUCTION AND DEVELOPMENT OF SLOVENE BEEKEEPING« has been one of seven selected tasks that would answer the question how to improve the position of beekeeping, stressed the importance of establishing scientific and higher education establishments, advisory service and strong beekeepers organisation.

It is estimated that in 1992 there were 12 full-time employed people in beekeeping from public and associations sources, while 11 people worked in beekeeping part time in addition of other activities. According to available data, there are now 39 people who are fully founded from public sources and membership fees within Slovenian Beekeepers Association, and 32 more partly founded. After a good quarter of a century we can say, that beekeeping has strong personnel and that the goals have been accomplished.

Key words: Dušan Kresal; development project, Slovenian Beekeeping; Science and higher education establishments, Slovenian Beekeepers Association

¹ Univ. dipl. inž. kmetijstva – smer živinoreja, Cesta 5. maja 21, 1370 Logatec, marjan.papez@t-2.si

Prepoznavnih zadnjih petnajst let

Čebelarstva javnost zaznava v zadnjih petindvajsetih letih zelo dinamično dogajanje v slovenskem čebelarstvu. Širša javnost je začela (ponovno) bolj prepoznavati in priznavati večstranski pomen čebelarstva po svetovnem čebelarskem kongresu Apimondia leta 2003 v Sloveniji.

Te spremembe se niso zgodile same od sebe. Na eni strani je tu delo številnih predanih čebelark in čebelarjev, ki vlagajo veliko energije v razvoj in promocijo (!) čebelarstva, na drugi strani pa primeren posluš države, ki tako skozi državna kot evropska denarna sredstva izdatno podpira čebelarstvo. Ocenjujemo, da je bilo čebelarstvu namenjeno toliko pozornosti in posluha le še v času Marije Terezije.

Začetki preporoda segajo v leto 1989

Da bi bolje razumeli vso to živahno brenčanje v panjih in izven njih, se moramo vrniti tri desetletja nazaj, ko se je skupina čebelarskih zanesenjakov začela izven obstoječih čebelarskih struktur samoiniciativno sestajati in se ukvarjati z nezavidljivim položajem v čebelarstvu konec osemdesetih let prejšnjega stoletja.

Ta skupina je bila **Sekcija za čebelarstvo pri Društvu kmetijskih inženirjev in tehnikov**, ki je predhodnica Slovenskega akademskega čebelarskega društva (SAČD). Sekcija je bila ustanovljena 28. oktobra 1989 in je imela sedež na katedri za sadjarstvo na agronomskem oddelku Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. O ustanovitvi sekcije je poročal tudi Slovenski čebelar (12/1989).

OB USTANAVLJANJU SEKCIJE ZA ČEBELARSTVO PRI DKITS

Ustanovni sestanek za čebelarstvo pri Zvezi kmetijskih inženirjev in tehnikov Slovenije je bil 28. oktobra 1989. Dogovorili smo se, da se bomo odločili o ustanovitvi sekcije, ko bomo vedeli, ali kmetijski inženirji in tehniki, organizirani v svojo sekcijo, lahko kakorkoli pripomorejo k sanaciji in uspešnejšemu razvoju slovenskega čebelarstva.

Da bi lahko z vso odgovornostjo odgovorili na zastavljeno vprašanje, smo morali stanje v celoti analizirati in poiskati med seboj povezane naloge in cilje, s katerimi bi lahko dosegli zastavljene cilje.

Na sestanku smo opredelili 82 problemov in predvsem ugotovili, da gre za sistemsko enake probleme, s katerimi se danes srečuje slovensko kmetijstvo. To sicer ni kakšna presenetljiva ugotovitev, saj je čebelarstvo povsod po svetu eden od podsistemov kmetijstva. Pomembna pa je ugotovitev, da imamo agronomi in kmetijski tehniki ustrezno temeljno znanje, ki je potrebno za obvladovanje kmetijske stroke v celoti, in da so zato čebelarji – agronomi in

kmetijski tehniki gotovo ustrezno kvalificirani, da bodo pri iskanju rešitev iz obstoječe krize najmanj tako uspešni, kot so ostali – predvsem ljubitelji, ki želijo celovito rešiti probleme čebelarstva, ne pa samo posameznih čebelarstev.

Ugotovili smo, da moramo glede na obsežnost naloge vsaj letošnje zimo pospešeno nadaljevati začeto delo, zato bo naslednji delovni sestanek že v soboto, 9. decembra 1989, ob 9. uri, v prostorih VTOZD za agronomijo, Ljubljana, Jamnikarjeve 101.

Na sestanku smo se tudi dogovorili, da z vso odločnostjo podpremo zamisel o ustanovitvi posebne (republiške) čebelarske pospeševalne službe.

Vse kmetijske inženirje in tehnike, ki bi želeli sodelovati pri iskanju ukrepov za sanacijo slovenskega čebelarstva in pri njihovi realizaciji, vabimo, da se nam priključijo in se udeležijo napovedanega sestanka.

Za sekcijo:
D. Kresal

374

Slovenski čebelar je v decembrski številki leta 1989 objavil *notico o ustanovitvi Sekcije za čebelarstvo pri Društvu kmetijskih inženirjev in tehnikov*.

Z agronomsko širino nad čebelarske težave

Gonilna sila Sekcije je bil **Dušan Kresal**. Kot mladoleten domobranski vojak je preživel Teharje, kljub temu pa je

v času komunizma zaradi strokovnih, organizacijskih in moralnih odlik opravljal več odgovornih služb v slovenskem kmetijstvu in gospodarstvu (Metalka), med drugim je bil v začetku osemdesetih let glavni republiški kmetijski inšpektor. Takratni sekretar za kmetijstvo **Ivo Marenc** je dejal, da ga je zaposlil, ker »se je odločil zanj na podlagi njegove strokovnosti in človeških sposobnosti, ostale zgodbe ga niso zanimale.« Po izobrazbi je bil diplomirani inženir agronomije z obilo izkušenj ter strokovne in duhovne širine, kar mu je pri vodenju Sekcije prišlo še kako prav.

Čebelaril je v nakladnih panjih in bil učenec prof. dr. **Jožeta Riharja**, hkrati pa tudi njegov sodobnik. Zaradi doslednega zastopanja svojih načel in pogledov na prihodnost čebelarstva, ki ga je vedno videl znotraj kmetijstva, je prišlo do nesoglasij z vodstvom takratne Zveze čebelarskih društev Slovenije (ZČDS) in v zvezi ni bil zaželen.



Dušan Kresal je svoje bogato znanje in izkušnje nesebično delil s čebelarji.

Velika stiska čebelarjev konec osemdesetih let

Položaj v čebelarstvu konec osemdesetih let prejšnjega stoletja v Sloveniji je bil vse prej kot rožnat. Ustanovitev sekcije konec leta 1989 je bila spontan odziv na zelo težak položaj in nemoč v čebelarstvu, ki je nastal zaradi kadrovske podhranjenosti, s tem tudi slabo učinkovite čebelarske organizacije, še bolj pa zaradi pomanjkanja posluha države do čebelarskih tegob. Okoliščine so bile alarmantne:

- država se je komaj omembe vredno ukvarjala s čebelarstvom,
- slabo organizirana krovna čebelarska organizacija Zveza čebelarskih društev Slovenije (ZČDS) je ob skromni profesionalni kadrovske zasedbi (tajnik zveze in urednik Slovenskega čebelarja) komaj zagotavljala osnovni servis članom,
- ni bilo sistematičnega dela v čebelarstvu,
- prenos znanja je bil pomanjkljiv,

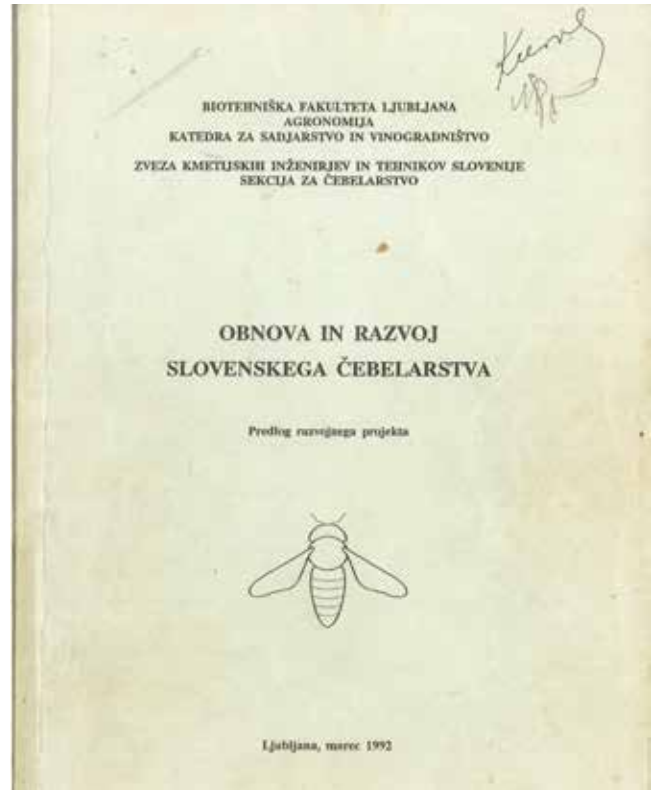
- čebelarstvo so pestile bolezni: varoza, huda gniloba in poapnela zalega,
- zaradi razpada Jugoslavije so prevaževalci izgubili pasišča v Slavoniji, Gorskem Kotarju, Liki itd.
- nekontroliran uvoz cenenega medu in zato tudi nizke odkupne ter prodajne cene medu itd.

Sekcija je tako analizirala položaj čebelarstva in po metodi sistemskega inženiringa evidentirala težave v čebelarstvu. Nanizali so 82 težav, opravili vzročno posledično analizo in podali usmeritve ter ukrepe za izboljšanje čebelarstva.

Predlog razvojnega projekta »Obnova in razvoj slovenskega čebelarstva«.

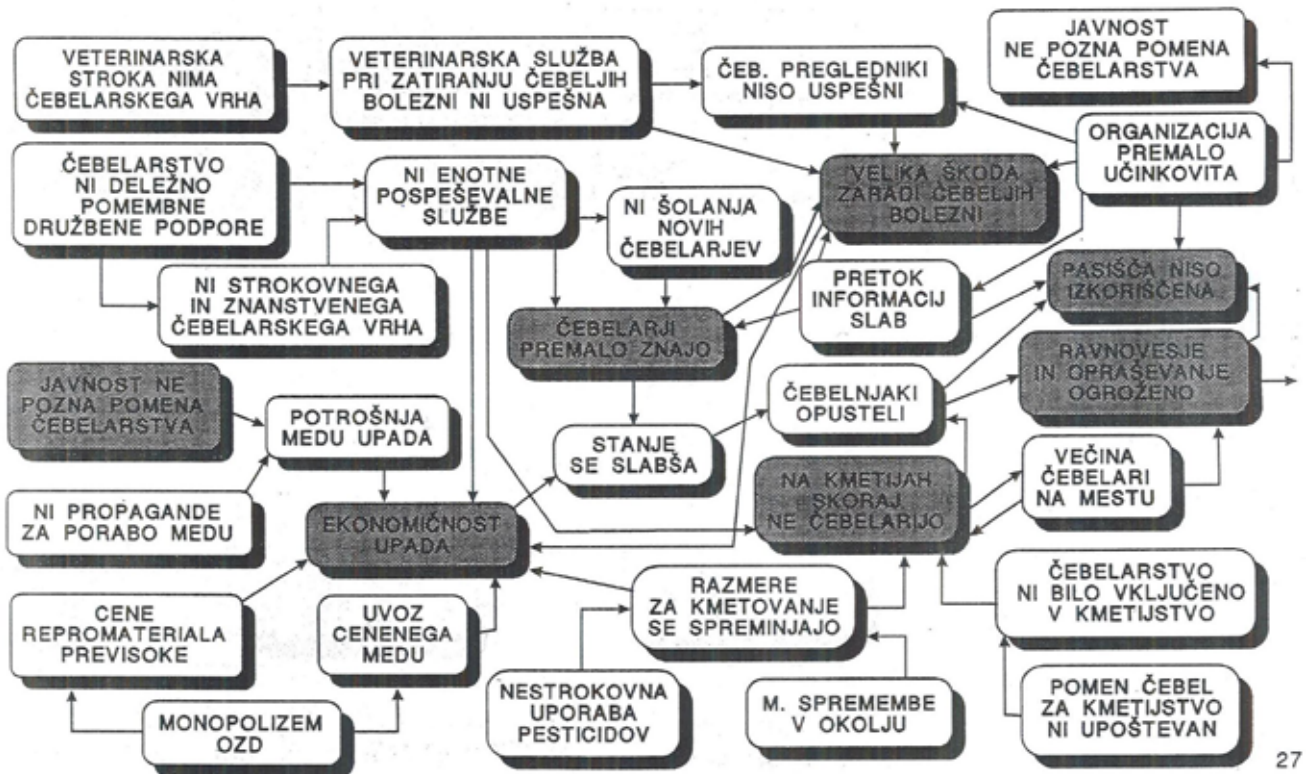
Že omenjen dinamični razvoj čebelarstva je v veliki meri posledica temeljitega, sistematičnega (in prostovoljnega) dela Sekcije. Ta je v zimah 1989, 1990 in 1991 proučevala položaj slovenskega čebelarstva. Delala je po metodi sistemskega inženiringa in na osemdesetih straneh je nastal predlog razvojnega projekta »OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA«.

Projekt je temeljito povzel takratno stanje v slovenskem čebelarstvu. Na podlagi analize ugotavljanja in preučevanja težav so bili narejeni cilji, strategija razvoja ter priča-



Naslovnica predloga razvojnega projekta OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA, ki je eden ključnih dokumentov za velik napredek slovenskega čebelarstva v zadnjih šestindvajsetih letih.

VZROČNO POSLEDIČNA ANALIZA PROBLEMOV ČEBELARSTVA V SLOVENIJI



27

V predlogu razvojnega projekta OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA je bila opravljena temeljita analiza stanja v slovenskem čebelarstvu okrog leta 1990.

kovane ovire. Predstavljeni so bili najpomembnejši ukrepi kot minimum za začetek izvajanja projekta, na koncu pa so bili predstavljeni organizacijski ukrepi za uresničitev projekta. To je bil prvi tovrsten dokument v slovenskem čebelarstvu in na njem temelji njegov preporod. **Tako celovitega dokumenta ni imela takrat nobena druga kmetijska panoga, res pa je tudi, da nobena druga panoga kmetijstva v tistem času ni bila tako zapostavljena.**

ZČDS se ni zavedala pomena projekta

Projekt je bil pripravljen marca leta 1992. Odbor za čebelarstvo pri Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (!) ga je obravnaval 22. aprila 1992, javno pa je bil predstavljen na Biotehniški fakulteti 5. maja 1992. Za objavo so ga na podlagi skupnih ugotovitev poleg **Dušana Kresala** in prof. dr. **Jožeta Riharja** pripravili (takrat) mag. **Franci Štampar**, **Janez Firm**, **Vito Zupet** in **Damjan Meolic**.

Posveta oziroma predstavitev se je udeležilo več kot sto ljudi. Med udeleženci je spodbudil intenzivno razpravo, saj je na predstavitvi razpravljalo 19 udeležencev, naknadno pa je prispelo še 15 pisnih odzivov.

Razpravljavelci ob predstavitvi projekta 5. maja 1992:	Pisni odmevi na predlog razvojnega projekta <i>Obnova in razvoj slovenskega čebelarstva</i> :
Štane Hajdinjak, Rogašovci	Aleš Mižigaj , Modex
Stano Kranjc, Maribor	Jrnej Lesnič , Republiška vet. uprava
Stano Sajevec, Maribor	Ladislav Gmajner, Himezad
Marjan Debelak, Ljubljana	Jurij Senegačnik, Veterinarska fakulteta
Ivan Jurkovič , Ljubljana	Janez Poklukar, Kmetijski inštitut Slovenije
Bruno Kristof, Maribor	Anton Novak, Gornja Radgona
Janko Božič , BF – oddelk za biologijo	Janez Mihelič, Slovenski čebelar
Jože Drobnič, Vet. zavod ljubljanske regije	Ivan Vučkovič, Murska Sobota
Janez Pistak , Apače	Franc Grajzar, Domžale
Janez Mihelič , Slovenski čebelar	Janko Božič, BF – oddelk za biologijo
Janez Poklukar , Kmetijski inštitut Slovenije	Franc Kolenc, Celje
Jurij Senegačnik , VF	Stanislav Sajevec, Maribor
Franc Kolenc, Celje	Franci Marolt, Sevnica
Vlado Tumpelj, Ptuj	Marjan Skok , Zveza čebelarstvih društev Slovenije
Ervin Kuhar , MKGP	
Marjan Papež, študent BF	
Anton Novak	
g. Jare, Modex	
g. Javornik	

14 Sadovi dela Dušana Kresala v slovenskem čebelarstvu

Seznam ljudi, ki so razpravljali na predstavitvi ali so se na dokument pisno odzvali

Zanimivo (in hkrati žalostno) je bilo, da je takrat tako odmevnemu dogodku Slovenski čebelar 6/1992 namenil zgolj pol strani. V zvezi s predlogom razvojnega projekta »OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA« je SČ poročal le še v številki 6/1993, v poročilu o občnem zboru aprila 1993, pa še to na izrecno zahtevo delegatov približno desetih čebelarskih društev, ki so želeli pozitivne spremembe v čebelarstvu. Kot rečeno, zveza projekta ni vzela za svojega, zato so se spremembe doga-

jale počasneje, kot bi se lahko.

Zanimivo je, da je tudi Zveza čebelarskih društev Slovenije 22. aprila 1992 na petih straneh pripravila dokument *Smernice za nadaljnji razvoj slovenskega čebelarstva*. Kot kaže, tudi tega dokumenta sama ni vzela resno, saj o njem ni bilo zaslediti nobenega prispevka v Slovenskem čebelarju v prihodnjih letih.

Kot zanimivost naj navedemo, da je bila Čebelarska zveza Slovenije do projekta še leta 1997 zadržana. Takrat je bil v Kmečkem glasu prispevek na to temo, v katerem so bile izjave dr. **Janeza Poklukarja**, mag. **Mire Jenko Rogelj**, **Viktorja Kreka**, mag. **Malči Božnar**, **Janka Pislaka**, **Uroša Vidmarja** in **Dušana Kresala**. Izmed vprašanih le takratni tajnik zveze **Milan Runtas** projekta ni želel komentirati.

SČ 6/199.

– Čebelarska družina Gornji Grad obvešča čebelarje prevažalce, ki nameravajo pripeljati čebelo na smrekovo pašo, da svoj prihod najavijo pri naslednjih čebelarjih, ki se bodo z njimi dogovorili glede stojišč:

- za področje Črnivca in Nove Stille: Jože Špeh, Šmrljavč 7, (063) 842-144 (od 8. do 10. ure), ali Orelšnik Franc, Šmrljavč 11;
- za področje Gornjega Grada: Jože Fašun, Gornji Grad 82, (063) 842-052;
- za področje Bočne: Ivan Lovar, Bočna 105, (063) 842-084.

Prevažalci so dolžni o dovozu čebel obvestiti tudi veterinarsko inšpekcijo v Mozirju, Bojana Štura, (063) 831-853.

Čebelarje prevažalce naprošamo, da dosledno upoštevajo dogovor o stojiščih, po končani paši na smerki pa naj čebele takoj odpeljejo.

ČD Gornji Grad

ČD Krim – poverjeniki za pašo: za Jezero pod Krimom A. Koščak, tel.: (061) 631-163, za Gornjo Brezovico A. Brancelj, tel.: (061) 631-103, za Kamnik pod Krimom in Rakitno J. Švigelj, tel.: (061) 631-394.

POSVET O STRATEGIJI RAZVOJA SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA

JANEZ MIHELIČ

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano je v sodelovanju z Zvezo čebelarskih društev Slovenije 5. maja 1992 organiziralo enodnevni posvet z naslovom »Strategija razvoja slovenskega čebelarstva«. Ministrstvo je posvet pripravilo v zvezi s pripravo strategije oziroma programa razvoja kmetijstva v Republiki Sloveniji.

Podlaga za razpravo je bil dokument z naslovom »OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA«. Pripravila sta ga sekcija za čebelarstvo pri Zvezi kmetijskih inženirjev in tehnikov Slovenije in katedra za sadjarstvo in vinogradništvo pri BTF-Agronomija.

Vse veje kmetijstva naj bi se v prihodnje organizirale na podlagi razvojnih projektov oziroma celovite strategije razvoja slovenskega kmetijstva, sprejete na osnovi strokovnih ugotovitev in razprave vseh, ki skrbijo za razvoj določene panoge. To pa pomeni, da je od kakovosti projekta odvisno, kako hitro bo čebelarstvo prebrodilo sedanjo krizo in kako se bo v prihodnje razvijalo.

Pomembno je, da je bil prvi posvet v organizaciji ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, torej čebelarstvo le postaja del kmetijstva. Žal pa je bilo dolga leta popolnoma pozabljeno in odrinjeno, še zlasti zasebno čebelarstvo, mnogi odgovorni v državni upravi pa so ga označevali

z izrazom »neobdavnostno zaslužkarstvo«. Posvet je bil na Biotehniški fakulteti na oddelku za agronomijo, udeležilo pa se ga je več kot petdeset strokovnjakov in praktikov iz vseh koncev Slovenije. Projekt je predstavil inž. **Dušan Kresal**, eden njegovih avtorjev. V razpravi je več udeležencev izrazilo svoja mnenja in pripombe. Projekt je izdelan po metodi sistemskega inženiringa, to pa pomeni, da so zbrali vse dejavnike in probleme ter jih združili v smernice prihodnjega razvoja in določili tako kratkoročne kot tudi dolgoročne ukrepe. V razpravi so se pokazale nekatere razlike v pogledih na prihodnjo organiziranost in razvoj slovenskega čebelarstva. Tudi Zveza čebelarskih društev Slovenije je pripravila svoje poglede na prihodnjo organiziranost in razvoj slovenskega čebelarstva, podpira pa jih je velika večina prisotnih. Seveda vseh problemov ne bo mogoče rešiti naenkrat, vsi pa so menili, da je treba najprej hitro rešiti kratkoročne probleme. Navzroč so projekt podprli in poudarili, da se je ministrstvo knočno na pravi način lotilo reševanja razvoja čebelarstva.

Udeleženci posveta so tudi sklenili, da bo ministrstvo oblikovalo nacionalni odbor, njegova naloga pa bo oblikovati ukrepe ministrstva na področju čebelarstva. Menili so tudi, naj ostanejo veterinarji svetovalci, časoma pa naj bi ustanovili tudi splošno pospeševalno službo za čebelarstvo.

180

Odmevni predstavitvi projekta, kjer se je zbralo več kot sto udeležencev (praktično vsi, ki so tisti čas kaj pomenili v čebelarstvu), je Slovenski čebelar junija 1992 namenil komaj pol strani.

Ministrstvu je bil projekt zelo uporaben pripomoček

Če se je na eni strani čebelarstva organizacija distancirala od projekta, je bilo povsem drugače na Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP). Že dovolj zgovorno je dejstvo, da je ministrstvo Sekciji za izdelavo predloga, ki ga samo ni naročilo, naknadno namenilo sredstva v višini takratnih 500.000 tolarjev.

Predlog razvojnega projekta je bil osnovni pripomoček vsem uradnikom na ministrstvu, ki so se vsaj malo ukvarjali s področjem čebelarstva. Ker je predlog razvojnega projekta jasno opredeljeval stanje in nujne ukrepe, je s tem že sam po sebi spodbujal k proaktivnemu pristopu. Po proučitvi dokumenta je ministrstvo pričelo z izvajanjem številnih dejavnosti za ponovni zagon čebelarstva.

K temu je gotovo pomembno prispeval tudi **Dušan Kresal** sam, saj je imel kot nekdanji glavni republiški kmetijski inšpektor odprta večino vrat na ministrstvu in drugih ustanovah.

Viktor Krek, sekretar na MKGP, je v zvezi dogajanjem v 90-ih letih na čebelarskem področju leta 2004 povedal: »Projekt (beri: Kresal) nam je na ministrstvu **razširil pogled na pomen čebelarstva za celotno kmetijstvo in ohranitev rodovitnosti naravnega okolja**. Pomembno je prispeval k odločitvi, da je ministrstvo začelo vrsto dejavnosti, ki jih do tedaj sploh ni izvajalo, oziroma se je lotilo prenove obstoječega stanja:

- reorganizacija ONS,
- ustanovitev veterinarske svetovalne službe,
- ugotavljanje kakovosti čebeljih pridelkov,
- priprava pravilnika o medu,
- poudarek izobraževanju in usposabljanju čebelarjev itd.

»Projekt je bil tisti sprožilec, ki je prinesel veliko novih zamisli in svežega vetra v čebelarstvo, panoga je zopet začela pridobivati pomen, čebelarji in tudi strokovni delavci pa samozavest in ponos.«

S tako samozavestjo je v čebelarski prostor devetdesetih let prejšnjega stoletja vstopil mlad doktorant **Janez Poklukar**. S svojimi znanstvenimi, strokovnimi, organizacijskimi, praktičnimi in človeškimi odlikami je prepričljivo zastopal interese čebelarstva na številnih področjih, seveda pa mu je bilo v veliko pomoč sodelovanje z **Dušanom Kresalom** v okviru Sekcije, kasneje tudi v okviru SAČD.

Kadrovska zasedba leta 1992 in 2018

Če povzamemo: projekt je bil temelj za vzpostavitev znanstveno-strokovnega čebelarskega vrha in svetovalne službe ter močne čebelarske organizacije. Zelo preprost kazalnik je (ocenjeno) število ljudi, ki so delali na tem

področju leta 1992, in ki delajo v letu 2018 ter so ali so bili v celoti ali delno financirani iz javnih sredstev oziroma iz članarine čebelarjev.

Kot je razvidno iz preglednice, je bilo v začetku leta 1992 zaposlenih 12 ljudi, vendar je pri tem treba pripomniti, da je bilo od tega števila sedem veterinarjev specialistov za zdravstveno varstvo čebel, ki so bili na začetku strokovnega delovanja in so se v marsičem še učili čebelarstva.

Če jih odštejemo, ostane pet zaposlenih v čebelarstvu. Na Kmetijskem inštitutu Slovenije **Janez Poklukar** in **Marjan Kokalj**, na ZČDS urednik Slovenskega čebelarja **Janez Mihelič** ter tajnik zveze **Milan Runtas** in po reorganizaciji opazovalno-napovedovalne službe še **Pavel Zdešar**.

Ob drugih obveznostih so se s čebelarstvom ukvarjali še na posameznih oddelkih Biotehniške in Veterinarske fakultete, kmetijskem ministrstvu in kmetijskih šolah. Glede na majhno število dejavnih v čebelarstvu ne čudi, da je bil položaj v panogi takrat zaskrbljujoč.

Slika v letu 2018 je povsem drugačna. Po nam dostopnih podatkih je sedaj iz javnih sredstev in članarine financiranih 39 ljudi v celoti, poleg delno še 32. Izrazito so se okrepili na Kmetijskem inštitutu Slovenije, javna svetovalna služba (ki je leta 1992 seveda še ni bilo in je začela delovati leta 2005), kmetijsko ministrstvo, pa tudi na srednjih kmetijskih oziroma biotehniških šolah je čebelarstvo spet dobilo primerno pozornost.

TRETJA ZLATA DOBA SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA?

Menimo, da so številke v veliki meri sad projekta OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA

Število ljudi, ki jih financiramo iz javnih in društvenih sredstev, je spodbudno in tako pozornost (in sredstva) je čebelarstvu namenjala verjetno zgolj **cesarica Marija Terezija**. To je bilo v času, ki ga **Tita Porenta** v knjigi **Veliki ljudje slovenskega čebelarstva** imenuje prva zlata doba slovenskega čebelarstva z **Glavarjem, Goličnikom, Jonkejem** in **Janšo** na čelu. Obdobje izpred približno 150 let pa druga zlata doba, ki jo zastopajo **Rothschütz, Ambrožič, Lakmayer, Jager** in drugi.

Četudi ne omenjamo pomembnih imen sodobnikov, lahko čebelarsko dogajanje v tretjem tisočletju opredelimo kot zelo živahno, dinamično in spodbudno, k čemur je brez dvoma prispeval tudi Predlog razvojnega projekta »OBNOVA IN RAZVOJ SLOVENSKEGA ČEBELARSTVA« iz leta 1992, ki je nastal pod vodstvom **Dušana Kresala**. Kako uspešni bi šele bili, če bi čebelarska organizacija

Preglednica 1: Primerjava števila ljudi, ki so delali na področju čebelarstva leta 1992 in 2018 in so ali so bili v celoti ali delno financirani iz javnih sredstev oziroma iz članarine čebelarjev

Ustanova	1992		2018	
	V celoti	Delno	V celoti	Delno
Kmetijski inštitut Slovenije	2	0	6	3
Biotehniška fakulteta UL	0	3	2	8
Veterinarska fakulteta UL (vključno NVI)	7	2	10	3
ZČDS ČZS (vključno ONS; STRP)	3	1	6	2
Javna svetovalna služba v čebelarstvu	/	/	8	0
MKGP in organi v sestavi	0	3	5	6
Nacionalni inštitut za biologijo	0	0	1	0
Kmetijske/biotehniške šole	0	2	0	9
Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije	/	/	/	1
Slovenska čebelarstva akademija (KIS)	/	/	1	0
SKUPAJ	12 (5)	11	39	32



Dušan Kresal pri svojih čebelah na Kamnem pri Šentrupertu na Dolenjskem

projekt že leta 1992 uradno vzela za svojega in bi z roko v roki delovala skupaj s Sekcijo za čebelarstvo pri DKITS. Tega žal ne moremo ugotoviti, saj nimamo vzporednega sveta.

Kakorkoli: ali lahko dandanes rečemo, da smo v tretji zlati dobi slovenskega čebelarstva? Oziroma, kaj moramo še storiti, da bomo? Na vprašanje mora imeti v prvi vrsti odgovor približno 70 ljudi, ki danes v celoti ali delno delajo v čebelarstvu.

LITERATURA

- FIRM, Janez: Pomen navzočnosti čebelarjev v krajevnih medijih in organih, Slovenski čebelar 6/1993, str. 175–176.
- JENKO, Mira: Organizirana služba za zdravstveno varstvo čebel, Slovenski čebelar 2/1992, str. 36/37.
- KRESAL, Dušan: Ob ustanavljanju sekcije za čebelarstvo pri DKITS, Slovenski čebelar 12/1989, str. 374.
- KRESAL, Dušan: O poapneli zalegi, tokrat malo drugače, Slovenski čebelar 1/1992, str. 13–16.
- KRESAL, Dušan, RIHAR, Jože, ŠTAMPAR, Franci, FIRM, Janez, ZUPET, Vito, MEOLIC, Damjan: Obnova in razvoj Slovenskega čebelarstva, predlog razvojnega projekta, Biotehniška fakulteta, Agronomija, Katedra za sadjarstvo in vinogradništvo, Zveza kmetijskih inženirjev in tehnikov, Sekcija za čebelarstvo, 1992, 88 str.
- KRESAL, Dušan: Poročilo o raziskovalnem in strokovnem delu prof. dr. Jožeta Riharja slovenskemu čebelarstvu za danes in jutri (strokovno srečanje čebelarjev ob njegovi 80-letnici). Slovenski čebelar, 5/1994, str. 141–144.
- KRESAL, Dušan: Zaključno poročilo o delu komisije za pripravo predloga pravilnika o kakovosti medu in čebeljih pridelkov. MKGP, 19. 11. 1997, interno gradivo, 3 str.
- MIHELIC, Janez: Posvet o strategiji razvoja slovenskega čebelarstva, Slovenski čebelar 6/1992, str. 180.
- MIHELIC, Janez: Nekaj najpomembnejših ugotovitev in sklepov delegatov na 42. redni letni skupščini Zveze čebelarstev Slovenije, Slovenski čebelar, 6/1993 str. 161–166.
- MIHELIC, Janez, Cene medu v trgovinah in na drobno na trgu, Slovenski čebelar 4/1995, str. 123.
- PAPEŽ, Marjan: Je pet let po sprejemu strategije čebelarstvo na razpotju? Kmečki glas 7/1997, str. 4.
- PAPEŽ, Marjan in sod: Sadovi dela Dušana Kresala v slovenskem čebelarstvu, Brdo pri Lukovici, Slovensko akademsko čebelarstvo društvo, 2004, 54 str.
- PAPEŽ, Marjan in sod: Sadovi dela dr. Janeza Poklukarja v slovenskem čebelarstvu, Brdo pri Lukovici, Slovensko akademsko čebelarstvo društvo, 2014, 76 str.
- POKLUKAR, Janez: Pet let dela službe za čebelarstvo pri Kmetijskem inštitutu Slovenije Slovenski čebelar 12/1989, str. 359–363.
- POKLUKAR, Janez, KRESAL, Dušan. Pridelava in poraba medu v Sloveniji. *Sodobno kmetijstvo*, ISSN 0350-1655, 1996, let. 29, št. 9, str. 374–376.
- POKLUKAR, Janez, ROME, Rudolf, BAJC, Martin, CETINA, Miroslav, GREGORC, Aleš, HRATELJ, Marko, KOZMUS, Peter, LUZAR, Peter, RONČEVIČ, Borut, TOMEČ, Anton, ŽAGAR, Maša. *Razvoj slovenskega čebelarstva: smernice za obdobje 2004–2009*. Brdo pri Lukovici: Čebelarstva zveza Slovenije, 2004, 54 str.
- PORENTA, Tita, in sod: Veliki ljudje slovenskega čebelarstva, ČZS in Čebelarstveni muzej Radovljica, 2018, 182 str.
- RESOLUCIJA o zaščiti kranjske čebele, Uradni list RS št. 18/2014 <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=RESO98>
- RUNTAS, Milan: Izračun povprečne proizvodne cene medu za prelevmansko zaščito, Slovenski čebelar, 12/1992, str. 20–22.
- SCHLAMBERGER, Vlado: Svetovanje v čebelarstvu, MKGP, 26. 2. 1998; interno gradivo, 1 str.
- SKOK, Marjan: Vsi čebelarji smo Zveza čebelarstev Slovenije, 7/8 1993, str. 201–202.
- SMERNICE za nadaljnji razvoj slovenskega čebelarstva, Zveza čebelarstev Slovenije, 22. 4. 1992, interno gradivo, 5 str.
- STRATEGIJA za izvajanje resolucije o strateških usmeritvah razvoja kmetijstva in živilstva do leta 2020, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, 2014, str. 149–153.

KAKO LAHKO S POMOČJO SVETOVNEGA DNE ČEBEL ZAGOTOVIMO BOLJŠE POGOJE ZA PREŽIVETJE ČEBEL?

Peter KOZMUS¹

Izvleček

Čebele so pomembne opraševalke, ki zagotavljajo hrano, prehransko varnost, trajnostno kmetijstvo, biotsko raznovrstnost ter s tem pomembno doprinesejo k blažitvi podnebnih sprememb in ohranjanju okolja. Zaščita čebel tako dolgoročno prispeva k zmanjševanju lakote in revščine ter ohranjanju zdravega okolja. Znanstvene študije potrjujejo, da so čebele v zadnjem obdobju vse bolj ogrožene in nas s tem nagovarjajo k spremembam. Zaradi številnih groženj s katerimi se soočajo čebele, lahko le s skupnim prizadevanjem poskrbimo za ohranitev čebel in njihovega življenjskega prostora. V tej smeri nam bo v prihodnje v veliko pomoč, v letu 2017 razglašen svetovni dan čebel, s pomočjo katerega bomo javnost uspešneje obveščali, da so čebele pomembne, da so ogrožene in kaj moramo vsi skupaj narediti, da bodo čebele uspešneje preživele.

Ključne besede: Čebele, opraševalci, opraševanje, svetovni dan čebel

HOW CAN WE ENSURE BETTER CONDITIONS FOR THE SURVIVAL OF BEES BY MEANS OF THE WORLD BEE DAY?

Abstract

Bees are important pollinators that provide food, food security, sustainable agriculture, biodiversity, and thus contribute significantly to reduce climate change and preserving the environment. Bee protection in the long term contributes to the reduction of hunger and poverty and the preservation of a healthy environment, as well as biodiversity. Scientific studies confirm that in recent years bees have been increasingly endangered and have been urging us to change. Due to the many threats faced by bees, we can only take care of conservation of bees and their habitat by working together. In the future, the World Bee Day will be of great help to us, which will give us better communicate with public that bees are important, that they are at risk and what we must all do together so that bees would survive in the future.

Key words: Bees, pollinators, pollination, world bee day

¹ Dr., Čebelarstva zveza Slovenije, Brdo pri Lukovici 8, 1225 Lukovica



STANJE ČEBEL

V zadnjem obdobju so čebele vse bolj ogrožene. To potrjujejo številne raziskave in nedavna poročila svetovno priznanih organizacij (poročilo Združenih narodov, poročilo Svetovne zveze za varstvo narave IUCN, poročilo nevladne okoljske organizacije Greenpeace). IUCN poročilo iz leta 2015, ki je opravilo prvo celostno oceno evropskih čebeljih vrst, navaja, da skoraj 10 % čebel grozi izumrtje, dobrih 5 % jih je verjetno ogroženih, za skoraj 57 % vrst nimamo podatkov.

Število opravevalcev po vsem svetu upada, po drugi strani pa naraščajo potrebe po opravevanju, še zlasti v državah v razvoju. Razvoj dogodkov so raziskovalci imenovali »kriza opravevalcev«.



Zaradi intenzivnega kmetijstva je cvetočih rastlin na travnikih vse manj. Posledično imajo čebele in ostali opravevalci na voljo vse manj virov hrane.

POMEN ČEBEL

Da bi lahko nahranili naraščajoče svetovno prebivalstvo, potrebujemo vedno več hrane, ki mora biti raznolika, uravnotežena in kakovostna.

Čebele zagotavljajo visoko kakovostne proizvode (med, matični mleček in cvetni prah) kot tudi drugih izdelkov, ki jih uporabljamo v zdravstvu in drugih panogah (čebelji vosek, propolis in čebelji strup). Poleg tega je vloga čebel, kot opravevalk še pomembnejša. Čebele in ostali opravevalci opravevajo skoraj tri četrtine vseh rastlin, s katerimi proizvajamo hrano.

Trajnostno kmetijstvo

V preteklih petdesetih letih se je količina pridelkov, odvisnih od opravevalcev (kot so sadje, zelenjava, semena, oreščki in oljnice), povečala za trikrat. Čebele imajo pomembno vlogo pri obsegu kmetijske proizvodnje. Učinkovito opravevanje povečuje količino kmetijskih pridelkov, izboljšuje njihovo kakovost in povečuje odpornost rastlin proti škodljivcem.

Kulturne rastline, ki so odvisne od opravevanja, so pomemben vir prihodkov kmetov, predvsem majhnih in družinskih kmetov v državah v razvoju. Milijonom ljudi zagotavljajo delovna mesta in dohodek. Po oceni mednarodne študije Medvladne znanstvene platforme o biodiverziteti in ekosistemskih storitvah iz leta 2016 je letna svetovna proizvodnja hrane, ki je neposredno odvisna od opravevanja, vredna med 235 in 577 milijard USD.



Cvetoči travniki nudijo čebelam bogat vir hrane in ugodne pogoje za razvoj.

Biotska raznovrstnost in varovanje okolja

Čebele imajo pomembno vlogo pri ohranjanju ekološkega ravnovesja in biotske raznovrstnosti v naravi. Zagotavljajo eno najbolj prepoznavnih ekosistemskih storitev – opravevanje, zaradi katere je pridelava določene hrane sploh mogoča. S tem varujejo in skrbijo za ekosisteme, živalske ter rastlinske vrste in tako prispevajo h genetski ter biotski raznovrstnosti.

Čebele so tudi pokazatelj razmer v okolju. Njihova prisotnost, odsotnost oziroma številčnost nam sporoča, kdaj se z okoljem nekaj dogaja in da je treba ukrepati. Z opazovanjem razvoja in zdravstvenega stanja čebel je mogoče ugotoviti spremembe v okolju in pravočasno izvesti potrebne varstvene ukrepe.

RAZGLASITEV SVETOVNEGA DNE ČEBEL

Zaradi širšega pomena čebel je Čebelarska zveza Slovenije leta 2014 podala pobudo, da 20. maj postane svetovni dan čebel (SDČ). Pobudo je leta 2015 podprla Vlada Republike Slovenije, septembra 2015 pa tudi APIMONDIA, ki je največja čebelarska organizacija na svetu. Celoten postopek razglasitve je bil dolgotrajen in je obsegal številne korake, v katere so bili vključeni številni organi med katerimi sta glavnino dela opravilo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano ter Čebelarska zveza Slovenije.

KRONOLOGIJA POMEMBNEJŠIH DOGODKOV POVEZANIH Z RAZGLASITVIJO SVETOVNEGA DNE ČEBEL

Leto 2014

Datum	Dogodek
15.9.2014	Rojstvo ideje za svetovni dan čebel (predsedniku Čebelarstva Slovenije Boštjanu Noču se ob poslušanju radia porodi ideja o svetovnem dnevu čebel)
26.9.2014	Pisna podpora ministra za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano mag. Dejana Židana, da si bo Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano prizadevalo za uresničitev pobude o svetovnem dnevu čebel.
6.10.2014	Predsednik Republike Slovenije Borut Pahor podpre idejo o svetovnem dnevu čebel.

Leto 2015

Datum	Dogodek
25.2.2015	Državni Svet Republike Slovenije podpre pobudo o razglasitvi svetovnega dneva čebel.
15.3.2015	ApiSlovenija – predstavitev pobude čebelarji javnosti.
2.4.2015	Vlada Republike Slovenije je na pobudo Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano sprejela pobudo Čebelarstva Slovenije, da se 20 maj razglasi za svetovni dan čebel.
16.4.2015	Predstavitev pobude v Evropskem parlamentu poslancem Odbora za kmetijstvo in razvoj podeželja.
11.5.2015	Predstavitev pobude ministrom na Svetu EU za kmetijstvo in ribištvo.
20.5.2015	Ustanovitev in 1. sestanek projektne skupine za usklajevanje aktivnosti iskanja podpore za pobudo, da se pri Organizaciji združenih narodov vloži predlog Republike Slovenije za razglasitev svetovnega dneva čebel.
9.6.2015	Predstavitev pobude generalnemu sekretarju Apimondia.
10.6.2015	Predstavitev pobude generalnemu direktorju Organizacije združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) Joséju Grazianu da Silva in predsedujočim državam regionalnih skupin FAO.
15.–20.9.2015	APIMONDIA podpre pobudo 20. maj za svetovni dan čebel na 44. mednarodnem kongresu, Daejeon, Južna Koreja.
16.9.2015	Pobuda v nagovoru predsednik Vlade Republike Slovenije dr. Mira Cerarja na 70. zasedanju generalne skupščine Organizacije združenih narodov (OZN), New York.
24.10.2015	Predstavitev pobude na Dnevu odprtih vrat v palači narodov ob 70. obletnici Organizacije združenih narodov (OZN), Ženeva, Švica.
21.10.2015	Predstavitev pobude udeležencem 11. konference Coloss, Brdo pri Lukovici.

Leto 2016

Datum	Dogodek
3.12.2015-20.4.2016	Predsednik ČZS za namen promocije SDČ obišče 204 čebelarstev. Slogan obiskov je: Svetovni dan čebel združuje Slovence in povezuje svet!
4.-6.5.2016	Predstavitev pobude na FAO Evropski regionalni konferenci, Turčija.
20.5.2016	Obisk generalnega direktorja Organizacije združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) Joséja Graziana da Silva v Sloveniji in okrogla miza »Čebele in trajnostni razvoj«, Ljubljana.
20.5.2016	Okrogla miza »World Bee Day: To Bee or Not To Bee«, New York.
13.6.2016	Predstavitev pobude na Tednu čebel v Evropskem parlamentu, Bruselj.
16.9.2016	Pobuda v nagovoru predsednik Republike Slovenije Boruta Pahorja na 71. zasedanju generalne skupščine Organizacije združenih narodov (OZN), New York.
26.-30.9.2016	Predstavitev pobude na Odboru za kmetijstvo Organizacije združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO), Rim (1. korak formalnega postopka v okviru FAO) in predstavitev paviljona Čebelji svet.
13.10.2016	Slavnostna otvoritev paviljona Čebelji Svet na Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.
5.-9.12.2016	Predstavitev pobude na Svetu Organizacije združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO), Rim, Italija (2. korak formalnega postopka v okviru FAO).

Leto 2017

Datum	Dogodek
3.7.7.2017	Konferenca FAO je dokončno potrdila resolucijo in sprejela odločitev, da se resolucija predloži v obravnavo in sprejem na Generalno skupščino OZN v New York-u-
17.11.2017	Resolucija je bila soglasno sprejeta na plenarnem zasedanju 2. Odbora Generalne skupščine OZN. 115 držav, vključno s Slovenijo, se je pridružilo resoluciji v vlogi kosponsoric.
20.12.2017	Generalna skupščina Organizacije združenih narodov (OZN) je v New York-u soglasno sprejela resolucijo, s katero je 20. maj razglasila za svetovni dan čebel.



Slovenska delegacija v New York-u nekaj minut po razglasitvi svetovnega dne čebel.

PRAZNOVANJE SVETOVNEGA DNE ČEBEL

Osrednje praznovanje prvega SDČ je bilo v letu 2018 v rojstnem kraju Antona Janša v občini Žirovnica na Gorenjskem. Praznovanja se je udeležilo več kot 5000 obiskovalcev med katerimi je bilo največ čebelarjev. Praznovanja sta se udeležila tudi generalni direktor Organizacije združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO) José Graziano da Silva in predsednik mednarodne čebelarске organizacije APIMONDIJA. Slednji je v nagovoru Slovenskim čebelarjem dal pomembno priznanje za opravljen trud da je 20. maj postal svetovni dan čebel.

Namen svetovnega dne čebel

Namen SDČ pa ni le praznovanje. Seveda smo lahko ponosni in veseli, da smo s pobudo za razglasitev svetovnega dne čebel uspeli, vendar je namen razglasitve svetovnega dne čebel širši.

Glavni namen svetovnega dne čebel je izboljšanje pogojev za preživetje čebel in ostalih oprasačevalcev. V te spremembe je potrebno poleg politike in čebelarjev vključiti tudi širšo javnost, pri čemer nam je lahko SDČ v veliko pomoč. Predvsem širšo javnost pa tudi politične odločevalce je potrebno o pomembnosti čebel najprej celostno informirati. Zato je prvi korak v smeri izboljšanja pogojev za preživetje čebel povečati osveščanje javnosti o pomemb-

nosti čebel. S tem bo javnost bolj motivirana pripravljena delovati v njihovo rešitev oz. odpravo težav.

Tveganja, s katerimi se soočajo čebele, so odvisna od določene regije na svetu in posamezne države, ki izvajajo politike, ki imajo vpliv na kmetijstvo. Ključna tveganja so naslednja:

- uporaba čebelam nevarnih pesticidov;
- intenzivno kmetijstvo;
- uporaba gensko spremenjenih rastlin;
- globalne klimatske spremembe;
- prisotnost nepristnega medu na trgu;
- globalizacija in prenos oz. širjenje novih čebeljih boleznih in škodljivcev.

Vzporedno z informiranjem javnosti in politike o tveganjih, s katerimi se soočajo čebele in ostali oprashaevalci, moramo podati tudi predloge, kaj lahko ljudje in politika naredi za izboljšanje pogojev za preživetje čebel.

Kaj lahko ljudje naredimo za čebele

Na vprašanje: *Kaj potrebujejo čebele za nemoten razvoj in obstoj?* je možen zelo kratek odgovor. Primerno mesto za bivanje in neoporečen vir hrane. V praksi je to težje zagotoviti. Večjo težavo predstavlja zagotavljanje vira neoporečne hrane preko celotne sezone. Na splošno moramo v prihodnje za boljše preživetje čebel opraviti naslednje naloge:

- uporaba moderne tehnologije čebelarjenja, ki zmanjšujejo vplive globalnih klimatskih sprememb;
- zmanjšanja uporabe čebelam nevarnih pesticidov;
- sajenje medovitih rastlin, dreves na javnih in zasebnih površinah;
- sejanje travnikov in njiv z medovitimi rastlinami;
- uživanje lokalno pridelanega medu;
- moralna podpora čebelarjev.



Ajda v pozno poletnem času čebelam nudi odličen vir nektarja in cvetnega prahu.

PRILOŽNOSTI SVETOVNEGA DNE ČEBEL

Čas pred, med in po obeležitvi SDČ, moramo čebelarji in strokovni delavci s področja čebelarstva dobro izkoristiti. V tem obdobju imamo na voljo več medijskega prostora, za objavo prispevkov v različnih časopisih in revijah, za sodelovanje v radijskih in televizijskih oddajah, možno je tudi razdeljevanje informativnih letakov, brošur... Poleg tega lahko v tem času organiziramo različne dogodke, akcije v šolah ali drugih javnih in zasebnih ustanovah v katerih moramo poudarjati:

- da so čebele **pomembne**,
- da so čebele **ogrožene** in
- **kaj moramo narediti v prihodnje**, da pogoje za njihovo preživetje izboljšamo.

To so tri glavne točke, ki jih moramo predstaviti širši javnosti in političnim odločevalcem. Že v prvem letu praznovanja SDČ smo ugotovili, da so čebele v javnosti prepoznane kot pomembne, več dela pa nas čaka pri informiranju ljudi o rešitvah, da trenutno stanje izboljšamo. Verjamem, da je čas za spremembe pravi in da nam bo pri tem v veliko pomoč SDČ.

RAZVOJ – HIŠA KRANJSKE ČEBELE V VIŠNJI GORI

Matej MANDELJ¹

Izvleček

Kranjska čebela, na katero smo Slovenci upravičeno ponosni, je v rojstnem kraju dobila svoj dom. Zgodilo se je z odkritjem obeležja kranjski čebeli v Višnji Gori, ob prvem praznovanju svetovnega dneva čebel v Sloveniji, meseca maja 2018. Skozi sodobno oživitev delovanja Emila Rotschütza (1836-1909) iz višnjanske Podsmreke, ki je ponesel takrat novo in neimenovano pasmo čebel v svet, skrbimo za celovito negovanje in širjenje poznavanja in varovanja kranjske čebele ter nasploh pomena čebel za krog življenja na našem planetu. V novo nastajajočem Domu kranjske čebele, bo na nov sodoben in interaktiven način predstavljeno slovensko čebelarstvo in kranjska čebela. Zamisel je tudi, da bi bil na novo postavljeni čebelnjak v Višnji Gori slovenski »paradni čebelnjak«.

Ključne besede: Dom Kranjske čebele, Občina Ivančna Gorica, Višnja Gora, Emil Rotschütz, kranjska čebela, obeležje.

DEVELOPMENT - HOUSE OF THE CARNIOLAN BEE IN VIŠNJA GORA

Abstract

The Carniolan Honey Bee, which Slovenes are justly proud of, has been given a home in its place of birth. It was inaugurated with the unveiling of a monument to the Carniolan Honey Bee in Višnja Gora, as part of celebrations of World Bee Day in May 2018. Emil Rothschild (1836-1909) from Podsmreka near Višnja Gora, took a hitherto unknown species of bee out into the world. Today we carry on his work, nurturing and spreading knowledge of the Carniolan Honey Bee. In doing so, we draw attention to the importance of bees in the life circle of our planet. In the newly emerging Home of the Carniolan Honey Bee, beekeeping in Slovenia and Carniolan Honey Bee will be presented in a new modern and interactive way. The idea is also that a newly-established apiary in Višnja Gora becomes a Slovenian »representative apiary«.

Key words: Home of the Carniolan Honey Bee, Municipality of Ivančna Gorica, Višnja Gora, Emil Rotschütz, Carniolan honey bee, monument.

¹ Mag.upr.ved, Čebelarstva zveza Slovenije

UVOD

Leta 1857 je dr. Philip Rothschütz v članku z naslovom Aus Unterkrain zapisal: »Obstaja pa ena pridna in utrjena čebela, taka je kranjska.« Njegovo delo je nadaljeval sin Emil. Kranjska čebela, ki jo imenujemo še kranjica, kranjska sivka ali le sivka, je dobila ime po deželi Kranjski, v katero je spadalo tudi območje današnje Dolenjske. Na tem področju se je skozi evolucijo kranjska čebela ustalila. Slovenci in slovenski čebelarji smo nanjo upravičeno ponosni, saj jo odlikujeta mirnost in pridnost. Prav zaradi svojih dobrih lastnosti je priljubljena po vsem svetu.

ZAKAJ VIŠNJA GORA

Zgodovinska dejstva

Letos februarja je minilo 150 let od ustanovitve prvega Kranjskega trgovskega čebelnjaka na gradu Podsmreka pri Višnji Gori. Ustanovili so ga čebelarji družine Rothschütz z baronom Emilom na čelu. Na široko so odprli trgovino s kranjsko čebelo in neposredno vplivali na ohranjanje njene čistosti. To je bil čas prvega podrobnega opisa in poimenovanja kranjske čebele, njenega širjenja po Evropi in svetu, priznanja, in kar je najpomembnejše, vpisa kot samostojne podvrste v zoološko sistematiko medonosne čebele – *Apis mellifera carnica*, Pollmann 1879.

Čebelarji družine Rothschütz imajo pionirsko vlogo pri poimenovanju, uveljavitvi, širjenju in priznanju kranjske čebele. Družina Rothschütz je v 19. stoletju delovala prav na bližnjem gradu Podsmreka, kjer je z naprednim čebelarjenjem in trgovanjem poskrbela, da si je kranjska čebela uspešno utirala pot v svet. Njen najbolj vidni predstavnik je kot že rečeno Emil Rothschütz. Slednji je eden najboljših evropskih čebelarskih strokovnjakov svojega časa, ki je prebival in deloval v gradu Podsmreka pri Višnji Gori. Prav zato je Občina Ivančna Gorica vso to dediščino, ki so jo zapustili naši predniki, prepoznala kot svojo priložnost in predvsem odgovornost.

TRENTNA SITUACIJA

Postavitev učnega čebelnjaka

S slovesno otvoritvijo Čebelnjaka Kranjske čebele in parka medovitih rastlin 10. maja 2018, se je v Višnji Gori začela čebelarska zgodba, ki je bila povezana z uvodom v praznovanje prvega Svetovnega dne čebel in 540-letnice pridobitve mestnih pravic Višnje Gore. Njegova postavitve je del nastajajočega obeležja kranjski čebeli v Višnji Gori, ki bo v povezavi z bodočo Hišo kranjske čebele v stavbi nekdanje šole zanimiv turistični produkt in učna ustanova.



Slika 1. Dogodek ob postavitvi temeljnega kamna obeležja kranjski čebeli. Foto: Gašper Stopar.



Slika 2. Dogodek ob slovesni otvoritvi učnega čebelnjaka. Foto: Gašper Stopar.

Občina Ivančna Gorica je skupaj s Čebelarstvo zvezo Slovenije in SID banko v starem mestnem jedru uredila park medovitih rastlin s čebelnjakom Kranjske čebele. Z njim se želi poudariti tesno povezanost Višnje Gore s Kranjsko čebelo (sivko), kot eno najbolj prepoznavnih čebeljih vrst v Evropi.

Na dan otvoritve učnega čebelnjaka, je bila v knjižnici Ivančna Gorica predstavljena knjiga z naslovom Kranjska čebela in čebelarji družine Rothschild, katere avtor je prof. dr. Andrej Šalehar. Knjiga vsebuje zakladnico novih informacij in raziskovanj ter tako predstavlja našo pomembno dediščino.

Postavitev spominskega obeležja

Slovesno odkritje spominskega obeležja Kranjski čebeli je potekalo v petek, 18. maja 2018, v sklopu praznovanja prvega Svetovnega dne čebel, ki ga je pripravila Občina Ivančna Gorica v sodelovanju s Čebelarstvo zvezo Slovenije.

Prireditve se je udeležilo preko tisoč domačih in tujih gostov. Župan Dušan Strnad je ponosno povedal, da se je praznovanje Svetovnega dne čebel začelo prav v domovini Kranjske čebele v Višnji Gori. Kot je dodal, bo po odkritju obeležja Kranjske čebele in odprtju učnega čebelnjaka sledila obnova starega mestnega jedra s prenovo nekdanje

stare šole v Hišo kranjske čebele z interaktivnim muzejem. Kot veliko željo je izpostavil, da v Višnjo Goro pripeljejo del programa Slovenske čebelarke akademije, ki je bila pred kratkim ustanovljena. Poudaril je še, da Hiša kranjske čebele ne bo namenjena zgolj obiskovalcem, temveč bo s svojimi vsebinami stičišče kulturnega in družabnega življenja v starodavnem mestu, ki letos praznuje 540-letnico pridobitev mestnih pravic.

Slovesnega odkritja obeležja v Višnji Gori se je udeležil tudi predsednik mednarodne čebelarke zveze Apimondia, gospod Philip McCabe. V svojem nagovoru ni skrival navdušenja nad Slovenijo: »V čast mi je, da sem tukaj, saj je bil svetovni dan čebel vaša ideja. Vedno rečem, da so Slovenci najboljši čebelarji«. Izpostavil je tudi pomen čebel in drugih opravevalcev za življenje ljudi, vpliv podnebni sprememb in bolezni čebel, ter pomen upoštevanja dobrih čebelarških praks.

Opis obeležja kranjski čebeli

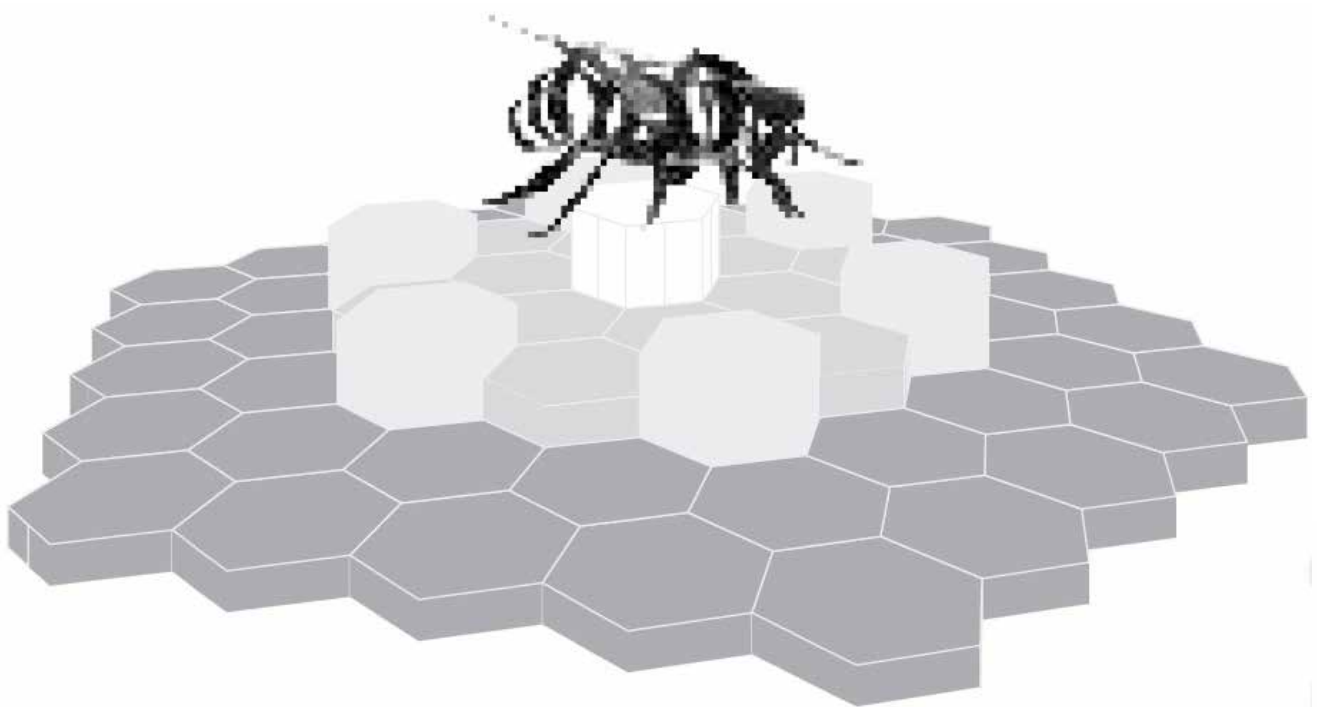
Pomenu in sporočilnosti primerno se je avtor odločil za ikonografsko upodobitev čebele znotraj obeležja. Glavni simbol obeležja je skelet kranjske čebele delavke v nerjaveči kovini. Zakaj? Visoko učinkovit sistem instinktivnega delovanja celotnega čebeljega roja kot enega organizma



Slika 3. Dogodek ob slovesnem odkritju obeležja kranjski čebeli. Foto: Gašper Stopar.

je ljudem precej tuj. Prav to nam avtor približa z izvirno matrico, ki vsakemu omogoči oblikovanje osrednje skulpture obeležja, podobno kot instinkt vodi čebele k skupnemu rezultatu.

Pohodni terasasti venec obeležja v posebni obdelavi betonske osnove iz šestkotnih elementov predstavlja hibrid čebeljega in človeškega sveta. Nam znane imitacije kamnitega obzidja, stolpa, krone ali zmagovalnega podija, ki



Slika 4. Spominsko obeležje v Višnji Gori v 3D pogledu. Foto: Arhiv Občine Ivančna Gorica.



Slika 5. Izgled zunanosti Hiše kranjske čebele. Foto: Arhiv Občine Ivančna Gorica.

v čebeljem svetu pomenijo opojni cvet, razvojne celice in polno satovje, nas profilno spomnijo na simbol slovenstva - Triglav in simbol lokalne destinacije Prijetno domače.

Druga terasa nosi 12 zgodovinsko najpogosteje upodobljenih motivov slovenskih panjskih končnic. Podobe so enobarvni posnetki izvornih končnic, ki jih hrani Čebelarški muzej v Radovljici. Dodana je ikonografija deležnikov in skladna svetlobna ter zvočna tehnika. Za polno doživljanje je obeležje dostopno, kar ga organsko umesti v ostale funkcije prostora.

Ostali podatki o obeležju: investitor – Občina Ivančna Gorica, avtor – Robert Kuhar, kovinski elementi – Dolinox d.o.o., motivi panjskih končnic – iz zbirke poslikanih panjskih končnic, ki jih hrani Čebelarški muzej Radovljica – izbor pripravila mag. Tita Porenta, kustosinja – muzejska svetnica, Zvočni posnetek panja kranjskih čebel: Rok Borštnik s.p.

Mednarodno tekmovanje mladih čebelarjev

Slovenija, ki je že od vsega začetka sodelovala na vseh tekmovanjih, je letos vložila uradno kandidaturo za organizacijo tekmovanja v Sloveniji. V ponedeljek, 17. 9. 2018, je predsednik ICYB g. Jiří Píze dodal potrditev kandidature. Podpisali smo listino, s katero je Čebelarški zvezi Slovenije (ČZS) zaupana organizacija Mednarodnega tekmovanja mladih čebelarjev v letu 2020 v Sloveniji, ki bo že 11. po vrsti.

V pripravah na kandidaturo se je ČZS povezala z občino Ivančna Gorica, ki bo občina gostiteljica in soorganizatorica tega dogodka, ki poleg osrednjega tekmovalnega

dela vključuje tudi izobraževalni in družabno-kulturno-turistični program. Občina Ivančna Gorica kot izvorni kraj kranjske čebele (grad Podsmreka pri Višnji Gori) nudi odlične turistične in izobraževalne možnosti kot tudi zadostne nastanitvene zmožnosti za tekmovalne ekipe iz različnih držav iz več celin. Naš cilj je 50 držav udeleženk tekmovanja. Vsaka ekipa sestoji iz treh tekmovalcev in dveh spremljevalnih oseb. Skupaj z organizacijskim osebjem bo v času tekmovanja navzočih do 300 oseb, kar pomeni, da bo živahno kot v panju.

CILJI ZA PRIHODNOST

Obnovitev stare šole

Objekt je delno podkleten, s pritlično etažo, 1. nadstropje in podstrešje. V kleti je vstopni hodnik z dvema prostoroma, ki sta namenjena kurilnici v velikosti 24 m² in 32 m², ter hodnik 12 m². V pritličju so tri učilnice v velikosti 55 m², 67 m² in 44 m², prostori kuhinje 20 m² in sanitarij 17 m², ostalih 40 m² zajemajo hodniki. Višina prostorov je 3,8 m. Tudi v nadstropju so tri učilnice velikosti 50 m², 61 m² in 36 m², hodniki v izmeri 30 m², dve pisarni po 18 m² in 11 m² ter 6 m² sanitarij. Višina prostorov je 4 m. Tloris podstrešja je 267 m². Ostrešje je vezano s tremi gredami, ki so med seboj oddaljene 214 cm. Objekt po vsej verjetnosti nima narejenega venca.

Opravljen je bila analiza obstoječe zgradbe in širše ter ožje okolice. Ideja obnove stavbe je, da bi se v njej uredili prostori z vablivo ponudbo.

Predlogi vsebin po prostorih: v kleti bo prostor za kotlov-



Slika 6. Izgled notranjosti in ležišč na podstrešju. Foto: Arhiv Občine Ivančna Gorica.

nico in shrambo, v pritličju bo muzej čebelarstva 1, turistično informativna točka, sanitarije, gostinski prostor in manjša kuhinja, večnamenska dvorana za izobraževanja, delavnice in predavanja. V nadstropju bo muzej čebelar-

stva 2, 3 in 4, čebelji panj, razstavni prostor, kjer bi se menjale predstavitev in razstave. V objektu so predvideni tudi nastanitveni prostori za 55 oseb.

ZAKLJUČEK

Kranjska čebela in srednjeveška Višnja Gora sta simbol slovenske marljivosti in trdoživosti, slovenskega ponosa in prijetne domačnosti.

Celoten projekt zajema prenovo starega mestnega jedra v Višnji Gori, obeležje kranjski čebeli ter popolno prenovo stare šole v Višnji Gori, ki smo jo poimenovali Hiša kranjske čebele. Vse vsebine v njej bodo posvečene kranjski čebeli, hiša bo med drugim pomenila tudi vstopno turistično

točko v občino. Znotraj se bo nahajal še Turistično informacijski center, kavarna, razstavni prostori, hostel in tisto, kar je najpomembnejše, muzejsko doživetje kranjske čebele. Hiša kranjske čebele bo hiša doživetij. Med drugim tudi sodoben muzej, ki bo nudil široko polje informacij o posebnostih in pomenu kranjske čebele.

LITERATURA

- Šalehar, A. (2017): Kranjska čebela in čebelarji družine Rothschild – knjiga.
- Šalehar, A. (2018): Kranjska čebela in čebelarji družine Rothschild. Časnik Delo 21. februar 2018.
- <http://www.ivancna-gorica.si/Obcina-Ivancna-Gorica/>

ČEBELARJENJE V TURČIJI: TRENUTNI RAZVOJ

Irfan KANDEMIR¹

Izvleček

Turčija ima največje število podvrst medonosne čebele v Evropi in Srednjem Vzhodu (*Apis mellifera anatoliaca*, *A. m. caucasica*, *A. m. meda*, *A. m. syriaca*) in lokalno prilagojenih populacij (Thrace, Yiğilca, Zonguldak, Muğla itd.). V osrednjo, nacionalno Turško čebelarstvo zvezo je vključenih 81 lokalnih čebelarskih zvez. Število čebeljih družin od ustanovitve Republike nenehno narašča, trenutno pa turški čebelarji oskrbujejo več kot sedem milijonov čebeljih družin. Letna pridelava medu se giblje okrog 100 tisoč ton, v povprečju pridelajo turški čebelarji od 15 do 16 kilogramov medu na čebeljo družino. Glede na podnebje, geografsko lego in pašne vire je letina precej pod pričakovanji čebelarjev. V želji po izboljšanju donosov medu so številne lokalne zveze pričele izvajati projekte z namenom opisa, selekcije in ohranjanja lokalno prilagojenih medonosnih čebel. Na tem področju sta pionirsko vlogo odigrala dva projekta, financirana s strani vlade, pet pa se jih je že zaključilo (Yiğilca, Thrace, Mugla, Egejsko in Črno morje). Trenutno sta dve podvrsti v programu zaščite, več različnih populacij pa je že ohranjenih z dovoljenjem Ministrstva za prehrano, kmetijstvo in živino. V teh populacijah se sedaj vrši selekcija na več zelenih lastnosti (visoki donosi medu, odpornost na bolezni, hiter spomladanski razvoj, mirnost in zmanjšana rojivost). Odbrane čebelje družine se uporablja za vzrejo matic z zelenimi gospodarskimi lastnostmi. Trenutno sta v teku tudi dva projekta, katerih glavni cilj je vzpostaviti konkurenčno čebelarstvo v Turčiji. Prvi je EU projekt, "My Bee, My Honey, My Honeycomb« (Moje čebele, moj med, moj medeni sat), drugi pa je ravnokar prijavljen na ministrstvo, imenovan »National Beekeeping Project« (Nacionalni čebelarski projekt), katerega glavni cilj je razvoj čebelarstva v Turčiji. Nedavni napredek v razvoju čebelarstva bo velikega pomena za prihodnost turškega čebelarstva.

Ključne besede: čebelarstvo, čebelarjenje v Turčiji, ohranjanje, selekcija

BEEKEEPING IN TURKEY: CURRENT DEVELOPMENTS

Abstract

Turkey has the highest honey bee subspecies diversity in Europe and in the Middle East consisting of many subspecies (*Apis mellifera anatoliaca*, *A. m. caucasica*, *A. m. meda*, *A. m. syriaca*) and locally adapted populations (Thrace, Yiğilca, Zonguldak, Muğla etc). A total of 81 city Beekeeping Associations are placed under the umbrella of Turkish Beekeeping Association. The colony number continuously increased since the establishment of the republic and now more than seven million bee hives are present in Turkey. However the total honey yield is around 100 thousand tons, an average of 15-16kg per colony. Based on the climate, geography and the floral sources, the yield is much lower than the beekeepers expectation. Currently to increase the yield several city Beekeeping Associations are started their local honey bee projects to characterize, select and conserve locally adapted honey bees. Two government granted projects became the pioneer of these local projects and already five were completed (Yiğilca, Thrace, Mugla, Aegean and Black Sea). Currently two subspecies are under conservation and also several other populations are conserved with the permission from the Ministry of Food, Agriculture and Livestock. From these stocks several characteristics (High honey yield, disease resistant, fast spring build up, not aggressive, not swarming) are now under selection. Some selected breeding stocks are now used for queen production. Two projects are also underway about the Turkish Beekeeping. One is an EU project namely »My Bee, My Honey, My Honeycomb« with the main goal to promote

¹ Department of Biology, Faculty of Science, Ankara University

competitive beekeeping sector in Turkey and the other one is just applied to the Ministry about »National Beekeeping Project« for the development of beekeeping in Turkey. These recent developments in Beekeeping will have a profound effect in Turkish beekeeping in the next years.

Key words: beekeeping, beekeeping in Turkey, conservation, selection

PREDSTAVITEV DELOVANJA SLOVENSKE ČEBELARSKE AKADEMIJE: VIZIJA, POMEN IN POSLANSTVO

Damjana GROBELŠEK¹

Izvleček

Slovensko čebelarstvo akademijo (SČA) opredeljuje Zakon o kmetijstvu ZKme-1E in je namenjena neformalnemu izobraževanju o slovenskem načinu čebelarjenja. SČA je del Kmetijskega inštituta Slovenije (KIS) in se nahaja v Ljubljani na sedežu inštituta. SČA je nastala kot odgovor na povpraševanje tujcev glede slovenskega bogatega znanja o čebelarstvu. Sestavlja jo predstojnik akademije in programski odbor s predstavniki KIS, trije predstavniki čebelarjev, ki jih predlaga Čebelarska zveza Slovenije, predstavnik javne svetovalne službe v čebelarstvu, predstavnik Univerze v Ljubljani, Biotehniške fakultete, predstavnik Univerze v Mariboru, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, predstavnik Univerze v Ljubljani, Veterinarske fakultete, Nacionalnega veterinarskega inštituta, predstavnik srednjih šol, izvajalk izobraževalnih programov s področja kmetijstva, predstavnik ministrstva, predstavnik ministrstva, pristojnega za izobraževanje, predstavnik ministrstva, pristojnega za zunanje zadeve. SČA je inovativna s svojim tematsko osredotočenim pristopom, ki spodbuja kandidate h kreativnemu mišljenju. Cilji Slovenske čebelarske akademije so izboljšanje znanja na področju čebelarstva v mednarodnem prostoru, povečanje promocije Slovenije, slovenskega čebelarstva in turizma, izboljšanje zaposlitvene možnosti, izboljšava ozaveščenosti o pomenu čebel in opravevanja.

Glavne besede: Slovenska čebelarska akademija, čebelarstvo, tematsko osredotočen pristop izobraževanja, kranjska sivka, Kmetijski inštitut Slovenije, promocija Slovenije, čebele

PRESENTATION OF SLOVENIAN BEEKEEPING ACADEMY: VISION, IMPORTANCE AND MISSION

Abstract

The Slovenian government has decided to set up the beekeeping academy of Slovenia (BAS) to serve mainly foreign learners with Slovenian beekeeping knowledge. The BAS is part of the Agricultural Institute of Slovenia (AIS) and is located at headquarters of AIS in Ljubljana. The establishment of the academy is defined by law (ZKme-1E). The aim of the Academy is to respond to the interests in knowledge about Slovenian beekeeping that has been shown from abroad. The BAS consists of the head of academy and programming committee, which includes representatives of the: AIS, the Ljubljana faculties of biotechnology, Veterinary medicine, as well as the Maribor Faculty of Agriculture and Life Sciences, representatives of beekeepers, public advisory service in beekeeping, representative of secondary schools, Ministry of education, science and sport, Ministry of agriculture, forestry and food, Ministry of foreign affairs. BAS is a pioneer in providing an innovative approach in leadership development, an innovative approach with Problem Based Education (PBE). By practising critical and creative thinking, students will be equipped to consider the impact of bees, based on social, environmental and economic criteria. The mission of BAS is to spread extensive knowledge of Slovenian beekeeping, spreading the ecological way of thinking and lifestyle, promoting Slovenia and knowledge of Slovenian beekeepers and endemic breed of Slovenian bee (*Apis mellifera carnica*) in the world and integrating different disciplines in a common mission of spreading quality knowledge about bees and beekeeping.

Key words: Beekeeping academy of Slovenia, beekeeping, problem based education, Carniolan bee, Agricultural institute of Slovenia, promotion of Slovenia, bees

¹ Dr. vet. med., predstojnica Slovenske čebelarske akademije, Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, Ljubljana, damjana.grobelsek@kis.si

UVOD

Dejstvo, da smo Slovenci čebelarški narod, kjer ima čebelarjenje poseben status kmetijske dejavnosti, botruje zavedanju o pomenu čebel in skrbi, da je znanje o čebelarjenju na visoki ravni.

Čebelarstvo v Sloveniji uživa mednarodno priznanje zaradi svoje tradicije ter posebnosti. Avtohtona podvrsta čebele *Apis mellifera carnica*, znana tudi pod imenom kranjska sivka, je druga najbolj razširjena vrsta čebele na svetu. SČA odgovarja na povpraševanje tujcev po slovenskem znanju o čebelarjenju. SČA bo s svojimi aktivnostmi pripomogla k spodbujanju razvoja čebelarstva po svetu in tudi v državah v razvoju ter s tem pripomogla k promociji Slovenije v tujini.



Slika 1: *A. mellifera carnica*; vir Eva Cukjati

DELO SLOVENSKE ČEBELARSKE AKADEMIJE

PREVZEM IZVEDBE PILOTNEGA PROJEKTA ČEBELARJENJE V BANGLADEŠU

Z vzpostavitvijo delovanja SČA, so na akademijo prešle aktivnosti povezane z izvedbo pilotnega projekta Čebelarjenje v Bangladešu. Projekt je bil zasnovan na podlagi povpraševanja po bogatem slovenskem znanju na področju čebelarjenja s strani največje nevladne organizacije BRAC, ki si prizadeva za razvoj in pomoč revnejšim državam.

Cilj projekta je razvoj čebelarstev, ki bodo pripomogla k izboljšanju kvalitete življenja revnim bangladeškim družinam, saj bodo s prodajo čebeljih pridelkov vplivali na družinski proračun. Prav tako je cilj projekta izboljšati in dvigniti na višji nivo celotno tehnologijo čebelarjenja v Bangladešu. Slovenska čebelarska akademija je projekt prevzela v fazi priprav na praktično izvedbo, ki bo potekala ob prisotnosti potujočega učitelja SČA, ki bo v



Slika 2: raziskovalno delo na Mengeškem polju

Bangladešu poučeval skupine izbranih kandidatov, kateri bodo kasneje svoje znanje širili na ostale zainteresirane bangladeške družine.

Strokovnjaki Kmetijskega inštituta Slovenije v sodelovanju s strokovnjaki Nacionalnega veterinarskega inštituta, UL VF in ČZS, so pripravili natančno opredeljen program izvedbe projekta vključno z nabavo osnovne čebelarske opreme ter čebeljimi družinami in plemenskimi maticami za nadaljnjo vzrejo. Program zajema terensko analizo področja kjer se bo projekt praktično izvajal in trenutnega stanja na področju čebelarjenja, analizo tveganja izvedbe projekta in zdravstvenega varstva čebel, analizo reje matic in čebeljih družin, marketinško analizo in natančno časovno opredelitev posameznih faz projekta.



Slika 3: *A. mellifera ligustica* - čebelarjenje v Bangladešu

IZDELAVA CELOSTNE PODOBE SČA

Z začetkom ustanovitve SČA se aktivno izvaja priprava celostne podobe SČA, ki zajema izdelavo logotipa SČA in spletne strani.



Slika 4: logotip SČA

Logotip SČA povezuje akademsko znanje na visoki ravni s simbolom akademskega klobuka, kranjsko sivko – ponos slovenskega čebelarjenja in lipov list kot simbol slovenskega naroda.

PROMOCIJA SČA

Promocija SČA se pričinja z vzpostavitvijo spletne strani in nadaljevala z aktivno udeležbo na Znanstvenem posvetu o čebelah in čebelarstvu na Poklukarjevih dnevih ter ekskurzijo na Zagrebški veterinarski fakulteti.

V septembru 2018 je bilo v sodelovanju s ČZS izvedeno srečanje z ustanoviteljico aktivnosti ACT for Bees, ki jo od leta 2016 izvaja Avstralija. Konec septembra 2018 bo SČA gostila predstavnike največje čebelarke družine v Teheranu, ki se bodo na sedežu SČA – KIS mudili po priporočilu slovenske veleposlanice v Iranu. SČA bo sodelovala na Jesenskem kmetijsko – obrtnem sejmu v Komendi. Pričele se bodo vse aktivnosti povezane z izvajanjem usposabljanj učiteljev prve generacije.

PРАВNA PODLAGA

Zakon o kmetijstvu (Uradni list RS, št. 45/08, 57/12, 90/12 – ZdZPUVHVVR, 26/14, 32/15, 27/17 in 22/18)

CILJI

Cilji Slovenske čebelarke akademije so naslednji:

1. izboljšanje znanja na področju čebelarstva v mednarodnem prostoru:
 - praktično poučevanje zainteresirane javnosti tako doma kot v tujini, povezovanje različnih strok v skupno poslanstvo širjenja kvalitetnega



Slika 5: raziskovalno izobraževalno delo

2. povečanje promocija Slovenije, slovenskega čebelarstva in turizma:
 - širjenje bogatega, več kot dvesto let starega znanja o čebelarjenju na slovenskem,
 - promocija Slovenije in njene raznolikosti narave v svetu.
 - promocija znanja slovenskih čebelarjev in avtohtone pasme čebele, kranjske sivke, v svetu.
3. izboljšanje zaposlitvene možnosti
 - izvedba izobraževalnih projektov za države v razvoju (potujoči učitelji)
4. izboljša ozaveščenost o pomenu čebel in opraševanja
 - širjenje ekološkega načina razmišljanja in življenjskega stila, spoštovanje živih bitij

POSŁANSTVO IN VIZIJA: življenje z naravo, inovativnost, kreativnost, brezmejnost

Osnovno vodilo SAČ je »Živeti naravno s čebelarke akademijo.« Izhajajoč iz narave, podaja SAČ na prvo mesto ekološke vrednote in pomen sobivanja z darovi in neskončnimi možnostmi, ki jih človeku tako za osebni, kot za poslovni razvoj ponuja narava. SAČ kot pionirska izobraževalna ustanova na področju neformalnega izobraževanja čebelarjenja ponuja inovativen pristop k podajanju znanja, ki je tematsko osredotočen (Problem based education). Ponuja kreativen pristop interaktivnega učenja in brezmejno širjenje znanja.

PROGRAM

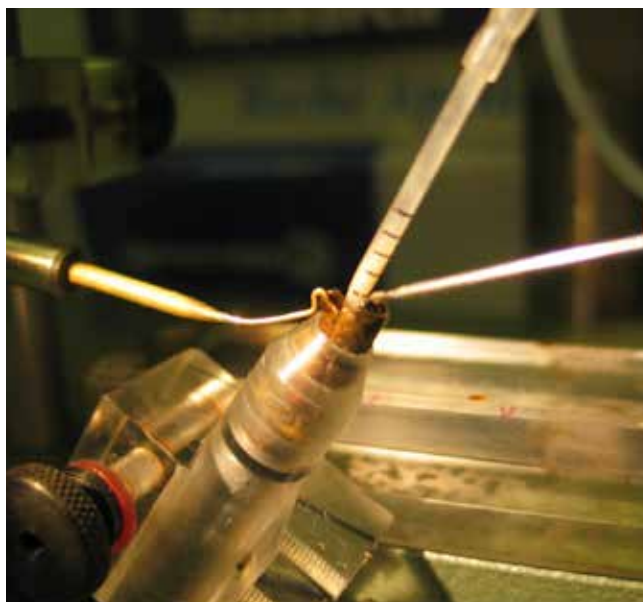
VSEBINSKI PROGRAM

Slovenska čebelarška akademija:

- organizira in izvaja neformalna izobraževanja na področju čebelarstva ter pri tem sodeluje z izobraževalnimi ustanovami in drugimi pravnimi in fizičnimi osebami, ki delujejo na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji in v tujini,
- skrbi za skupno promocijo izobraževalnih ustanov Republike Slovenije na področju čebelarstva in širjenje novih znanj v nacionalnem in mednarodnem okviru v povezavi z raziskovalnim in razvojnim delom na področju čebelarstva
- organizira in izvaja neformalna izobraževanja za države v razvoju
- organizira in izvaja izobraževanja za izvajalce izobraževanj

1. Informativni posvet Slovensko čebelarjenje od A do Ž

Slovenska čebelarška akademija nudi neformalna izobraževanja s področja čebelarjenja, ki je zasnovano kot inovativen, problemsko osredotočen program »Problem based education« (PBE). Izobraževanje se prične z informativnim posvetom Slovensko čebelarjenje od A do Ž,



Slika 6: umetno osemenjevanje matice, vir KIS

ki predstavlja predhodno stopnjo nadaljnjega tematskega izobraževanja PBE. Posvet je oblikovan kot teoretični del splošnega pregleda slovenskega čebelarjenja, ki ga kandidatom predstavijo strokovnjaki SČA. Del posveta je razširjena, k specifičnim temam usmerjena razprava, ki je podlaga za nadaljnjo izbiro ustreznega nivoja programa.

2. Čebelar začetnik (podrobni opis v katalogu)
3. Čebelarski mojster (podrobni opis v katalogu)
4. Čebelarski učitelj (podrobni opis v katalogu)

ZAKLJUČEK

Slovenska čebelarška akademija prinaša možnost povezovanja različnih strok v skupno poslanstvo širjenja kvalitetnega znanja o čebelah in čebelarjenju na slovenskem, sodelovanje z domačimi in tujimi strokovnjaki z različnih področij in praktična uporaba širše mreže znanja. S svojim delovanjem si bo SČA prizadevala k širjenju zavesti vseživljenjskega učenja, k povezovanju posameznih slovenskih

regij in pospeševanju razvoja turizma.

Poglavitni cilj je sooblikovati čebelarja s širokim, uporabnim znanjem, temeljnimi vrednotami življenja z naravo, globalnim pogledom na čebelarjenje v svetovnem merilu, ki bo s ponosom izkazoval pridobljeno znanje na Slovenski čebelarski akademiji.

PRIMER DOBRE PRAKSE: MLADA PREVZEMNICA ČEBELARSKE KMETIJE

Darja Šolar¹

V naši družini Šolar že več kot 35 let čebele predstavljajo osrednjo vlogo, zato z njimi ravnamo skrbno in preudarno, saj nam le tako lahko zagotavljajo kakovostne pridelke in inovativne storitve. Smo eno redkih čebelarstev v Sloveniji, ki ohranja lectarstvo. Spomnimo naj, da je bil nekoč lect dodana vrednost čebelarjev in cenjeno ter dragoceno ljubezensko darilo, ki so ga fantje podarjali dekletom. Danes pa se lect uporablja predvsem kot poslovna in spominska darila ali okras na novoletnih jelkah.

Od samega začetka čebelarjenja, v naši pekarni nastajajo iz kakovostnega medu, tudi dišeče medene dobrote različnih oblik. Prepričani smo, da se zavest o naravnih proizvodih dviguje in s tem tudi skrb za zdravje in zdrav način življenja, zato smo na domačem dvorišču, obstoječi čebeljak s 20 panjskimi enotami preuredili tako, da ne služi samo kot varen dom družinam kranjske čebele, ampak omogoča tudi posamezniku vzpostavitev dobrega psihofizičnega počutja kot priložnost za počitek, sprostitve in oddih od vsakodnevnih obremenitev in stresnih stanj v življenju.

Sem Darja Šolar, mlada prevzemnica čebelarske kmetije, poročena, mamica štirih deklic, po izobrazbi diplomirana ekonomistka, smer računovodstvo. Z družino že trinajsto leto živimo na Strmci v občini Laško, ob neposredni bližini čebelnjaka na domačem dvorišču z 20 AŽ panji, kjer se lahko dodobra opazuje čebele, ki so me s svojo delavnostjo, vztrajnostjo in mogočnostjo popolnoma osvojile. Vesela sem, da imam mentorja z več kot 35-letnimi izkušnjami v čebelarstvu. To je moj tast-čebelarski mojster in z njegovo pomočjo sem pridobljeno znanje iz knjig začela pred leti uporabljati v praksi. Svoje poznavanje čebelarjenja sem nadgradila tako, da sem junija 2016 pridobila certifikat o nacionalni poklicni kvalifikaciji - čebelarka. Leto prej sem obiskovala tečaj apiterapije, kjer sem si pridobila znanja na področju pridobivanja, shranjevanja in pravilne uporabe čebeljih pridelkov. Z zagovorom zaključne na-

loge na temo imunskega sistema sem uspešno zaključila izobraževanje in postala apiterapevtka. Ker so me čebele s svojo mogočnostjo tako osvojile, sem po dvanajstih letih dela v računovodstvu dala odpoved in se odločila, da se podam na novo življenjsko pot. Sedaj sem že drugo leto nosilka in usmerjevalka razvoja čebelarstva, lectarstva in apiturizma Šolar z več kot 35 letno tradicijo, kar mi je v veliko zadovoljstvo.

Avgusta 2016 sem uspešno oddala vlogo za dodelitev nepovratnih sredstev za sofinanciranje iz podukrepa 6.1 Pomoč za zagon dejavnosti za mlade kmete. Sama vloga je morala biti do predpisanega roka vsebinsko popolna z obveznim dodatkom, to je poslovnim načrtom za obdobje treh let. Iz poslovnega načrta sem obvezne mejnike že izpolnila in si zadala obvezne in neobvezne cilje, katere moram realizirati v treh letih od datuma prejete pozitivne odločbe. Izbrala sem predvsem obvezne cilje, ki prispevajo h gospodarskemu razvoju kmetije in prispevajo k doseganju horizontalnega cilja. Med neobvezne cilje v poslovnem načrtu sem si zadala ohranitev obsega proizvodov, trženje kmetijskih proizvodov, sodelovanje in dvig kakovosti proizvodov, ter vključitev v izobraževanje.

Veliko ciljev iz poslovnega načrta je že udejanjenih. In sicer, ob oddaji vloge je imela kmetija Šolar 62 čebeljih družin na treh različnih lokacijah; danes imamo preko 120 gospodarskih čebeljih družin na sedmin različnih lokacijah. Z nakupom novih panjev in čebeljih družin smo tako povečali pridelavo medu. Posodobili smo tudi prostor za točenje medu in polnjenje v kozarce, sam prostor pa je namenjen tudi izdelavi in pakiranju različnih medenih izdelkov. Ne manjkata tudi skladiščna prostora za različno embalažo, pokrove in nalepke. Najnovejšo naložbo predstavlja nakup hladilnice za hrambo čebeljih pridelkov in satja. Posodobili smo tudi sanitarni prostor. Ciljev in idej ne zmanjka. Obenem skušamo slediti tudi trendom na trgu in predvsem zadovoljstvu strank. Eden izmed teh večjih

¹ Čebelarstvo, lectarstvo in apiturizem Šolar, darja.solar@siol.net

zastavljenih in doseženih ciljev je, da smo v naših novih prostorih na domačem dvorišču odprli vrata prijetnega prostora, kjer bodo našim strankam še naprej dostopni medeni izdelki. V preteklem letu sem se udeležila tečaja angleškega jezika, predvsem zaradi lažjega sporazumevanja s tujimi gosti na našem čebelarskem turizmu. Letos pa sem se izobraževala za preskuševalca medu, kjer sem si razširila znanje o sortah medu.

Pri nas doma so gostje vedno dobrodošli, lahko se prepustijo vonju svežih medenjakov in degustaciji čebeljih pridelkov. Z veseljem bomo prikazali tudi izdelavo in krašenje lecta. V čebelnjaku na domačem dvorišču si gostje lahko izboljšajo svoje psihofizično počutje. Predstavljamo se na sejmih in raznih kulturnih prireditvah po Sloveniji. Tokrat sem se z veseljem in ponosom odzvala povabilu k sodelovanju s predstavitvijo na Poklukarjevih dnevih.

ZAZNAVA AROME MEDU MED MLADIMI POTROŠNIKI

Mojca KOROŠEC¹, Barbara SITAR², Jasna BERTONCELJ³

Izveček

Aroma živila pomembno vpliva na njegovo sprejemljivost. Pri zaznavi arome sodelujejo gustatorni in olfaktorni receptorji, za opis zaznanih lastnosti arome pa v senzorični analizi uporabljamo strokovne enoznačne izraze – opisnike. V predstavljeni raziskavi smo ugotavljali, kako aromo različnih vrst medu opisujejo oziroma zaznavajo mladi potrošniki. Senzorični panel je sestavljalo 90 študentov Biotehniške fakultete, ki so ocenjevali tipične vzorce sedmih vrst medu: akacijevega, lipovega, cvetličnega, kostanjevega, hojevega in gozdnega medu ter medu oljne ogrščice. V senzorični analizi medu smo uporabili dve metodi opisne analize in sicer metodo CATA (slo. Označi vse kar ustreza) in Flash profiling (slo. Hitro profiliranje). Stopnjo ugajanja vzorca so potrošniki ocenili z 9-točkovno hedonsko lestvico. Rezultate preskusov z opisnima metodama smo primerjali s strokovnimi opisi senzoričnih lastnosti obravnavanih vrst slovenskega medu. Manjše število opisnikov arome medu, ki so jih identificirali potrošniki pri opisovanju vzorcev z metodo Flash profiling, je bilo primerljivo z opisi v strokovni literaturi, med tem ko je bilo število označenih opisnikov, ki so jih v vzorcih medu zaznali potrošniki pri preskusu z metodo CATA, pričakovano večje. Rezultati ocenjevanja všečnosti vzorcev medu različnih vrst so pokazali, da je bil potrošnikom najbolj všeč akacijev med, najmanj všečen pa je bil med oljne ogrščice. Sklepamo lahko, da potrošniki zaznavajo razlike v aromah različnih vrst medu, vendar svoje zaznave pogosto opisujejo z drugimi izrazi.

Ključne besede: vrste medu, potrošniki, opisna senzorična analiza, všečnost

PERCEPTION OF HONEY AROMA AMONG YOUNG CONSUMERS

Abstract

The aroma of food significantly influences its acceptability. Gustatory and olfactory receptors are involved in the perception of the aroma, and in the sensory analysis, professional, unique terms - descriptors are used to describe the perceived aroma attributes. In the present study, we determined how young consumers describe or perceive, respectively, the aroma of different types of honey. The sensory panel consisted of 90 students of the Biotechnical Faculty, who evaluated typical samples of seven types of honey: acacia, linden, rape, multifloral, chestnut, fir and forest honey. In the sensory analysis of the honey, two methods of descriptive analysis were used, namely the CATA method (Check All That Apply) and Flash profiling. At the end, panellists assessed the liking of each sample by a 9-point hedonic scale. The results obtained with descriptive methods were compared with expert sensory profile of the seven honey types of Slovenian honey. A smaller number of honey aroma descriptors identified by consumers when using the Flash profiling method, was comparable to descriptions in the literature, while the number of checked descriptors in the CATA test was, as expected, higher. The results of hedonic scoring of the samples have shown that consumers were most fond of acacia, while rape honey was the least liked sample. We can conclude that consumers perceive differences in the aromas of different types of honey, but they often describe their perceptions with other terms as professionals

Key words: honey types, consumers, descriptive sensory analysis, liking

¹ Doc. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

² Univ. dipl. inž. živ. in preh. (UN), Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

³ Izr. prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, Ljubljana

UVOD

Botanična pestrost medu se odraža v njegovih fizikalno-kemijskih, senzoričnih in mikroskopskih lastnostih. Poimenovanje botaničnega izvora medu dovoljuje tudi zakonodaja v primeru, ko med izvira pretežno z ene botanične vrste in odraža za to vrsto značilne lastnosti (Pravilnik o medu, 2011). Potrošniki med cenijo kot tradicionalno sladilo in domače zdravilo, vendar pa nekatere vrste medu cenijo bolj kot druge. Poleg večjega zaupanja lokalno pridelanemu medu kot tujemu, se tudi raje odločajo za znane vrste medu (Pocol in Bolboaca, 2013; Stolzenbach in sod., 2013). Podobno kot velja za druge živilske izdelke, na sprejemljivost in všečnost medu pri potrošnikih pomembno vplivajo senzorične lastnosti, ki jih potrošnik zaznava z opazovanjem, vonjanjem in okušanjem.

Analiza senzoričnih lastnosti medu se uporablja tudi v procesu vrednotenja kakovosti tega čebeljega pridelka in ugotavljanju skladnosti z označbo njegovega botaničnega izvora. Za ta namen je potrebno dobro poznavanje metod senzoričnega vrednotenja in senzoričnih lastnosti medu. V evropskem prostoru so metode in terminologija na področju senzorične analize usklajene, kar je pomembno z vidika primerljivosti rezultatov in enakih standardov senzorične kakovosti (Persano Oddo in Piro, 2004; Piana in sod., 2004; Marcazzan in sod., 2018).

Senzorična analiza pa ni pomembna za proizvajalce le pri spremljanju kakovosti izdelka, primerjavi s konkurenčnimi ali v procesu modifikacije izdelka, marveč jim z ustreznimi metodami lahko poda tudi odgovor na to, zakaj imajo potrošniki določen izdelek raje kot podobnega konkurenčnega. Z metodami opisne analize prilagojenimi potrošnikom lahko ugotovimo, katere so ključne lastnosti, ki odločajo o všečnosti izdelka pri potrošniku (Ares in sod., 2014; Meyners in Castura, 2014), kar lahko uporabimo tudi pri trženjskih strategijah (Kortesniemi in sod., 2018; Pocol in Bolboaca, 2013). Rezultati take analize so zanesljivi in primerljivi z rezultati analitičnih testov s šolanim panelom preskuševalcev (Ares in sod., 2010).

Namen predstavljene raziskave je bil proučiti, kakšne asociacije sprožijo značilnosti vonja in arome posamezne vrste medu pri mlajših potrošnikih in kako so le-te primerljive s strokovno sprejetimi opisniki. Želeli smo preveriti še, katere vrste medu so v tej skupini potrošnikov bolj všečne.

MATERIAL IN METODE

Material

Za analizo smo uporabili značilne vzorce sedmih vrst slovenskega medu: akacijevega, lipovega, cvetličnega, kostonjevega, hojevega in gozdnega ter med oljne ogrščice.

Senzorično kakovost izbranih vzorcev medu je predhodno potrdil panel šolanih preskuševalcev medu. Vsak vzorec smo pripravili v več ponovitvah po ca 20-30 g in jih označili z naključnimi trimestnimi kodami. Uporabili smo obarvane plastične lončke s pokrovčki, saj smo želeli, da se preskuševalci čim bolj osredotočijo na vonj in aromo medu.

Senzorični panel

Senzorični panel je sestavljalo 90 mlajših potrošnikov, študentov Biotehniške fakultete. Povprečna starost preskuševalcev je bila $22,7 \pm 2,6$ let. V panelu je bilo 58 % žensk in 42 % moških.

Senzorične metode

Preskuševalci so pred pričetkom senzoričnih preskusov prejeli osnovne informacije o aromi v medu, kako jo zaznavamo in opisujemo. Na kratko smo jim predstavili namen preskusov in njihovo izvedbo ter jih opozorili, naj se osredotočijo predvsem na vonjalno okušalne zaznave. Z izbiro dveh metod opisne senzorične analize, ki sta primerni za senzorično analizo s potrošniki Flash profiling (slo. Hitro profiliranje) in CATA (slo. Označi vse, kar ustreza) smo zagotovili kvalitativno in kvantitativno merjenje odziva preskuševalcev na senzorične lastnosti vzorca posamezne vrste medu. V tretjem testu so preskuševalci označili všečnosti medu na 9-točkovni hedonski lestvici. Iz rezultatov smo izračunali osnovne opisne statistike. Ocenjevanja so potekala v standardnih pogojih za izvedbo senzorične analize (ISO 6658:2017).

- Metoda Flash profiling

Vsak preskuševalec je prejel tri naključno izbrane vzorce medu. Po prvem okušanju je moral določiti tri opisnike, po drugem okušanju pa je moral vzorce razvrstiti po intenzivnosti vsakega opisnika na nestrukturirani 100 mm lestvici (Delarue, 2014).

- Metoda CATA

Iz posodobljenega kolesa vonjev in arom medu Mednarodne komisije za med (Korošec in sod., 2014) smo sestavili seznam opisnikov in dodali še opisnike za intenzivnost sladkega, kislega in grenkega okusa ter hedonske opisnike, ki se pri tovrstni analizi s potrošniki lahko uporabljajo. Metoda je kvalitativna, saj z njo beležimo le zaznane opisnike, ne pa tudi njihovih intenzivnosti. Preskuševalci so posamezno ocenjevali vsakega od sedmih vzorcev tako, da so v seznamu 55 opisnikov (Slika 1) odključali vse tiste, ki so jih zaznali v vzorcu (Meyners in Castura, 2014).

- Hedonska lestvica



Za ugotavljanje stopnje všečnosti vsakega vzorca smo uporabili 9-točkovno opisno hedonsko lestvico, z razponom od »izredno ne ugaja« do »izredno ugaja« in sredinsko točko »niti ugaja niti ne ugaja« (ISO 4121:2003).

REZULTATI Z RAZPRAVO

Rezultati preskusa Flash profiling

Preskuševalci, mladi potrošniki so prejeli naključne tri vzorce medu in morali po prvem okušanju določiti tri opisnike arome. Vzorce so nato okušali ponovno in jih po

intenzivnosti vsakega od določenih opisnikov razvrstili na 100 mm lestvici. Na ta način smo za vsako vrsto medu ugotavljali, s katerimi opisniki potrošniki najpogosteje opisujejo njeno aromo in kako se ti opisi skladajo s strokovnimi opisi (Golob in sod., 2008).

Potrošniki so po lastni presoji za opis arome pri akacijevem medu določili 48 različnih opisnikov. Število opisnikov je pričakovano, saj potrošniki niso šolani in ne obvladujejo strokovnih terminov, marveč uporabljajo asociacije in lahko enako zaznavo opišejo z različnimi besedami (Delarue, 2014). Kot je prikazano v preglednici 1, je skoraj tretjina preskuševalcev med opisniki arome akacijevega medu na-

Priimek in ime: _____ Oznaka vzorca: _____

Ocenjevanje z metodo CATA ("Check all that apply") – "Označi vse, kar ustreza"

Odključajte, kakšen vonj, aromo in okus vzorca zaznate!

Senz. lastnost	Opis	Senz. lastnost	Opis	
VONJ in AROMA	cvetlični	VONJ in AROMA	po dimu	
	nežen cvetlični		po fenolu, trpkem	
	težek cvetlični		animalen	
	saden		po pokvarjenem, razpadajočem	
	po svežem sadju		po žarkem	
	po eksotičnem sadju		po baldrijanu, valerijanski kislini	
	po fermentiranem sadju		po beljakovinah	
	po vinu		po žveplu	
	topel, po sladkorju		nežen vonj	
	po mleku v prahu		intenziven vonj	
	po kandiranem		neprijeten vonj	
	po karamelu		prijeten vonj	
	po sladu		zelo prijeten vonj	
	po zažganem		nežna aroma	
	po suhem sadju		intenzivna aroma	
	aromatičen		neprijetna aroma	
	po začimbah		prijetna aroma	
	po smoli		zelo prijetna aroma	
	balzamičen		OKUS	nežno sladek
	po citrusih			srednje sladek
	po svežem rastlinju, zelenem			močno sladek
	po suhem rastlinju			nežno kisel
	po vlažnem, zatohlem			srednje kisel
	po lesu			močno kisel
	kemijski			nežno grenek
	po plastiki, topilih			srednje grenek
	oster, jedek			močno grenek
	po zdravilih			

Podpis preskuševalca: _____

Slika 1: Obrazec za senzorično ocenjevanje medu z metodo CATA (Označi vse, kar ustreza)

vedla cvetlično aromo, nato sladkost, ki je tudi značilnost te vrste medu (Golob in sod., 2008), in aromo po lipi. Pri razvrščanju na 100 mm lestvici so vzorec te vrste medu višje po intenzivnosti razvrstili še pri opisniku po vosku, po sveži travi, po lipovem cvetju. Opisnike po vosku, po satju, po sveži travi, po maslu in po jabolku navaja tudi literatura (Golob in sod., 2008; Persano Oddo in Piro, 2004).

Preglednica 1: Odstotek preskuševalcev (n = 90), ki so določili opisnik arome akacijevega medu.

Opisnik arome	% preskuševalcev	Opisnik arome	% preskuševalcev
cvetlična	29	lipov čaj, nežno	2
sladkost	16	po smreki	2
po lipi	10	gorski zrak	2
po karameli	9	po siru	2
smrekovi vršički, sirup	5	mandelj	2
po sveži travi	3	intenziven okus	2
po bezgu	3	suho seno	2

Za opis arome cvetličnega medu so potrošniki navedli 47 opisnikov. V preglednici 2 je vidno, da jih je največ (28 %) navedlo cvetlično aromo, več jih je navedlo tudi po sadju ter v enakem deležu po satju, rahlo sadna, osvežilna itd. Po intenzivnosti so ta vzorec medu razvrstili najvišje pri aromi po satju, po akaciji, močna cvetlična, po mentolu in rahlo sadna. Aroma cvetličnega medu je zelo raznovrstna, saj gre za mešanice nektarjev, zato tudi nima uniformnega senzoričnega profila (Golob in sod., 2008).

Preglednica 2: Odstotek preskuševalcev (n = 90), ki so določili opisnik arome za cvetlični med

Opisnik	% preskuševalcev	Opisnik	% preskuševalcev
cvetlična	28	propolis	7
po sadju	11	po suhem sadju	7
po satju	7	po akaciji	6
močna cvetlična	7	po mentolu	6
rahlo sadni	7	topel	6
osvežilno	7	po svežem sadju	2
po zatohlem, grenkem	7	intenziven okus	1

Za aromo medu oljne ogrščice so potrošniki skupno definirali 35 različnih opisnikov. Potrošniki so navedli, da ima med oljne ogrščice intenzivno aromo po sladkem, cvetličnem, po siru, po kavi, po vosku in po oksidaciji, med tem ko literatura navaja pri opisu arome te vrste medu opisnike po repici, zelju, kompotu in cvetju (Golob in sod., 2008; Persano Oddo in Piro, 2004). Največ preskuševalcev je pri tem vzorcu določilo opisnik sladkost (26 %), po svežem sadju (9 %) in po karameli (9 %), le po 4 % pa opisnike povezane z manj prijetnimi zaznavami, na primer oksidacija, po zatohlem, po zelju (slika 3).

Preglednica 3: Odstotek preskuševalcev (n = 90), ki so določili opisnik arome za med oljne ogrščice

Opisnik	% preskuševalcev	Opisnik	% preskuševalcev
sladkost	26	oksidacija	4
po svežem sadju	9	po zeliščih	4
po karameli	9	suho sadje	4
sladek cvetlični	4	po zatohlem	4
po siru	4	po zelju	4
		intenziven okus	4
kava	4	po čebuli	4
neznan vonj	4	maslo	4
vosek	4		

Potrošniki so za aromo lipovega medu določili 44 različnih opisnikov, kot najbolj intenzivno izraženo pa so vzorec razvrstili pri opisnikih po sadju, po travniku, po narcisah, po akaciji, oster vonj, po detergentu. Opisniki so v tem primeru podobni, kot jih navaja literatura (Golob in sod., 2008, Persano Oddo in Piro, 2004), s tem da so potrošniki dodali še opisnik po lipi, suhem sadju, živalih in po sirupu za kašelj.

Med tremi opisniki, ki jih je vsak preskuševalec moral navesti, se je največkrat pojavil opisnik cvetlična aroma (45 %), med tem ko je vse ostale, predstavljene v preglednici 4, navedlo 5 % ali manj preskuševalcev.

Preglednica 4: Odstotek preskuševalcev ($n = 90$), ki so določili opisnik arome za lipov med

Opisnik	% preskuševalcev	Opisnik	% preskuševalcev
cvetlična	45	po živalih	3
po lipi	5	sirup za kašelj	3
smrekovi vršički, sirup	5	po zdravilih	3
po lesu	5	intenziven okus	3
rahlo sadni	3	suho sadje	3
cvetni prah, travnik	3	po zeliščih	3
po narcisah	3	po sladkorni peni	3

Za opis arome kostanjevega medu so potrošniki uporabili skupno 43 različnih opisnikov. Intenzivno so zaznavali aromo po zatohlem in grenkem, oster vonj in aromo po kostanju, kar so pokazali z razvrstitvijo vzorca na 100 mm lestvici in je tudi skladno s strokovnim opisom te vrste medu (Golob in sod., 2008; Persano Oddo in Piro, 2004). Najpogosteje so določili opisnik po kostanju (17 %), po karamelu, po gozdu in po smrekovih vršičkih, kot je predstavljeno v preglednici 5. Dejstvo, da je kostanjev med v Sloveniji razširjen in dobro poznan, je lahko razlog za navedbo teh opisnikov.

Preglednica 5: Odstotek preskuševalcev ($n = 90$), ki so določili opisnik arome za kostanjev med

Opisnik	% preskuševalcev	Opisnik	% preskuševalcev
po kostanju	17	sirup proti kašlju	2
po karameli	13	po satju	2
po gozdu	11	hruška tepka	2
smrekovi vršički, sirup	11	po zelenjavi	2
po smoli	6	oster vonj	2
po svežem	4	intenziven okus	2
po citrusih, osvežilno	4	po drevju, lubju	2
gozd, smrekove iglice	4	ledeni čaj breskev	2
mandelj	2	po vlagi	2
po zelenju	2	po smreki	2
po zatohlem, grenkem	2	po oreščkih	2

Največje število opisnikov, to je 49, so preskuševalci uporabili pri opisu hojevega medu. Temu lahko botruje dejstvo, da jim je ta vrsta manj poznana in so imeli pri zaznavah zelo različne asociacije (Delarue, 2014).

Preglednica 6: Odstotek preskuševalcev ($n = 90$), ki so določili opisnik arome za hojev med

Opisnik	% preskuševalcev	Opisnik	% preskuševalcev
po karameli	19	cvetni prah	3
po gozdu	10	po smoli	3
sladkost	6	po satju	3
gozd, smrekove iglice	6	intenziven okus	3
po zatohlem	6	vosek	3
žametno	3	kava	3
topel	3	neznan vonj	3
vitaminski sirup	3	grenkost	3
po drevju, lubju	3	hruška tepka	3
po svežem	3	intenziven vonj	3

Pri razvrščanju je opaziti, da so intenzivneje zaznavali vzorec žametno in toplo aromo, aromo po vitaminskem sirupu, po drevju, po svežem in po cvetnem prahu, saj so vzorec hojevega medu razvrstili višje na lestvici. Golob in sod. (2008) kot najbolj značilno aromo te vrste medu navajajo nežno aromo po mleku v prahu, karamelu, po smoli, po lesu iglavcev in po dimu. Ti opisniki so bili tudi v naboru, ki so ga definirali potrošniki, v odstotkih, kot so predstavljeni v preglednici 6.

Tudi število opisnikov, ki so jih potrošniki navedli pri gozdnem medu je veliko, 50. Opisniki, ki so jih v tem vzorcu intenzivneje zaznavali so bili po zeleni travi, po suhih slivah, po mentolu in po zemlji. Najpogostejši opisnik je bil sladkost (19 %), kjer pa vzorec zaradi primerjave z vzorci nektarnega izvora ni bil razvrščen najvišje. 13 % potrošnikov je navedlo opisnik po svežem, ki bi lahko bil opisnik za enako zaznavo kot po zeleni travi, med tem ko je opisnik po lesu navedlo 10 % sodelujočih. V preglednici 7 so predstavljeni še ostali, ki so jih navedli v manjših odstotkih. Med pogostejšimi so tudi tipični opisniki gozdnega medu (Golob in sod., 2008; Persano Oddo in Piro, 2004).

Preglednica 7: Odstotek preskuševalcev ($n = 90$), ki so določili opisnik arome za gozdni med

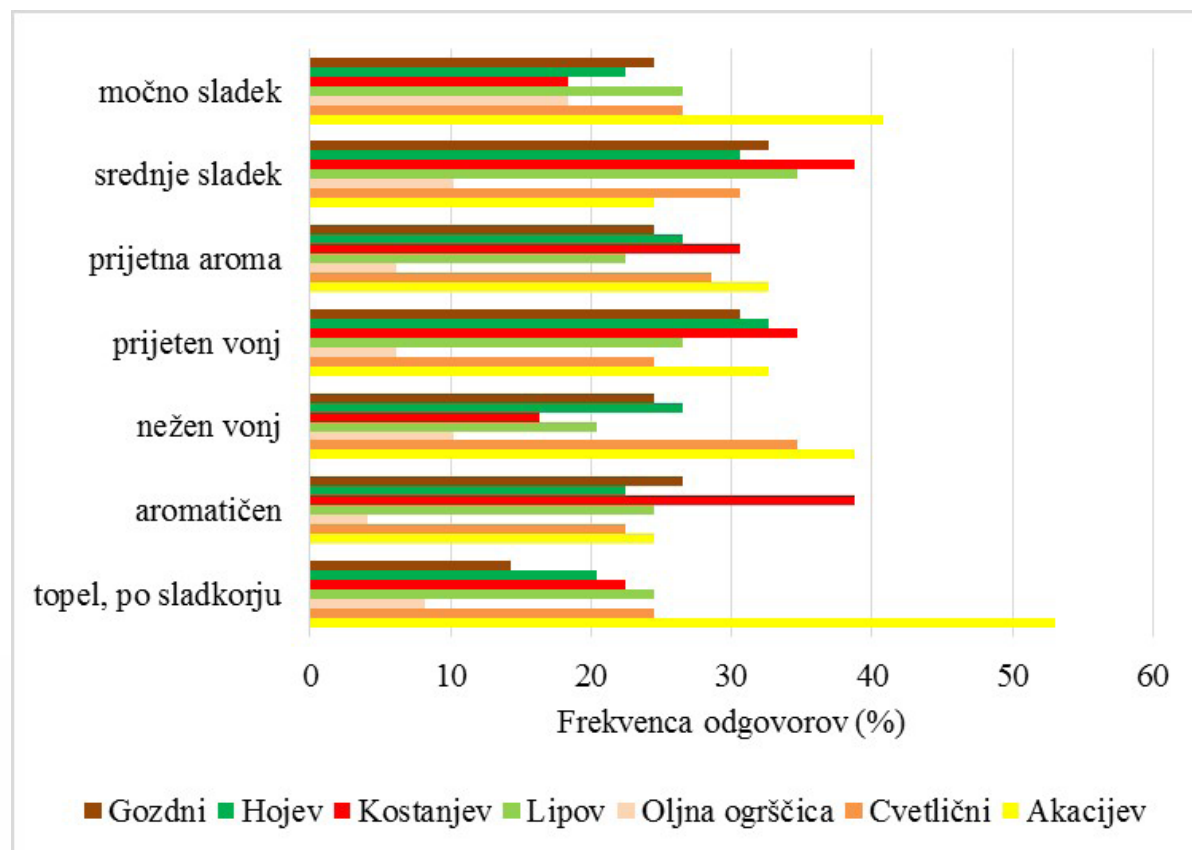
Opisnik	% preskuševalcev	Opisnik	% preskuševalcev
sladkost	19	po citronki	2
po svežem	13	po postanem	2
po lesu	10	po drevju	2
po kislem	8	po bezgu	2
po smoli	6	po oreščkih	2
po karameli	4	po sveži travi	2
gozd, smrekove iglice	4	po orehu	2
po zeleni travi	2	močna cvetlična	2
po suhih sli-vah	2	lipov čaj, nežno	2
po mentolu	2	po sladku	2
po zemlji	2	po vlagi	2
po sladkorni peni	2	po smreki	2

Rezultati preskusa z metodo »CATA«

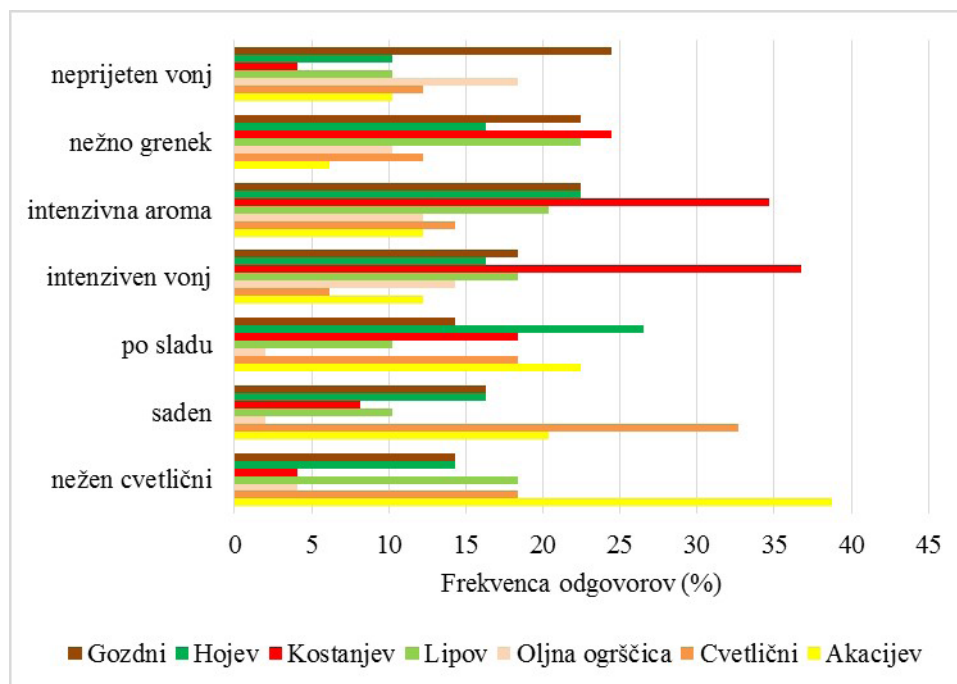
Preskuševalci so za ocenjevanje vsakega od sedmih vzorcev medu prejeli seznam opisnikov, ki smo ga sestavili

na osnovi harmoniziranega seznama skupin in podskupin vonjev in arom medu (Marcazzan in sod., 2018; Korošec in sod., 2014), v katerega smo vključili še hedonske opisnike ocenjevanih lastnosti. Izračunali smo frekvence posameznega opisnika v vsakem od sedmih vrst medu, ki predstavljajo njegov senzorični profil vonja in arome, kot so ga zaznali potrošniki.

Opisnik, ki ga je zaznalo večje število potrošnikov, je v vzorcu intenzivneje izražen oziroma ga karakterizira (Ares in sod., 2014; Kortensniemi in sod., 2018). Na sliki 2 so prikazani opisniki, ki jih je v vsaj treh vzorcih oziroma vrstah medu zaznala vsaj četrtina preskuševalcev. Slika prikazuje frekvenco pojavljanja v posameznem vzorcu. Všečne lastnosti, kot sta prijeten vonj in aroma, je najmanjši odstotek potrošnikov označil pri medu oljne ogrščice (v obeh primerih 6 %). Obratno, jih je 35 % označilo, da ima kostonjev med prijeten vonj in 31 %, da ima prijetno aromo. Tudi za akacijev med so označili, da ima prijetno aromo (33 %), dobro so v njem zaznali tudi toplo aromo po sladkorju (53 %) in ga med vsem ocenjevanimi vzorci najbolj zaznali kot močno sladkega (41 %). Razlike v pogostosti pojavljanja opisnika med ocenjevanimi sedmimi vzorci so statistično značilne (Hi-kvadrat; $p < 0,05$).



Slika 2: Frekvence opisnikov, ki jih je v vsaj treh vzorcih označila vsaj četrtina preskuševalcev.



Slika 3: Frekvence opisnikov, ki jih je v enem ali več vzorcih označila vsaj četrtina preskuševalcev.

Slika 3 prikazuje frekvence opisnikov, ki so jih potrošniki intenzivneje zaznavali le v določenih vrstah medu. Nežen cvetlični vonj so v daleč največji meri označili pri akacijevem medu (39 %), med tem ko jih je pri kostanjevem medu 37 % zaznalo intenziven vonj in 35 % intenzivno aromo. Pričakovali smo, da vonj medu oljne ogrščice potrošnikom ne bo všečen, da je neprijeten, jih je označilo 18 %, vendar pa je tako menilo tudi 24 % za gozdni med. Rezultat za gozdni med kažejo na polarizacijo potrošnikov, saj jih po drugi strani 31 % navedlo, da ima prijeten vonj (slika 2).

Pri oljni ogrščici so označili še, da ima vonj in aromo po fermentiranem sadju, smoli, po vlažnem in zatohlem. Zadnji opisnik se navaja tudi v strokovnem opisu te vrste medu (Golob in sod., 2008). Kot so pokazali rezultati opisne analize z metodo CATA, je imel kostanjev med najbolj intenziven vonj in aromo (slika 3), kar je pričakovano glede na izbrane vrste medu.

Največ različnih opisnikov, to je 51, so potrošniki označili pri hojevem medu. Tudi tu se kaže polarizacija, saj je dobršen del zaznaval prijetne lastnosti, kot so aroma po sladju, karamelu, topli aroma, med tem ko jih je okrog 10 % označilo tudi aromo po dimu, po zažganem in da je aroma neprijetna. Opisniki po sladju, karamelu, zažganem sodijo v isto skupino, t.i. toplih vonjev in arom, pri čemer pa gre za stopnjevanje intenzivnosti note po pečenem. Ker potrošniki niso šolani za uporabo opisnikov, marveč jim predlagani opisniki služijo kot pomoč pri ubeseditvi zaznav, je pričakovano, da so pri njihovi uporabi manj enoglasni kot šolan panel (Korošec in sod., 2014; Ares in sod., 2010).

Rezultati hedonskega ocenjevanja

Preskuševalci so všečnost vsakega vzorca medu označili na 9-točkovni hedonski lestvici. Besedne opisne stopenji všečnosti smo pri obdelavi podatkov pretvorili v številke, kjer je 1 pomenilo »izredno ne ugaja« in 9 »izredno ugaja«. Izračunali smo opisne statistike in preverili, če so med vzorci v všečnosti značilne razlike (ANOVA, $p \leq 0,05$). Rezultati so predstavljeni v preglednici 8. Najmanj všečen je bil med oljne ogrščice, ki je dobil značilno najnižjo hedonsko oceno. Najbolj všečen je bil akacijev med. Med vzorci cvetličnega, hojevega, lipovega, kostanjevega in gozdnega medu v všečnosti ni bilo razlik.

Preglednica 8: Opisne statistike hedonskega ocenjevanja na 9-točkovni hedonski lestvici

Vrsta medu	Povprečje	Mediana	Min	Max
AKACIJEV	7,05 ^c	8,0	3,5	9,0
CVETLIČNI	6,55 ^b	7,0	3,5	8,5
HOJEV	6,72 ^b	6,5	1,5	9,0
LIPOV	5,94 ^b	6,0	2,0	8,5
KOSTANJEV	6,19 ^b	6,0	2,5	8,5
GOZDNI	5,90 ^b	6,0	1,5	8,5
OLJNA OGRŠČICA	3,78 ^a	5,0	1,5	8

a, b, c Vrednosti označene z različno črko se značilno razlikujejo (ANOVA, $p \leq 0,05$)

ZAKLJUČKI

Mladi potrošniki uporabljajo za opisovanje zaznav vonja in arome medu različne opisnike. Število opisnikov je bilo veliko predvsem pri opisovanju vzorcev sedmih vrst medu z metodo Flash profile, kjer so jih morali definirati sami. Z veliko hedonskimi izrazi so opisali predvsem aromo medu oljne ogrščice. Pri metodi CATA jih s seznamom opisnikov že nekoliko usmerimo oziroma jim pomagamo pri opisovanju zaznav. Opisniki, ki so jih v večjih deležih označili pri posameznih vzorcih, se skladajo s strokovnimi opisi njihovih vrst, predvsem pri akacijevem, cvetličnem, hojevem, kostanjevem in gozdnem medu. Najbolj všečen je bil akacijev med, ki ga odlikuje sladkost in nežne karakteristike vonja in arome. Podobno poročajo Kor-

tesniemi in sod. (2018), ki so ugotovili še, da na všečnost vpliva tudi poznavanje medu. Podobne zaključke kažejo rezultati naše raziskave. Čeprav so imeli nekateri vzorci intenzivnejši vonj in aromo, na všečnost pri mladih potrošnikih ni bistveno vplivala niti grenkoba kostanjevega medu. Potrdili pa smo, da manj znan med z intenzivnejšimi senzoričnimi lastnostmi, kot je v našem primeru med oljne ogrščice, potrošniki slabše sprejemajo. Ugotovitve so pomembna informacija o potrošnikovih zaznavah vonja in arome medu, njihovem vplivu na všečnost, ki lahko koristijo pridelovalcem pri komuniciranju s potrošniki in oblikovanju ustreznih predstavitev medu.

LITERATURA

- Ares G., Antúnez L., Giménez A., Roigard C., Pineau B., Hunter D., Jaeger C. 2014. Further investigations into the investigations into the reproducibility of check-all-that-apply (CATA) questions for sensory product characterization elicited by consumers. *Food Quality and Preference*, 36: 111-121.
- Ares G., Barreiro C., Deliza R., Giménez A., Gámbaro A. 2010. Application of a check-all-that-apply question to the development of chocolate milk desserts. *Journal of Sensory Studies*, 25: 67-86.
- Delarue J. 2014. Flash Profile. V: Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling. Varela P., Ares G. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 140-162.
- Golob T., Jamnik M., Bertoneclj J., Kropf U., Kandolf A., Božič J., Zdešar P., Meglič M., Goljat A. 2008. Med: značilnosti slovenskega medu. Brdo pri Lukovici, Čebelarstva zveza Slovenije: 84 str.
- ISO 4121:2003. Sensory analysis - Guidelines for the use of quantitative response scales- 2003: 9 str.
- ISO 6658:2017. Sensory analysis - Methodology - General guidance. 2017: 26 str.
- Korošec M., Golob T., Bertoneclj J. 2014. Sodobna senzorična analiza medu = Contemporary sensory analysis of honey. V: 1.znanstveno posvetovanje o čebelah in čebelarstvu, Ljubljana, 13. februar 2014. Gregorc A. (ur.). V spomin dr. Janezu Poklukarju: zbornik prispevkov. Ljubljana, Slovensko akademsko čebelarstvo društvo, Kmetijski inštitut Slovenije: 80-85.
- Kortensniemi M., Rosenvald S., Laaksonen O., Vanag A., Ollikka T., Vene K., Yanga B. 2018. Sensory and chemical profiles of Finnish honeys of different botanical origins and consumer preferences. *Food Chemistry*, 246: 351-359
- Marcazzan G. L., Mucignat-Caretta C., Marchese C. M., Piana M. L. 2018 A review of methods for honey sensory analysis, *Journal of Apicultural Research*, 57(1): 75-87
- Meyners, M., Castura, J. C. 2014. Check-All-That-Apply Questions. V: Novel techniques in sensory characterization and consumer profiling. Varela P., Ares G. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 271-305.
- Persano Oddo L., Piro R. 2004. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 35: 38-81.
- Piana M.L., Persano Oddo L., Bentabol A., Bruneau E., Bogdanov S., Guyot Declerck C. 2004. Sensory analysis applied to honey: state of the art. *Apidologie*, 35: 26-37.
- Pocoli C. B., Bolboaca S. D. 2013. Perceptions and trends related to the consumption of honey: A case study of North-West Romania. *International Journal of Consumer Studies*, 37: 642-649
- Pravilnik o medu. 2011. Uradni list Republike Slovenije, 21,4: 345-490
- Stolzenbach S., Bredie W. L. P., Byrne D. V. 2013. Consumer concepts in new product development of local foods: Traditional versus novel honeys. *Food Research International*, 52(1): 144-152

KAKŠNE SO MOŽNOSTI PRIDOBIVANJA MATIČNEGA MLEČKA IN HKRATNEGA VZREJANJA MATIC Z UPORABO ISTEGA VZREJNEGA GRADIVA

Špela ZARNIK¹, Lucija ŽVOKELJ²

Izvleček

Matični mleček, nepogrešljiva snov čebelarje družine in edino hranilo matice, je eden najbolj cenjenih pridelkov, ki se vedno bolj uveljavlja v današnji družbi. Matični mleček je izloček hipofaringealnih (goltnih) in mandibularnih (čeljstnih) žlez čebel dojlj, s katerim hranijo matične ličinke in odrasle matice. Ima številne zdravilne učinke na človeško telo, uporablja se v farmaciji, prehranski industriji ter kot sestavina kozmetičnih in negovalnih sredstev. Ker matični mleček postaja tržno vedno zanimivejši, se marsikdo vpraša, kako ga čebelar pridobi. Pridobivanju matičnega mlečka smo hoteli dodati vrednost s hkratno vzrejo matic ob uporabi istega vzrejnega gradiva. Za mnoge je namreč etično nesprejemljivo, da se za pridobivanje matičnega mlečka zavržejo matične ličinke. Raziskava je potekala v okviru diplomske naloge, katere cilj je bil preveriti primerljivost matic, vzrejenih na klasičen način, in matic, vzrejenih z vmesno prekinitvijo – odvzemom matičnega mlečka. Pri obeh načinih vzreje smo spremljali sprejem ličink, pokritje in dolžino matičnikov, čas razvoja ter maso matic. Iz rezultatov je razvidno, da je način vzreje najbolj vplival na dolžino matičnikov. Na maso matic ni bilo statistično značilnega vpliva. Povprečno so bili matičniki pri obeh načinih vzreje pokriti 8. dan, matice pa izležene 16. dan. S poskusom smo ugotovili, da se hkrati lahko pridobi matični mleček in vzredi matice, katerih masa se ne razlikuje od mase matic, vzrejenih na klasičen način. Za zanesljivejše ugotovitve bi bila potrebna obsežnejša raziskava, v kateri bi se spremljalo večje število parametrov lastnosti matic.

Ključne besede: *Apis mellifera carnica*, matični mleček, vzreja matic, presajanje ličink

WHAT ARE THE POSSIBILITIES OF SIMULTANEOUS ROYAL JELLY PRODUCTION AND QUEEN REARING FROM THE SAME GRAFTING MATERIAL

Abstract

Royal jelly is the only food consumed by queen bees and one of the most appreciated bees product that is becoming more and more established in our society. It is a secretion from the hypopharyngeal and mandibular glands of worker bees. Royal jelly has many therapeutic effects on the human body, it is used in pharmacy, the nutritional industry and as an ingredient for cosmetic and nursing products. Since royal jelly is becoming increasingly popular on the market this causes many questions to be asked about how a beekeeper gets it. We wanted to add value to the acquiring of royal jelly by queen rearing from the same grafting material at the same time. Many find it ethically unacceptable that queen larvae is discarded in the production of royal jelly. The objective of the diploma thesis was to verify the comparability of queens reared on classical manner and with intermediate termination – the dispossession of royal jelly. In both methods of queen rearing we monitored the acceptance of grafted larvae, the time of queen cell capping, the length of the queen cell, queen development time and the weight of newly emerged queens. From the results it is evident that the rearing method had the greatest influence on the length of the queen cells. There was no statistically significant influence of the rearing method on the weight of newly emerged queens. On average, in both ways of rearing the queen cells were capped on the eighth day of development and the queen developmental time was sixteen days. The experiment indicated that it is possible to obtain royal jelly and rear queens with the same grafting material at the same time. For more reliable findings, a more extensive survey would be needed which would monitor large number of parameters that describe the queen's characteristics.

Key words: *Apis mellifera carnica*, royal jelly, queen rearing, grafting

¹ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

² Dr. vet. med., Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani

UVOD

Socialna žuželka, medonosna ali domača čebela (*Apis mellifera*), izvorno razširjena v Afriki in Evraziji, je vrsta čebele, ki jo je človek udomačil za svoje potrebe in jo zanesel po vsem svetu. Med zadnjo ledeno dobo se je življenjski prostor čebele v Evropi razdrobil na geografske podvrste, ki se razlikujejo po več značilnostih. Podvrsto na Balkanu, imenovano kranjska čebela (*Apis mellifera carnica*), tradicionalno povezujemo z zgodovinsko slovensko pokrajino Kranjsko. Kasneje je z Apeninskega polotoka v ta prostor prišla tudi italijanska čebela (*Apis mellifera ligustica*), ki s kranjsko tvori križance. Kranjska sivka je edina avtohtona zaščitena čebelja vrsta v Evropski uniji in druga najbolj razširjena podvrsta ali rasa čebel na svetu, zato je promet z drugimi rasami čebel v Sloveniji prepovedan (Kozmus et. al., 2011).

Medonosne čebele so pomembne zaradi oprave, proizvodnje medu, voska, cvetnega prahu, propolisa, čebeljega strupa in matičnega mlečka. Prav matični mleček (MM) je eden najbolj cenjenih proizvodov čebelje družine, saj so mu dokazali številne zdravilne učinke. Med drugim deluje protivnetno, antibakterijsko in antioksidativno. MM je izloček hipofaringealnih (goltnih) in mandibularnih (čeljustnih) žlez čebel dojlj. Čebele dojlje, stare od 6 do 12 dni, z njim hranijo matične ličinke in odrasle matice. Matica se vse življenje prehranjuje izključno z MM. Iz oplojenega jajčeca se lahko razvije čebela delavka ali matica in prav oskrba z MM določa smer razvoja. To dejstvo se uporablja pri umetni vzreji matic in pridobivanju MM. MM uporabljajo v farmaciji in prehranski industriji ter postaja tržno vedno zanimivejši, saj je tudi sestavina kozmetičnih in negovalnih izdelkov. Rezultat tega je uvoz MM v vse države, ki nimajo zadostne lastne proizvodnje. Največ na svetu ga pridelajo na Kitajskem, približno 60 % svetovne proizvodnje, to je okrog 2000 ton. Za Slovenijo velja, da je ponudba MM manjša od povpraševanja, zato je njegovo pridobivanje za čebelarje dobra možnost za dodaten zaslužek. Za vsakih 150–300 mg MM je treba žrtvovati ličinko, čebelar pa se v oskrbo ponudi novo vzrejno letvico z en dan starim vzrejnim gradivom (Zdešar, 2008, Poklukar, 1998). Ko je potrošnik seznanjen s postopkom pridobivanja MM, se nemalokrat zgodi, da se mu zdi postopek sporen, posebno v današnji družbi, ki vedno bolj prisega na okolju, živalim in rastlinam prijazne tehnologije. Četudi bi poskušali ličinko obdržati za nadaljnjo vzrejo, se postavlja vprašanje, ali je ličinka zadosti preskrbljena s hrano in se po lastnostih ne bi razlikovala od nemoteno vzrejenih matic. Tudi s tem namenom bom preverila metodo, s katero se ohrani ličinko živo ter se iz nje vzredi matico in hkrati pridobi MM.

Cilj raziskave je bil preveriti, ali so matice, ki jim po dveh

dneh razvoja odvzamemo MM in jih vrnemo v oskrbo primerni čebelji družini, primerljive z maticami, ki so vzrejene na običajen način, brez odvzema MM. Spremljali smo sprejetost ličink, dolžino matičnikov in maso matic ter na osnovi rezultatov razpravljali o možnostih pridobivanja MM brez žrtvovanja matičnih ličink.

Osnovne hipoteze:

- H1: Čebele bodo enako sprejele ličinke matic, ki smo jim po dveh dneh odvzeli MM, in ličinke matic, ki so bile vzrejene nemoteno.
- H2: Velikost matičnika matic, ki smo jim po dveh dneh odvzeli MM in jih ponovno presajali, bo značilno manjši od matic, vzrejenih nemoteno.
- H3: Masa matic in velikost matičnika sta v pozitivni korelaciji.
- H4: Največ pokritih matičnikov bo osmi dan, matičniki matic, vzrejenih z vmesno prekinitvijo, bodo pokriti hitreje.
- H5: Masa matic s prekinjeno vzrejo in vmesnim odvzecom matičnega mlečka je značilno manjša od mase matic, ki jih vzrejamo nemoteno.

Velik izziv raziskave je bil, kako bodo čebele delavke sprejele ličinke, ki smo jim po dveh dneh po presajanju odvzeli MM in jih nato vrnili v matični lonček ter ponovno vstavili čebelji družini. Starejše kot so matične ličinke, težje je z njimi manipulirati, ne da bi jih poškodovali. Če je ličinka preveč poškodovana, je čebele ne sprejmejo in tako je postopek enak običajnemu. Zunanje okoliščine (vremenski in pašni pogoji) močno vplivajo na oskrbo in pridobivanje MM, zato sta bila obseg ter trajanje poskusa odvisna tudi od pogojev v naravi.

MATERIALI IN METODE DELA

Poskus smo izvedli v čebelnjaku Biotehniškega centra Naklo v obdobju treh mesecev, in sicer od 1. 6. 2015 do 28. 8. 2015. Za pridobivanje MM in hkratno vzrejo matic smo uporabili šest močnih čebeljih družin v desetsatnih AŽ-panjih.

Na podlagi preliminarnega poskusa smo osvojili tehniko presajanja ličink iz zalege na vzrejno letvico. MM smo pridobivali 3 dni po presajanju ličink. Po odvzemu MM smo ličinke obdržali žive in jih vrnili čebelarjem, da bi iz njih vzredile matice. Opazovali smo sprejem tako manipuliranih ličink s strani delavk in njihov nadaljnji razvoj v matice. S preliminarnim poskusom smo ugotovili, da je možno zelo uspešno presajati starejše ličinke in da jih čebele sprejmejo. Pri tem smo morali biti posebno pazljivi, saj je bil trenutek prenosa starejše ličinke najpomembnejši

za nadaljnji sprejem le-te. Ugotovili smo tudi, da so bili matičniki in masa matic na ta način vzrejenih matic manjši od matic, ki so bile vzrejene brez odvzema MM. Na podlagi teh podatkov smo osnovali poskus za raziskovalno delo. Predvidevali smo, da imajo čebele dovolj, če ličinkam dovolj zgodaj odvzamemo del MM, dovolj časa za oskrbo ličink z MM, zato to ne bi vplivalo na razvoj matic.

Priprava družine za pridobivanje matičnega mlečka

Pri pridobivanju MM je zelo pomembna priprava čebelje družine. Začetni postopki so podobni kot pri vzreji matic. Iz čebelje družine z nadpovprečnimi lastnostmi, imenovane matičar, smo odvzeli sat z zalego (vzrejno gradivo) in ga pregledali. Za presajanje v matične lončke na vzrejni letvici smo potrebovali ličinke, stare 12–24 ur. Matične lončke smo popolnoma očistili, in iz izbranega vzrejnega gradiva presajali izbrane čebelje ličinke. V sredino medišča smo postavili dve mladi zalegi iz plodišča, ker je treba imeti dovolj mladih čebel do jilj, ki bodo hranile vstavljeno vzrejno gradivo. Iz medišča pa smo v plodišče vstavili sate s polegajočo zalego. Za oskrbo matičnih ličink s strani delavk je potrebno brezmatično počutje v medišču. Tako smo pripravili vseh pet čebeljih družin, imenovanih redniki. Nato smo v medišče med dva sata z odprto zalego vstavili vzrejni okvir z vzrejnimi letvicami, ki so imele vsaka po dvanajst plastičnih matičnih lončkov premera 9 mm in višine 5 mm. Te smo za navajanje čebel na vstavljene vzrejne letvice pokapali s sladkorno raztopino in jih vstavili tako, da smo vzrejno letvico pritrdili na vzrejni okvir in tako ponovili postopek dvakrat za vseh pet čebeljih družin. Potem smo začeli z nekajkratnim presajanjem ličink iz izbranega matičarja na vzrejno letvico, in sicer toliko časa, da so čebele vzrejno gradivo začele sprejemati. Po nekaj sprejetih presajanja 12–24 ur starih ličink smo poizkusili še s sprejetjem ličink, katerim sem po 48 urah odvzela MM, ne da bi jih zavrgla. Tudi sprejetje manipuliranih ličink je bilo vsakič uspešnejše.

Presajanje ličink, odvzem matičnega mlečka in določanje sprejetosti ličink

Ko so družine konstantno sprejemale vzrejno gradivo, smo začeli s presajanjem ličink za poskus. Vzrejno gradivo smo pridobivali zgolj iz ene družine, ki smo jo izbrali za matičarja. Njihovo starost smo določili tako, da smo en dan pred poskusom vzeli sat z zalego in jo pregledali. Ker so jajčeca v treh stadijih – prvi dan pokončnem, drugi dan poševnem, tretji dan ležečem – smo sat z jajčeci v ležečem položaju označili. Tako sem vedela, da bo naslednji dan točno prvi dan stadija ličinke. Pozorni smo bili le še na ure; ličinke smo presajali v starosti 12–24 ur. Iz sata izbrane zalege smo ometli čebele in ga odložili na pripravljeno

mesto za presajanje. Ker zalega potrebuje vlago in bi se zunaj izsušila, smo imeli na mizi vlažno brisačo, s katero smo jo pokrili, medtem ko smo čistili matične lončke. Nato smo z leseno paličico za presajanje ličink previdno prijeli ličinko s hrbtne strani, jo prenesli ter položili v prej očiščen matični lonček.

Po dveh dneh smo iz vseh petih čebeljih družin, vzpostavljenih za pridobivanje MM, odvzeli letvice z matičnimi lončki. Število sprejetih ličink je bilo vidno že na prvi pogled. Tiste, ki niso bile uspešno prenesene, so čebele »popile« in ostal je prazen matični lonček. Ostale so hranile z MM, tako da je ličinka plavala v njem. Naša metoda odvzema MM je bila nekoliko drugačna od že obstoječe in dobro znane, pri kateri ličinko zavrzemo in pobremo MM. Polovico ličink na vzrejni letvici, starih 48 ur, smo previdno, ne da bi jih poškodovali, z leseno paličico dvignili s hrbtne strani, hkrati z drugo roko in leseno paličico pobrali MM ter ličinke vrnili v matični lonček, ki je ostal navlažen. MM smo shranili v 30-mililitrskem temnem kozarčku, ki smo ga takoj položili v prenosno hladilno torbo. Predel na letvici, kjer smo ličinkam na takšen način odvzeli MM in jih položili nazaj, smo označili z risalnim žbljičkom. Ostali polovici na letvici smo pustili nemoten razvoj. Opazovali smo sprejem tako manipuliranih ličink s strani delavk in njihov nadaljnji razvoj v matice. Vseh pet panjev smo označili s številkami od ena do šest. Za vsak panj posebej smo natančno beležili sprejetost ličink v številu matičnih lončkov na posamezni letvici.

Določanje časa faze odkritega matičnika, velikosti matičnikov in celotnega časa razvoja matic

Na osem ur smo spremljali čas razvoja matic, in sicer njihovo pokritje 7., 8. in 9. dan. Beležili smo si čas pokritja vsakega posameznega matičnika v posameznem panju. Štirinajsti dan po presajanju en dan stare ličinke in vmesnem presajanju ličink s hkratnim odvzemom MM smo izmerili velikosti matičnikov enih in drugih. Merili smo s kljukastim merilom v vsakem panju posebej, vsak matičnik na vzrejni letvici. Do milimetra natančno smo si zapisovali velikosti matičnikov klasično vzrejenih matic (KVM) in matic, vzrejenih z vmesno prekinitvijo (PVM). Hkrati smo 14 dni stare matičnike zaščitili z valilnimi matičnicami, da ne bi prvoizležena matica uničila še nezizležene matice v ostalih matičnikih. Označili smo jih z vodoodpornim flumastrom, tako da je bil vsak matičnik oštevilčen.



Slika 1: Merjenje matičnikov s kljukastim merilom
Vir: Lasten (3. 9. 2015)



Slika 2: Vstavljanje matičnic
Vir: Lasten (3. 9. 2016)

Izleganje matic smo spremljali 15., 16. in 17. dan razvoja na vsakih 8 ur. Pozorno smo pregledali vse matičnike, za katere smo vedeli, da so bili pokriti in zaščiteni z valilno matičnico. Zapisovali smo število novoizleženih matic v posameznem panju.

Tehtanje novoizleženih matic

Na novo izležene matice smo 48 ur po izleganju stehali v tehtalnem prostoru na BC Naklo. Matice smo z vzrejnim okvirjem in s čim manj tresljaji prenesli v tehtalni prostor. Vsi okvirji so bili označeni s številko posameznega panja. Matico smo previdno prijeli za krila, jo postavili na tehtalno površino, zaprli analitsko tehtnico in počakali, da se umiri. Težo smo odčitali na 0,001 g natančno in matico vrnili v ustrezno valilno matičnico. Ločeno smo zapisovali teže matic KVM in PVM. Po tehtanju smo jih takoj vrnili v panj.

REZULTATI Z RAZPRAVO

Sprejem ličink

Po prvem presajanju en dan starih ličink smo pregledali sprejem v vsakem panju po dveh dneh, torej 6. dan. Sprejetost je bila 72 %.

Pri drugem presajanju smo sprejete ličinke najprej razdelili na dve skupini (KVM in PVM). Polovici sprejetih ličink smo hkrati odvzeli MM in jih položili nazaj. Naslednji dan smo pregledali sprejetost le-teh (PVM), ki je bila 90,9 %.

Pokritja matičnikov

V tabeli 1 je razviden čas pokritja matičnikov 7., 8. in 9. dan za skupino PVM in KVM posebej. Od skupno 39 matičnikov (PVM + KVM) je bilo 7. dan pokritih 5,1 % matičnikov, 8. dan največ matičnikov, in sicer 53,8 %, ter 9. dan 41 %.

Tabela 1: Čas pokritja matičnikov PVM in KVM

Dan razvoja	PVM ¹	KVM ²
7.	2/19	0/20
8.	9/19	12/20
9.	8/19	8/20

Dolžina matičnikov

Dolžine matičnikov smo izmerili 14. dan razvoja pri obeh skupinah, PVM in KVM (tabela 2). V vsakem panju je vsaka matica označena s številko valilne matičnice (dolžine matičnikov so zapisane v centimetrih, velikost matičnega lončka (0,5 cm) je odšteta). Povprečne dolžine matičnikov PVM, je bila za 0,4 cm manjše od povprečja dolžine matičnikov KVM. Povprečne dolžin matičnikov smo izračunali tudi glede na posamezen panj. Pri obeh skupinah so bili matičniki najdaljši v panju 3, najkrajši pa v panjih 2 in 7.

Tabela 2: Dolžina matičnikov PVM in KVM

Št. panja	Št. matičnice (PVM ¹)	Dolžina [cm]	Št. matičnice (KVM ²)	Dolžina [cm]
1	1.1	1,1	1.5	1,6
	1.2	1,2	1.6	1,6
	1.3	1,2	1.7	1,5
	1.4	1,2	1.8	1,3
2	2.1	1,1	2.5	1,3
	2.2	1	2.6	1,3
	2.3	1	2.7	1,4
	2.4	1	2.8	/
3	3.1	1,3	3.5	1,7
	3.2	1,3	3.6	1,8
	3.3	1,3	3.7	1,7
	3.4	1,1	3.8	1,6
5	5.1	1,3	5.5	1,5
	5.2	1,1	5.6	1,5
	5.3	1	5.7	1,6
	5.4	1,2	5.8	1,5
7	7.1	1,2	7.4	1,2
	7.2	0,9	7.5	1,2
	7.3	0,8	7.6	1,1
			7.7	1,2
Povprečje:		1,1		1,5

Legenda:

¹ PVM – prekinjena vzreja matic

² KVM – klasična vzreja matic

/ - matica je mrtva, neizležena ali naknadno poškodovana

Čas razvoja matic

Čas razvoja matic smo določili pri skupno 35 maticah. Povprečni celoten čas razvoja vseh matic skupaj je bil 16,33 dni. Odvzem MM ni imel opaznega vpliva na čas razvoja matic.

Tabela 3: Celoten čas razvoja PVM in KVM

Št. panja	Št. matičnice (PVM ¹)	Celoten čas razvoja [dan]	Št. matičnice (KVM ²)	Celoten čas razvoja [dan]
1	1.1	17	1.5	16
	1.2	16,5	1.6	16
	1.3	16,5	1.7	16
	1.4	16	1.8	18
2	2.1	17	2.5	16
	2.2	16,5	2.6	16,5
	2.3	/	2.7	17
	2.4	16,5	2.8	/
3	3.1	16,5	3.5	16
	3.2	16	3.6	16
	3.3	/	3.7	16
	3.4	16	3.8	16

Št. panja	Št. matičnice (PVM ¹)	Celoten čas razvoja [dan]	Št. matičnice (KVM ²)	Celoten čas razvoja [dan]
5	5.1	16	5.5	15,5
	5.2	15,5	5.6	15,5
	5.3	15,5	5.7	16
	5.4	16	5.8	16
7	7.1	17	7.4	16,5
	7.2	17	7.5	17
	7.3	17	7.6	17
			7.7	/
Povprečje:		16,4		16,3

Legenda:

¹ PVM – prekinjena vzreja matic

² KVM – klasična vzreja matic

/ - matica je mrtva, neizležena ali naknadno poškodovana

Masa matic

Povprečna masa 48 ur starih matic PVM je bila 172,9 mg, povprečna masa enako starih matic KVM pa 177,2 mg. Čeprav je razlika med skupinama 4,3 mg, se povprečna masa matic ni statistično značilno razlikovala. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket IBM SPSS statistics 20. Postopek ANOVA smo uporabili pri iskanju statistično značilne razlike v masi matic med skupinama matic KVM in PVM. Korelacijo med dolžino matičnika in maso matic smo izračunali s pomočjo Pearsonovega koeficienta korelacije. Tabela 4 prikazuje povprečno maso matic glede na panj. Zaradi manjšega števila PVM v panju 2 in 3 je težko primerjati matice glede na panj. Izstopajo lažje matice, vzrejene v panju 5, in najtežje KVM iz panja 7.

Tabela 4: Povprečje mase po panju

Št. panja:	PVM ¹ [mg]	KVM ² [mg]
1 (n)	175,7 (4)	176,0 (4)
2 (n)	176,1 (1)	180,7 (3)
3 (n)	181,4 (1)	179,6 (3)
5 (n)	166,6 (4)	166,7 (4)
7 (n)	173,8 (3)	191,9 (2)

Legenda:

¹ PVM – prekinjena vzreja matic

² KVM – klasična vzreja matic

n – število matic

Razprava

Z izvedbo poskusa smo želeli prikazati možnost vzreje matice ob hkratnem odvzemu MM brez žrtvovanja ličinke. S spremljanjem sprejema ličink, pokritja in dolžine matičnikov ter časa razvoja in mase matic smo primerjali razlike med klasično in prekinjeno vzrejo matic.

Poskus za raziskovalno dalo smo začeli s presajanjem dan starih ličink, pri čemer smo dva dni kasneje pobrali MM in ličinke, stare tri dni, pustili za nadaljnji razvoj. Opazovali smo sprejetost en dan starih ličink in tri dni starih ličink. Sprejem tri dni starih je bil 90 %, kar pomeni, da prvo hipotezo potrdimo, saj so čebele enako sprejele ličinke ne glede na čas presajanja. Način vzreje pa je vplival na dolžino matičnikov; menimo, da zato, ker smo pri prekinjeni vzreji za lažji odvzem MM in ličinke razprli matičnik, ki so ga morale čebele popraviti, pri čemer so izgubile čas do pokritja. Drugo hipotezo, pri kateri smo predvidevali manjše matičnike pri prekinjeni vzreji smo potrdili. Na podlagi rezultatov ne moremo sklepati, da je način vzreje vplival na maso matic, saj se takšno odstopanje statistično značilno ne razlikuje. Pri tretji hipotezi smo ugotavljali pozitivno korelacijo med maso matic in velikostjo matičnika. Omenjeni lastnosti na podlagi rezultatov raziskave nista odvisni druga od druge, zato to hipotezo lahko ovržemo. Za četrto hipotezo, za katero smo poudarili hitrejše pokritje matičnikov pri vzreji z vmesno prekinitvijo ter največje število pokritih matičnikov na osmi dan razvoja, smo ugotovili, da jo lahko delno ovržemo. Osmi dan je bilo namreč največ pokritih matičnikov pri obeh skupinah načina vzreje. Čebele matičnikov s prekinjeno vzrejo niso hitreje pokrile, zato to hipotezo delno potrjujemo, delno pa ovržemo.

Pri preliminarnem poskusu smo MM odvzeli tretji dan, pri čemer je bila za drugo presajanje ličinka stara štiri dni in tako bolj vprašljiva za nadaljnji razvoj v kakovostno matico. Če presajamo ličinko, staro štiri dni, torej sedmi dan razvoja, imajo čebele zelo malo časa za krmljenje z

MM pred pokritjem, saj pokritje matičnika poteka sedmi, osmi ali deveti dan. Na podlagi preliminarne poskusa smo predvidevali, da starejše ličinke ko presajam, manj časa imajo čebele za hranjenje in pokritje matičnika, kar lahko posledično pripelje do manjše in lažje matice. Šesti dan razvoja pa imajo čebele več časa, da dokrmijo ličinke glede na njihovo starost in za tem v roku treh dni pokrijejo matičnik.

Ličinke v poskusu so bile pri presajanju v matične lončke stare 12–24 ur in od sprejema s strani čebel obravnavane za vzrejo matic. To pomeni, da prekinitve po dveh dneh, pri ličinkah, starih 72 ur, nima večjega vpliva, saj je bila ličinka do takrat že hranjena le z MM.

Način vzreje s hkratnim odvzgom MM bi bil seveda smiseln za čebelarje z manjšim obsegom vzreje matic, saj zahteva veliko mero potrpežljivosti pri pravilni manipulaciji z ličinkami, starih tri dni. Novoizležene matice se v poskusu, ki je sicer potekal na majhnem vzorcu, niso razlikovale v masi ne glede na to, ali smo jim med vzrejo odvzeli MM ali ne. Če to storimo dovolj zgodaj, lahko čebele hitro nadomestijo MM, zato odvzem le-tega ne vpliva na maso novoizležene matice. Ob ugodnih zunanjih pogojih (izdatna paša, primerno urejen rednik) manipulacije v panju nimajo večjega vpliva na vzrejo matic. Če pa so zunanji pogoji slabi, tudi optimalen postopek vzreje ne more vplivati na boljši razvoj matic.

Rezultati nakazujejo, da ločen način vzreje najbolj vpliva na dolžino matičnika, ne pa tudi na maso matic, pokritje matičnikov in celoten čas razvoja. Poleg tega smo dobili kvaliteten MM, ki bi bil primeren za prodajo. Kljub temu da je narejenih veliko raziskav o kakovosti matic pri določeni starosti ličinke, bi bile potrebne še obsežnejše raziskave ugotavljanja razlik kakovosti matic pri klasični in prekinjeni vzreji, opraitvi takšnih matic in njihovem zaleganju, vendar menimo, da je to uporabna metoda in nov izziv za čebelarstvo prakso.



ZAKLJUČEK

S pridobivanjem MM in z vzrejo matic se ukvarja ogromno čebelarjev v Sloveniji in v tujini, nekateri za lastno uporabo, nekateri za prodajo. Verjamemo, da so se razmišljanja o povezavi mlečkanja in vzreje z istim vzrejnim gradivom že pojavila, vendar se razmislek večinoma zaključí, ko pomislijo na kakovost in reproduktivnost matice. V okviru raziskave smo pridobivanje MM in vzrejo matic poskušali strniti v celoto, kar nam je bilo predvsem v izziv. Poskušali smo najti izvedljiv način uporabe istega vzrejnega gradiva za dva produkta, ki sta privlačna tako za čebelarja kot za kupca. Seveda bi bilo potrebno večletno spremljanje čebeljih družin, da bi pridobili konkretne rezultate o razlikovanju matic s klasičnim načinom vzreje in s t. i. prekinjenim načinom. Namen poskusa je bil poudariti možnost pridobivanja MM brez žrtvovanja ličinke,

kar sledi cilju o primerljivosti vzrejenih matic iz takšnega vzrejnega gradiva in iz vzreje brez prekinitve.

Na osnovi rezultatov lahko sklepam o uspešnosti pridobivanja MM in hkratne vzreje matic. Vzredili smo 36 matic, od tega jih je preživelo 29, in sicer 13 s prekinjeno vzrejo in 16 s klasično vzrejo. Pridobili smo tudi MM, ki bi bil primeren za prodajo. Premajhno število ponovitev je bilo pomanjkljivost poskusa, da bi dosegli večjo gotovost rezultatov. Poleg tega bi bilo smiselno večletno spremljanje čebeljih družin z maticami iz obeh načinov vzreje. Menim, da bi z doslednim spremljanjem in čim večjim številom ponovitev vzreje iz različnih matičarjev lahko takšen način še bolj dodelali in pridobili konkretne rezultate o razlikovanju kakovosti in reproduktivnosti matic. S tem bi čebelarstvu ponudili še eno dodano vrednost.

LITERATURA

- Kozmus, P., Smodiš Škerl, MI., Nakrst, M. Čebelarjenje za vsakogar: Ljubljana: Kmečki glas, 2011.
- Poklukar, J. Matični mleček. V: Poklukar, J. (ed.). Od čebele do medu. Ljubljana: Kmečki glas, 1998.
- Zdešar, P. Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje 1: Brdo pri Lukovici: Čebelarstva zveza Slovenije, 2008.

'MED KOT ZDRAVILO, NE SLADILO!' STANDARDIZACIJA MEDU Z (BIO)KEMIJSKIMI OZNAČEVALCI ZA PREVERJANJE BOTANIČNE IN GEOGRAFSKE PRISTNOSTI TER UGOTAVLJANJE UČINKA NA ZDRAVJE

*Matjaž DEŽELAK¹, Domen JAKLIČ¹, Adriana PEREYRA¹, Sonča RAČKI¹, Jana POTOKAR¹,
Slavko BERNIK¹, Ažbeta GOSAK¹, Bratko FILIPIČ², Nataša LILEK³, Andreja KANDOLF³,
Mitja KOLAR⁴, Drago KOČAR⁴, Rok KOPINČ¹*

Izvleček

Hrana in živilski izdelki so lahko varni in kakovostni le, če so po sestavi kvalitativno in kvantitativno natančno definirani ter standardizirani s specifičnimi (bio)kemijskimi označevalci. Standardizacija medu je potrebna (i.) za njegovo verodostojno deklariranje, (ii.) pri prehranskih dopolnilih in funkcionalnih živilih na bazi medu je osnova za postavitev priporočenega dnevnega vnosa, zagotavljanje kakovosti in navajanje morebitnih zdravstvenih trditve, (iii.) za določanje izvora medu, (iv.) ključna pa je pri ugotavljanju poneverb medu – jasnejša kot je definicija medu, lažje je odkriti ponaredke. Pri raziskovalnem delu se osredotočamo na slovenski med različnih letnikov, botaničnih tipov in geografskega porekla, za primerjavo pa uporabljamo tudi med iz drugih držav in celin. Uporabljamo uveljavljene in napredne analitske tehnike, kot so tekočinska kromatografija (HPLC) [sklopljena z detektorjem absorbance ultravijolične in vidne svetlobe (DAD), fluorescentnim detektorjem (FLD), elektrokemijskim detektorjem (ECD) in tandemskim masnim spektrometrom (IT-TOF)], poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) ter analitske metode za ugotavljanje antioksidativnega potenciala (FRAP, FC, HRP-H₂O₂) in antimikrobnega učinka (mikrodilucijski in agar-diffusion testi). Naše raziskovalno delo je zastavljeno dolgoročno in je še vedno v teku, zato v nadaljevanju predstavljamo le izhodiščno delo s preliminarnimi rezultati, kateri so osnova za naše nadaljnje usmeritve. HPLC-DAD in HPLC-ECD presejalne analize so pokazale, da se slovenski kostanjev med bistveno loči od ostalih botaničnih tipov glede na vsebnost nekaterih antioksidantov in spojin, ki absorbirajo ultravijolično svetlobo. Nadaljnje raziskave bodo usmerjene v identifikacijo teh biomarkerjev slovenskega kostanjevega medu.

Ključne besede: Med; ponarejanje; poreklo; zdravstvene trditve; HPLC; poliakrilamidna gelska elektroforeza; masna spektrometrija

'HONEY – FROM SWEETENER TO REMEDY' STANDARDIZATION OF HONEY USING (BIO)CHEMICAL MARKERS FOR ITS AUTHENTICATION, DETERMINATION OF ORIGIN, AND ASSESSMENT OF HEALTH-RELATED EFFECTS

Abstract

Food and food products can be safe and quality only if they are qualitatively and quantitatively precisely defined and standardized by specific (bio)chemical markers according to their composition. Standardization of honey is necessary

¹ Medex, d.o.o., Linhartova ulica 49A, 1000 Ljubljana

² HIETO, Koledinečka 3, Zagreb 10040, Hrvaška

³ Čebelarska zveza Slovenije, Brdo 8, 1225 Lukovica

⁴ Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, Večna pot 113, 1000 Ljubljana



(i.) for its authentic declaration, (ii.) for honey-based food supplements and functional food it is the basis for setting the recommended daily intake, assure quality, and claim possible health effect, (iii.) to determine the origin of honey (iv.) and it is especially crucial in identifying adulteration of honey - the clearer the definition of honey, the easier the detection of falsification. In our research work, we focus on Slovene honey of different age, botanical type and geographical origin, whereas for comparison we analyze also honey from other countries and continents. We use state of the art analytical techniques such as liquid chromatography (HPLC) [coupled with ultraviolet and visible light absorption detector (DAD), fluorescent detector (FLD), electrochemical detector (ECD) and tandem mass spectrometer (IT-TOF)], polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and analytical methods for detecting antioxidative potential (FRAP, FC, HRP-H₂O₂) and antimicrobial effect (microdilution and agar-diffusion tests). Our research work is long term oriented and is still in progress, so in the continuation we present only the preliminary results, which are the basis for our further research orientations. HPLC-DAD and HPLC-ECD screening analyzes have shown that the Slovenian chestnut honey is essentially different from other botanical types regarding the content of some antioxidants and compounds that absorb ultraviolet light. Further research will focus on identifying these biomarkers of Slovenian chestnut honey.

Key words: Honey; adulteration; origin; health claims; HPLC; polyacrylamide gel electrophoresis; mass spectrometry



UVOD

Hrana in živilski izdelki so lahko varni in kakovostni le, če so po sestavi kvalitativno in kvantitativno natančno definirani ter standardizirani s specifičnimi označevalci. Le takšne izdelke (i.) lahko ustrezno deklariramo, (ii.) jim pripišemo določeno hranilno vrednost oz. vpliv na zdravje in postavimo priporočen dnevni vnos (funkcionalna živila, nutracevtiki), (iii.) jim določimo izvor (npr. geografski, botanični, glede na čebelo nabiralko, letnik pridelave) ter učinkovito identificiramo ponaredke.

Evropska agencija za varno hrano (EFSA) določa, katere prehranske in zdravstvene trditve je dovoljeno uporabljati (Uredba (ES) št. 1924/2006). Za med do sedaj še ni uspelo znanstveno nedvoumno dokazati, da prispeva k preprečevanju/zdravljenju bolezni, čeprav je to splošno sprejeto dejstvo z več tisočletno tradicijo. Glavni razlog za takšno stanje je, da med (bio)kemijsko ni zadovoljivo definiran saj je izredno kompleksna mešanica stotine kemijskih spojin, ki so prisotne v nestalnih razmerjih in količinah, zagotavljanje konstantnih proizvodov v fazi pridelave pa je praktično nemogoče zaradi samega principa čebelarjenja (otežen nadzor, kje in kaj posamezne čebele nabirajo ter sezonske variacije v rastlinski sestavi). Vse naštetu ima še eno negativno posledico, in sicer ponarejanje medu. Če je namreč med težko definirati, je tudi ponaredke težko odkriti.

V Republiki Sloveniji je pridelava, predelava in trženje medu regulatorno urejeno na nivoju pravilnika (Uradni list RS, št. 4/11, 26/14 – ZKme-1B in 9/15). Osnovna definicija medu v 1. odstavku 2. člena,

“Med je naravna sladka snov, ki jo izdelajo čebele Apis mellifera iz nektarja cvetov ali izločkov iz živih delov rastlin ali izločkov žuželk, ki sesajo rastlinski sok na živih delih rastlin, ki jih čebele zberejo, predelajo z določenimi lastnimi snovmi, shranijo, posušijo in pustijo dozoreti v satju.”

ne vključuje niti enega biokemijskega označevalca. 6. člen in “Priloga: parametri in merila sestave medu” sicer fizikalno-kemijsko natančneje definirata med kot tak, pri čemer se za botanično klasifikacijo medu navajajo le zgornje ali spodnje meje (i.) vsebnosti glukoze, fruktoze in saharoze, (ii.) vsebnosti vode, (iii.) vrednosti električne prevodnosti ter (iv.) subjektivne senzorične ocene. Kot razločevalni parameter botaničnih tipov medov v pravilniku ni naveden pelodni profil (ti. cvetna slika), čeprav v praksi pogosto služi kot izkustveni kriterij pri kategorizaciji medu.

Razumljivo je, da je biokemijsko standardizacijo medu bistveno lažje doseči pri enovrstnih medovih, tj. pri tistih, ki izvirajo pretežno iz ene rastlinske vrste (hoja, lipa, kostanj, akacija, ajda, itn.), kot pri večvrstnih oz. mešanih medovih (npr. gozdni in cvetlični), pri čemer pa je potreb-

no poudariti, da povsem enovrstni med v praksi zelo težko dobiti, razen na strogo kontroliranih območjih (npr. manuka med na monokulturnih rastiščih *Leptospermum scoparium*, ajdov med na obsežnih poljih ajde). Pri enovrstnih medovih je standardizacijo moč doseči z identifikacijo oz. kvantifikacijo ene ali več specifičnih spojin, pri večvrstnih pa bo verjetno potrebno uporabiti kakšne bolj splošne in robustne parametre (npr. antioksidativni potencial, spektroskopske meritve, aminokislinski/proteinski profil, genska tipizacija, anorganski elementi v sledovih) (Bogdanov s sod., 2004).

Naša prva izbira pri iskanju biomarkerjev za posamezne botanične tipe medov je slovenski kostanjev med. Glavni razlog za to izbiro je, da kostanjev med že zdaj dosega relativno visoko ceno zaradi česar je bolj podvržen ponarjam, poleg tega pa ima izmed vseh enovrstnih slovenskih medov verjetno največji zdravstveni potencial. S standardizacijo bi postavili pogoje za klinično testiranje zdravstvenih učinkov, za postavitve priporočenega dnevnega vnosa, za ugotavljanje izvora in za ugotavljanje avtentičnosti slovenskega kostanjevega medu.

MATERIALI IN METODE

Izbira in priprava vzorcev

Naključno smo izbrali 7 kostanjevih medov (K1 – K7) in 4 ostale medove – 1 cvetlični (C), 1 akacijev (A), 1 smrekov (S) in 1 lipov (L) (Tabela 1).

Medove za HPLC analizo smo pripravili na 2 načina. Najprej smo pripravili 10 mL 50% (w/v) raztopine medu v ultraprečiščeni vodi (ddH₂O). 1 mL te raztopine smo filtrirali skozi 0,45 µm membranski filter in ta filtrat je predstavljal ti. ‘direktni vzorec’.

Preostalih 9 mL raztopine smo porabili za ekstrakcijo na trdni fazi (angl. ‘solid-phase extraction, SPE), in sicer po sledečem postopku: SPE kolono (Sep-Pak® Vac C18 3cc 500 mg, Waters, ZDA) smo kondicionirali s 3 mL metanola in 3 mL ddH₂O. Sledilo je postopno dodajanje raztopine medu na kolono, pri čemer smo eluat na koncu zavrgli. Sledilo je spiranje neželenih na kolono vezanih komponent, kot so ogljikovi hidrati, organske kisline in razne nečistoče, najprej s 5 mL ddH₂O z dodatkom HCl (pH 2,0) in nato s 15 mL ddH₂O. Sledila je popolna izsušitev kolone s 3-5 min pretokom zraka. Preostale vezane komponente smo eluirali s 3-krat po 1 mL mešanice metanola in acetonitrila v volumskem razmerju 2:1 (3-kratno koncentriranje začetne raztopine). Eluat smo filtrirali skozi 0,45 µm membranski filter in ta filtrat je predstavljal ti. ‘SPE vzorec’. Vse elucije skozi kolono so potekale pri tlaku prib. – 200 mbar oz. s pretokom prib. 1 mL/min.

Tabela 1: Osnovne značilnosti uporabljenih medov.

oznaka	botanični tip medu	leto pridelave	regija pridelave	pelodni profil (cvetna slika)
K1	kostanjev	2014	02 - MB	kostanj (95%), macesen, lipa, podrastje
K2	kostanjev	2014	02 - MB	kostanj (93%), macesen, sončnica, mirtnice, vrba, akacija
K3	kostanjev	2014	02 - MB	kostanj (90%), lipa, aromati, spore, podrastje, ajda
K4	kostanjev	2014	03 - CE	kostanj (95%), podrastje, spore
K5	kostanjev	2014	02 - MB	kostanj (95%), podrastje, lipa, spore
K6	kostanjev	2016	02 - MB	kostanj (80%), javor, sadno drevje, oljna repica, hrast, lipa, bukev, vrba, vrbovec, omela
K7	kostanjev	2016	02 - MB	kostanj (90%), macesen, lipa, bukev
C	cvetlični	2015	03 - CE	sadno drevje, javor, detelja, akacija, koriander, vrba, oljna repica, jeglič
A	akacijev	2016	08 - NM	javor, sadno drevje, akacija, kostanj, kačja dresen, jeglič, detelja, bukev, vrba, sončnica, slez, vrbovec
S	smrekov	2016	02 - MB	kostanj, spore, podrastje, kobulnice, trpotec, macesen, detelja, aromati
L	lipov	2016	02 - MB	lipa (3%), kostanj, detelja, sadno drevje, slez, bukev, izop, jeglič, sončnica

HPLC-DAD in HPLC-ECD analiza

Za separacijo komponent medu smo uporabili HPLC instrument DIONEX Ultimate 3000 (Thermo Scientific, ZDA) s 4-kanalno črpalko, na 15°C termostatiranim samodejnim vzorčevalnikom, na 25°C termostatirano kolumno Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm) Sorbent LiChroCART® (150×4,6) (Merck KGaA, Nemčija) in DAD oz. ECD detektorjem. Volumen injiciranja je bil 5, 10 ali 15 µL, odvisno od intenzitete najmočnejšega kromatografskega vrha. Tabela 2 prikazuje sestavo mobilne faze. Zajem podatkov z DAD je potekal s frekvenco 5 Hz pri štirih valovnih dolžinah v ultravijoličnem območju elektromagnetnega valovanja (250, 280, 310 in 340 nm), zajem podatkov z ECD pa je potekal pri električnem po-

tencialu 400 in 800 mV. Za vsak med smo dobili torej 12 kromatogramov.

Obdelava in prikaz podatkov

Za obdelavo in urejanje in prikaz podatkov smo uporabili Excel 2016 (Microsoft, ZDA), za statistične analize pa SPSS v.23.0 (IBM, ZDA). Povprečne vrednosti in standardne deviacije smo predstavili tabelarično ter v obliki stolpčnih grafov. Statistična analiza je v poglavju 3.1 vključevala izračun statistično značilnih korelacij med kromatografskimi profili medov (Pearsonov r v primeru normalne razporeditve obeh primerjanih spremenljivk in Spearmanov rho v nasprotnem primeru) ter v poglavju 3.2 izračun statistično značilnih razlik v intenziteti posame-

Tabela 2: Režim mobilne faze HPLC analize.

čas [min]	pretok [mL/min]	1% metanojska kislina [%]	acetonitril [%]
0	0,7	90	10
3	0,7	90	10
12	0,7	75	25
20	0,7	30	70
25	0,7	30	70
30	0,7	90	10
35	0,7	90	10

znih kromatografskih vrhov med kostanjevimi in ostalimi medovi (t-test v primeru normalne razporeditve spremenljivke v obeh primerjanih kategorijah in Mann-Whitney U test v nasprotnem primeru).

REZULTATI Z RAZPRAVO

Upoštevali smo kromatografske vrhove, prisotne vsaj pri enem vzorcu. Tako smo za vsak med iz 12 kromatogramov dobili skupno 266 kvantitativnih podatkov (Tabela 3). SPE ekstrakcija v primerjavi z direktno pripravo vzorca sicer predstavlja dodaten strošek in je časovno zamudna, a je smiselna. Iz rezultatov je razvidno, da imata oba načina priprave vzorca v povprečju $15,0 \pm 2,7\%$ istih DAD in $7,5 \pm 2,2\%$ istih ECD kromatografskih vrhov. Velika večina spojin v SPE ekstraktu je torej takšnih, ki jih z direktno pripravo vzorca ne zaznamo, zaradi česar so podatki po SPE ekstrakciji visoko informativni.

Primerjava kromatografskih profilov med medovi

Tabela 5 prikazuje bivariatne korelacijske koeficiente (R) in vrednosti njihove statistične značilnosti (p) za vse pare primerjanih medov na osnovi njihovih HPLC-DAD in -ECD kromatografskih profilov. Z upoštevanjem priporočil o vrednotenju korelacijskih koeficientov v biomedicinskih raziskavah (Mukaka, 2012) lahko iz naših rezultatov zaključimo, da so si kostanjevi medovi statistično značilno ($p = 3,2 \times 10^{-20} \pm 1,3 \times 10^{-19}$) visoko podobni med sabo

($\bar{R} = 0,699 \pm 0,116$), nasprotno pa so si ostali medovi statistično značilno ($\bar{p} = 3,6 \times 10^{-06} \pm 5,1 \times 10^{-06}$) zanemarljivo podobni med sabo ($\bar{R} = 0,360 \pm 0,206$). Statistično značilna ($\bar{p} = 9,9 \times 10^{-04} \pm 2,8 \times 10^{-03}$) zanemarljiva podobnost obstaja tudi med kostanjevimi in ostalimi medovi ($\bar{R} = 0,348 \pm 0,233$). Iz teh rezultatov smo sklepali, da so HPLC-DAD in -ECD kromatografski profili primeren razločitveni dejavnik med kostanjevim in ostalimi tipi medov. Sledila je identifikacija tistih kromatografskih vrhov, katerih pojavnost in jakost se statistično značilno razlikujeta med kostanjevimi in ostalimi medovi.

Primerjava kromatografskih vrhov med kostanjevimi in ostalimi medovi

Kromatografske vrhove smo ročno integrirali in intenzitete tistih z enakimi retencijskimi časi (RT) primerjali med sabo pri različni medovih. Slika 1 prikazuje primerjavo HPLC-DAD kromatogramov direktnih vzorcev pri 280 nm, Slika 2 in Slika 3 pa primerjavo HPLC-ECD kromatogramov direktnih vzorcev pri 400 in 800 eV.

Intenzitete posameznih kromatografskih vrhov smo primerjali med kostanjevimi in ostalimi medovi. Iskali smo tiste, ki so bodisi pri eni skupini prisotni, pri drugi pa ne, bodisi je njihova intenziteta pri eni skupini statistično značilno drugačna kot pri drugi. Le spojine, ki takšne kromatografske vrhove tvorijo, imajo potencial kot biomarker slovenskega kostanjevega medu. Slika 4 predstavlja kromatografske vrhove, ki se statistično značilno razlikujejo med kostanjevimi in ostalimi medovi. V izogib lažno

Tabela 3: Število kromatografskih vrhov posameznega tipa analize.

tip detektorja	DAD								ECD				vsota
	direktni				SPE				direktni		SPE		
tip vzorca	250 nm	280 nm	310 nm	340 nm	250 nm	280 nm	310 nm	340 nm	400 mV	800 mV	400 mV	800 mV	
valovna dolžina oz. električni potencial													
Število kromatografskih vrhov	32	29	28	17	30	30	30	18	8	11	9	24	266

DAD – detektor z nizom diod; ECD – elektrokemijski detektor; SPE – vzorec po ekstrakciji na trdni fazi.

Tabela 4: Število in delež kromatografskih vrhov, ki smo jih detektirali ne glede na način priprave vzorca.

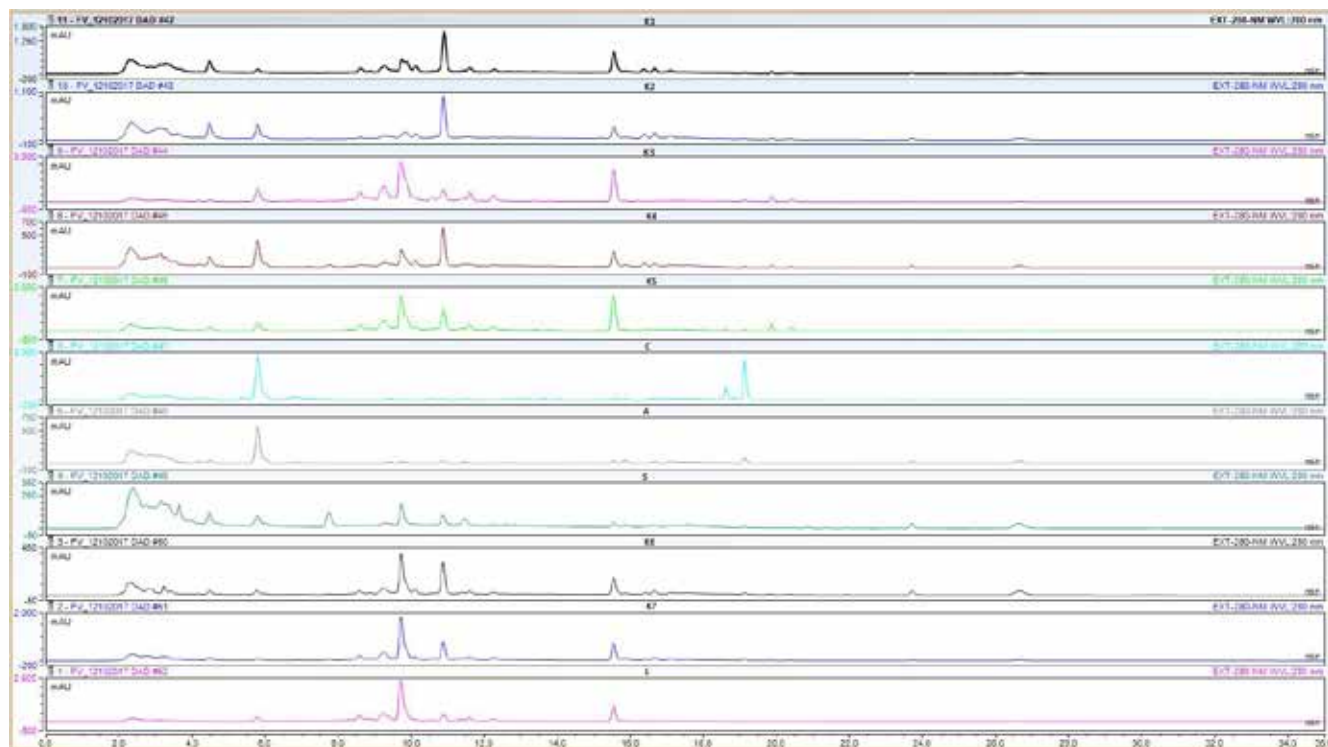
tip detektorja	DAD			ECD		
	250 nm	280 nm	310 nm	340 nm	400 mV	800 mV
valovna dolžina [nm] oz. električni potencial [mV]						
število istih kromatografskih vrhov (direktni vs. SPE vzorec)	10	11	8	4	2	4
odstotek istih kromatografskih vrhov (direktni vs. SPE vzorec)	16,1%	18,6%	13,8%	11,4%	5,3%	9,8%

DAD – detektor z nizom diod; ECD – elektrokemijski detektor; SPE – vzorec po ekstrakciji na trdni fazi.

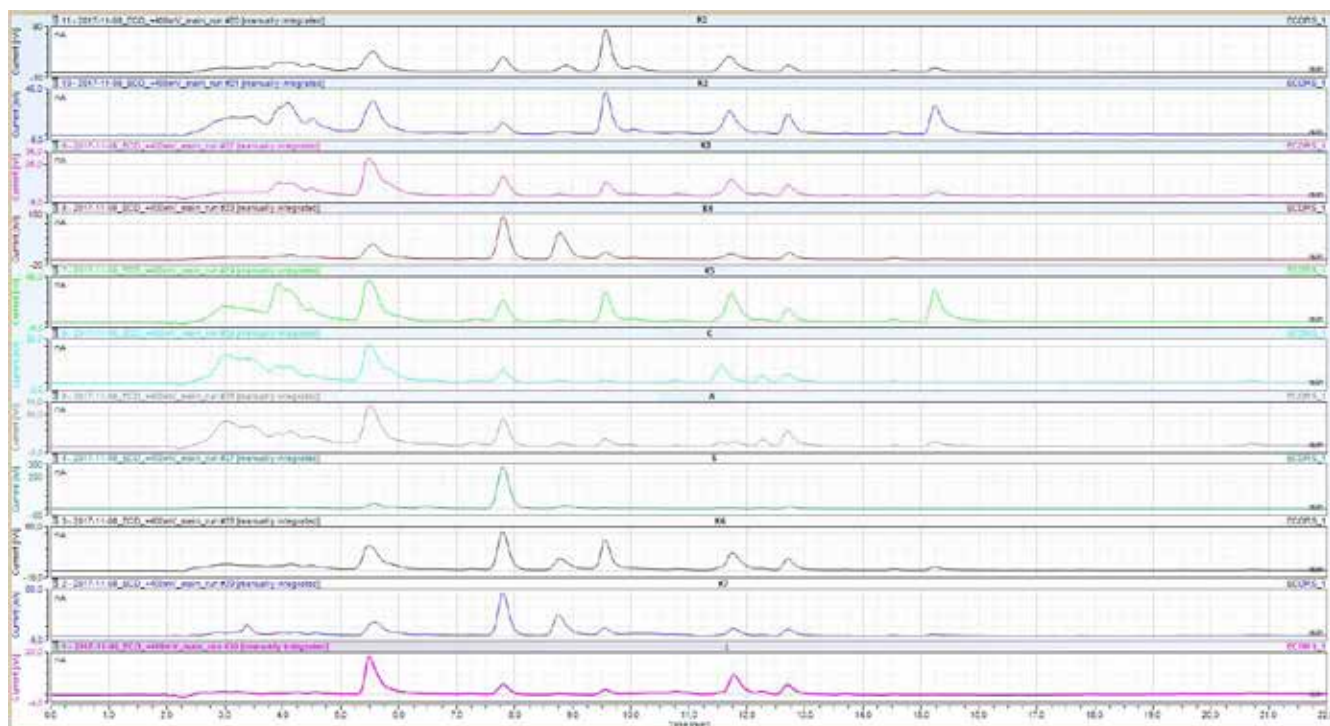
Tabela 5: Primerjava medov na osnovi njihovih kromatografskih profilov na osnovi korelacijskih koeficientov in vrednosti njihovih statističnih značilnosti. Statistično značilne p-vrednosti so napisane krepko in poševno.

med		K2	K3	K4	K5	K6	K7	C	A	S	L
med	atribut							C	A	S	L
K1	R	0,805	0,513	0,731	0,729	0,856	0,773	-0,036	0,292	0,312	0,608
	p	<i>5,7×10⁻⁶²</i>	<i>4,7×10⁻¹²</i>	<i>8,1×10⁻⁴⁶</i>	<i>1,9×10⁻⁴⁵</i>	<i>5,6×10⁻⁷⁸</i>	<i>2,7×10⁻⁵⁴</i>	<i>5,6×10⁻⁰¹</i>	<i>1,2×10⁻⁰⁶</i>	<i>2,0×10⁻⁰⁷</i>	<i>2,3×10⁻²⁸</i>
K2	R		0,209	0,789	0,540	0,755	0,600	0,172	0,440	0,458	0,419
	p		<i>8,1×10⁻⁰³</i>	<i>5,7×10⁻⁵⁸</i>	<i>1,2×10⁻²¹</i>	<i>1,4×10⁻⁵⁰</i>	<i>1,6×10⁻²⁷</i>	<i>4,9×10⁻⁰³</i>	<i>4,4×10⁻¹⁴</i>	<i>2,9×10⁻¹⁵</i>	<i>9,4×10⁻¹³</i>
K3	R			0,277	0,790	0,529	0,615	-0,031	0,199	0,086	0,738
	p			<i>4,0×10⁻⁰⁴</i>	<i>3,7×10⁻³⁵</i>	<i>7,6×10⁻¹³</i>	<i>6,7×10⁻¹⁸</i>	<i>7,0×10⁻⁰¹</i>	<i>1,2×10⁻⁰²</i>	<i>2,8×10⁻⁰¹</i>	<i>1,3×10⁻²⁸</i>
K4	R				0,509	0,774	0,659	0,175	0,456	0,579	0,445
	p				<i>5,1×10⁻¹⁹</i>	<i>1,9×10⁻⁵⁴</i>	<i>1,2×10⁻³⁴</i>	<i>4,2×10⁻⁰³</i>	<i>4,0×10⁻¹⁵</i>	<i>2,6×10⁻²⁵</i>	<i>2,3×10⁻¹⁴</i>
K5	R					0,688	0,762	0,051	0,280	0,204	0,741
	p					<i>8,5×10⁻³⁹</i>	<i>5,9×10⁻⁵²</i>	<i>4,1×10⁻⁰¹</i>	<i>3,4×10⁻⁰⁶</i>	<i>8,0×10⁻⁰⁴</i>	<i>8,0×10⁻⁴⁸</i>
K6	R						0,861	0,102	0,389	0,430	0,667
	p						<i>5,8×10⁻⁸⁰</i>	<i>9,8×10⁻⁰²</i>	<i>4,5×10⁻¹¹</i>	<i>2,1×10⁻¹³</i>	<i>1,1×10⁻³⁵</i>
K7	R							0,060	0,363	0,380	0,769
	p							<i>3,3×10⁻⁰¹</i>	<i>9,8×10⁻¹⁰</i>	<i>1,3×10⁻¹⁰</i>	<i>2,3×10⁻⁵³</i>
C	R								0,650	0,270	0,083
	p								<i>2,2×10⁻³³</i>	<i>7,4×10⁻⁰⁶</i>	<i>1,8×10⁻⁰¹</i>
A	R									0,543	0,345
	p									<i>7,4×10⁻²²</i>	<i>7,2×10⁻⁰⁹</i>
S	R										0,266
	p										<i>1,1×10⁻⁰⁵</i>

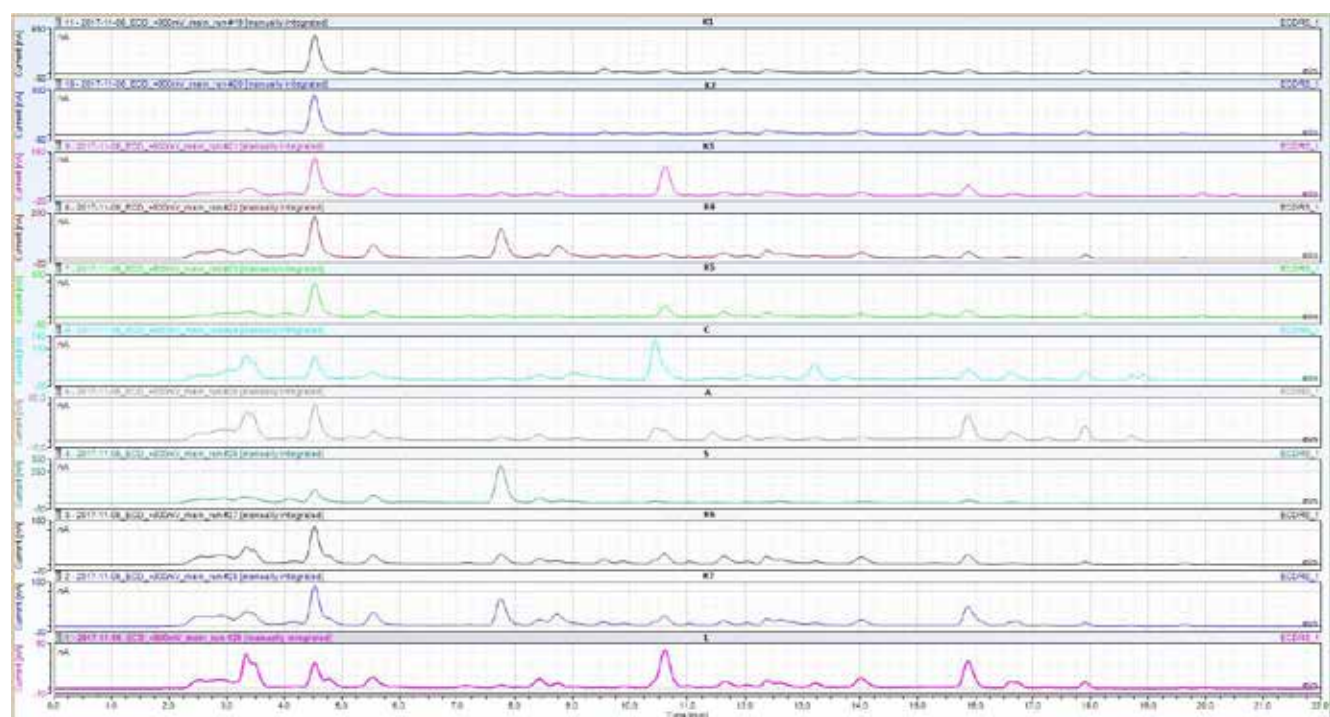
K1- K7 – kostanjevi medovi; C – cvetlični med; A – akacijev med; S – smrekov med; L – lipov med; R – r ali rho korelacijski koeficient; p – stopnja statistične značilnosti.



Slika 1: HPLC-DAD kromatogram vseh 11 'direktnih' vzorcev pri valovni dolžini 280 nm. K1-K7 – kostanjevi medovi; C – cvetlični med; A – akacijev med; S – smrekov med; L – lipov med.



Slika 2: HPLC-ECD kromatogram vseh 11 'direktnih' vzorcev pri električnem potencialu 400 eV. K1-K7 – kostonjevi medovi; C – cvetlični med; A – akacijev med; S – smrekov med; L – lipov med.



Slika 3: HPLC-ECD kromatogram vseh 11 'direktnih' vzorcev pri električnem potencialu 800 eV. K1-K7 – kostonjevi medovi; C – cvetlični med; A – akacijev med; S – smrekov med; L – lipov med.

pozitivnim rezultatom smo izbrali nižjo mejo statistične značilnosti ($p < 0,01$) kot je običajno ($p < 0,05$). Kromatografski vrhovi s še posebej visoko stopnjo statistične značilnosti ($p < 0,001$) v razlikah površine so vredni še posebne pozornosti, saj tako nizka p-vrednost kaže na majhno verjetnost, da so opažene razlike posledica naključja (Sli-

ka 4, stolpci z zvezdico *).

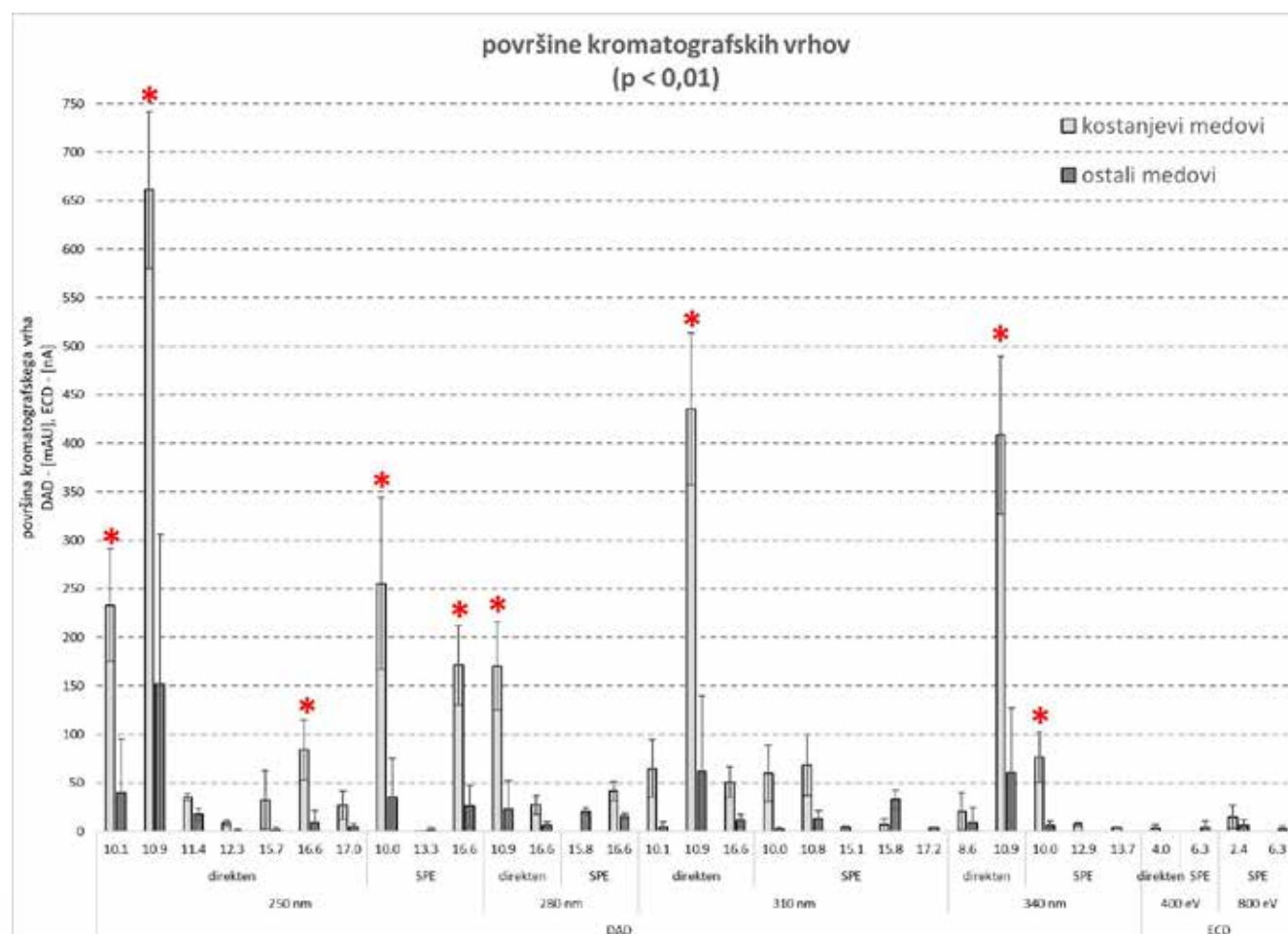
Uporaba **HPLC-ECD** se v našem primeru ni pokazala kot visoko informativna. Izmed 31 kromatografskih vrhov s $p < 0,001$ so namreč le 4 bili identificirani z ECD detektorjem (Slika 4). Poleg tega imajo vsi relativno nizke absolutne vrednosti, zaradi česar je zaupanje v opažene razlike

ustrezno manjše. HPLC-ECD tehnika se je pri analizah medu sicer že pokazala kot uporabna pri razločevanju enovrstnih medov (Zhao s sod., 2016), vendar med njimi ni bilo kostanjevega. Na tem mestu bi izpostavili le kromatografski vrh z RT 9,5 min, opažen na kromatogramu 400 mV, tako direktnega kot SPE vzorca (podatki niso prikazani). Sicer je statistična značilnost relativno nizka ($p = 0,024$ in $p = 0,027$), vendar se ta kromatografski vrh od drugih razlikuje po tem, da je bil opažen pri vseh kostanjevih medovih in pri nobenem od ostalih. Takšen biomarker, katerega 'specifika je v prisotnosti', in ne 'specifika v količini', ima lahko veliko praktično vrednost.

Večina kromatografskih vrhov, dobljenih s HPLC-DAD, je bilo večjih pri kostanjevih medovih kot pri ostalih, z izjemo 3 (RT = 13,3 min, RT = 15,8 min, RT = 17,2 min). Direktni vzorec je bolj informativen pri identifikaciji spojin, ki absorbirajo v UV-C območju (250 in 280 nm), SPE ekstrakti pa pri analizi spojin, ki absorbirajo UV-A

in UV-B elektromagnetno valovanje (310 in 340 nm). Vse spojine, ki jih predstavljajo kromatografski vrhovi na Sliki 4, najverjetneje niso antioksidanti, vsaj ne in vitro v naših eksperimentalnih razmerah. Če bi imele antioksidativne lastnosti, bi bile namreč opažene tudi pri ECD kromatogramih. Izmed vseh statistično značilnih rezultatov DAD kromatogramov najbolj izstopajo 3 kromatografski vrhovi, in sicer z RT približno 10,0, približno 10,9 in približno 16,6 min. Spojina z RT = 10,0 min je bila zaznana tako v direktnih kot v SPE vzorcih, kar kaže na molekulo s polarnimi in nepolarnimi funkcionalnimi spojinami. Spojina z RT = 10,9 min je kemijsko pretežno polarna, saj je prisotna samo pri direktnih vzorcih, podobno velja tudi za spojino z RT = 16,6 min.

Namen te konkretne raziskave ni bil kemijska identifikacija spojin, temu se bomo posvetili v nadaljevanju. V znanstveni literaturi že lahko zasledimo kar nekaj raziskav na to temo, tudi za kostanjev med. Identifikacijo z upo-



Slika 4: Statistično značilno (* – $p < 0,001$; brez * – $p < 0,01$) različne intenzitete kromatografskih vrhov med kostanjevimi in ostalimi medovi. Prva vrstica vodoravne osi predstavlja retencijski čas v minutah, druga vrstica tip vzorca, tretja vrstica valovno dolžino oz. električni potencial detektorja in četrta tip detektorja. Stolpci predstavljajo povprečne vrednosti s standardnim odklonom. DAD – detektor z nizom diod; ECD – elektrokemijski detektor; SPE – vzorec po ekstrakciji na trdni fazi.

rabo eksternih standardov je poskusil že Tomas-Barberan s sod. (2001), vendar precej neuspešno. Uspelo jim je namreč identificirati le za propolis značilne spojine, identiteta 9 ostalih za kostanj značilnih spojin je ostala neznana. Študija Alissandrakis s sod. (2011) je bila temeljitejša. S plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS) so analizirali ekstrakte kostanjevega medu in kostanjevih cvetov. Količina 1-feniletanola, 1-feniletanona, fenilmetanola in 2-aminoacetofenona, ter njihovo razmerje, naj bi bili najzanesljivejši botanični biomarkerji kostanjevega medu (najdeni tako v kostanjevih cvetovih kot v kostanjevem medu), medtem ko sta cis-cinamil alkohol in p-hidroksiacetofenon specifična za kostanjev med, ni pa ju najti v kostanjevem nektarju. Slabost omenjene študije

je, da so z GC-MS zajeli samo hlapne komponente. Temu se je izognil Truchado s sod. (2009) z uporabo nuklearne magnetne resonance (NMR). V kostanjevem nektarju, izoliranem iz čebeljega prebavnega trakta, so identificirali 2 kvinolonska alkaloida [4-hidroksikvinolin-2-karboksilno (kinurensko) kislino in 4-kvinolon-2-karboksilno kislino], 1 monoterpen [4-(1-hidroksi-1-etilmetil)cikloheksa-1,3-dien-1-karboksilna kislina], njegov gentiobiozidni ester ter 1 flavonol [kvercetin-3-pentozilheksozid]. Vse od naštetih so našli tudi v kostanjevem medu, vendar se le oba alkaloida zdita primerna botanična markerja, saj dosedaj nista bila najdena še v nobeni drugi vrsti medu.

ZAKLJUČEK

Zaključimo lahko, da je tehnika HPLC-DAD uporabna pri presejalnih raziskavah iskanja označevalcev medu. Tudi SPE ekstrakcija je informativna, saj večine kromatografskih vrhov pri direktnih vzorcih ni moč zaznati. Majhno število vzorcev v naši raziskavi uporabnosti HPLC-ECD pri identifikaciji kostanjevega medu še ne izključuje povsem. Potrebne so nadaljnje raziskave na več vzorcih in morda pri drugačnih električnih potencialih detektorja.

Na osnovi zgoraj predstavljenih rezultatov smo zastavili razširjen in poglobljen eksperiment, ki vključuje večje število vzorcev (N = 52) in analitske tehnike, primerne za absolutno identifikacijo biokemijskih spojin (LC-MS/MS). Pričakujemo vsaj potrditev že znanih kostanjevih biomarkerjev, v najboljšem primeru pa identifikacijo povsem novega biomarkerja oz. več njih, značilnih izključno za slovenski kostanjev med.



LITERATURA

- Alissandrakis E., Tarantilis P. A., Pappas C., Harizanis P. C., Polissiou M. (2011). Investigation of organic extractives from unifloral chestnut (*Castanea sativa* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) honeys and flowers to identification of botanical marker compound. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1042-1051.
- URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810003464>
- Bogdanov S., Ruoff K., Persano Oddo L. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. *Apidologie*, 35, S4-S17.
- URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00218839.2017.1411181>
- Ministrstvo RS za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (2015). Pravilnik o medu. Uradni list RS, št. 4/11, 26/14 – ZKme-1B in 9/15. EVA: 2010-2311-0017. SOP: 2011-01-0104. URL: <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV9963#>
- Mukaka, M. (2012). A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research. *Malawi Medical Journal*, 24, 69-71.
- URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576830/>
- Tomas-Barberan F. A., Martos I., Ferreres F., Radovic B. S., Anklam E. (2001). HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 485-496.
- URL: <https://doi.org/10.1002/jsfa.836>
- Truchado P., Martos I., Bortolotti L., Sabatini A. G., Ferreres F., Tomas-Barberan F. A. (2009). Use of Quinoline Alkaloids as Markers of the Floral Origin of Chestnut Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5680-5686.
- URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf900766v>
- Uredba (ES) št. 1924/2006 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 20. decembra 2006 o prehranskih in zdravstvenih trditvah na živilih. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/ALL/?uri=CELEX:02006R1924-20121129>
- Zhao J., Du X., Cheng N, Chen L, Xue X., Zhao J., Wu L., Cao W. (2016). Identification of monofloral honeys using HPLC–ECD and chemometrics. *Food Chemistry*, 194, 167-174. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.010>.

OCENA EKONOMSKEGA VPLIVA ZIMSKIH IZGUB ČEBELJIH DRUŽIN V AVSTRIJI, ČEŠKI REPUBLIKI IN REPUBLIKI MAKEDONIJI

*Lazo DIMITROV¹, Despina POPOVSKA², Aleksandar UZUNOV^{2,3}, Robert BRODSCHNEIDER⁴,
Jiri DANIHLIK⁵, Miroljub GOLUBOVSKI⁶, Sreten ANDONOV²*

Izveček

Medonosna čebela (*Apis mellifera* L.) ima velik ekonomski pomen tako za opravevanje, kot tudi za pridelavo čebeljih pridelkov (med, čebelji vosek, cvetni prah, propolis, matični mleček in čebelji strup). Število čebeljih družin se s časom spreminja. Nedavna poročila o izgubah čebeljih družin so pokazala različne stopnje odmiranja le teh v številnih regijah in državah sveta. Za tovrstne izgube ni enotnega razloga temveč gre za kombinacijo različnih vzrokov, kot so: parazitska pršica *Varroa destructor*, virusi, *Nosema* spp, bakterijske bolezni, fitofarmaceutska sredstva, različne čebelarske prakse ter ostali stresni dejavniki. Glede na to, da ekonomski vidik izgub čebeljih družin še ni bil ocenjen, je bila razvita metodologija za ocenjevanje finančnega vidika vpliva izgub čebeljih družin, ki temelji na podatkih, pridobljenih iz COLOSS ankete o izgubah čebeljih družin za leto 2016/17 (COLOSS standard questionnaire survey of honey bee winter losses for 2016/2017). Analiza, ki temelji na metodologiji, razviti v Republiki Makedoniji, je bila opravljena za oceno ekonomskega učinka izgub čebeljih družin. Dodatno so bili v primerjalno analizo vključeni še podatki iz Avstrije in Češke. V Makedoniji je bilo zbranih 321 vprašalnikov (13,6% čebeljih družin na nacionalnem nivoju), v Avstriji je bilo zbranih in analiziranih 1656 vprašalnikov (9,5% čebeljih družin) in na Češkem 1191 vprašalnikov (3,1% čebeljih družin). Ocena ekonomskih izgub je zajemala vrednost čebeljih družin, potencialno izgubo pridelka in izgubo zaradi prilagoditve vpeljane čebelarske prakse. V Avstriji in na Češkem je bila ocena izpeljana glede na povprečne informacije o trgu in produkciji čebeljih pridelkov, v Makedoniji pa so bili podatki pri anketiranih čebelarjih z dodatkom k COLOSS standardnemu vprašalniku. Preliminarni rezultati prikazujejo skupne finančne izgube v EUR zaradi zimskih izgub čebel (propadle, šibke in razdeljene družine) v vseh treh državah. Rezultati bodo pripomogli k osveščanju o pomenu medonosnih čebel za javnost in kmetijski sektor, ter bodo izboljšali strategije za ohranjanje medonosnih čebel ter krepitev čebelarstva.

Ključne besede: ekonomski vpliv, izgube čebeljih družin, metodologija, Avstrija, Češka, Makedonija.

ECONOMIC IMPACT ASSESSMENT OF HONEY BEE WINTER COLONY LOSSES IN AUSTRIA, CZECH REPUBLIC AND THE REPUBLIC OF MACEDONIA

Abstract

Honey bees (*Apis mellifera* L.) are of great importance because of their role in pollination as well as for production of bee products such as honey, wax, pollen, propolis, royal jelly and bee venom. The colony population fluctuates over time and recent monitoring reports show different levels of colony losses in many regions and countries all over the world. The cause of this kind of loss is not a single one, but rather a combination of various factors such as the parasitic mite *Varroa destructor*, viruses, *Nosema* spp., bacterial diseases, pesticides, management practices and other stress factors. Having in mind that the

¹ University Ss. Cyril and Methodius in Skopje, Institute of Agriculture, Skopje, Republika Makedonija, l.dimitrov@zeminst.edu.mk

² University Ss. Cyril and Methodius in Skopje, Faculty of Agricultural Sciences and Food, Skopje, Republika Makedonija

³ Landesbetrieb Landwirtschaft Hessen - Bieneninstitut Kirchhain, Nemčija

⁴ University of Graz, Institute of Biology, Graz, Avstrija

⁵ Palacký University Olomouc, Faculty of Science, Department of Biochemistry, Češka Republika

⁶ MacBee - Association for conservation of Macedonian native honey bee, Negorci, Republika Makedonija

economic aspect of honey bee colony losses has not been estimated so far, a pioneer effort was made for developing a methodology that estimates the economic impact of honey bee colony losses, based on the data from the COLOSS standard questionnaire survey of honey bee winter losses for 2016/2017. Based on the methodology developed in the Republic of Macedonia, an analysis was made in order to perform economic impact assessment of honey bee colony losses and in addition Austria and Czech Republic data were included in the comparative assessment. For the Republic of Macedonia, information from 321 questionnaires, with coverage of 13.6% from the national number of honey bee colonies was analyzed. In Austria, data from 1,656 completed questionnaires was included in the analysis which represents 9.5% from the national number of bee colonies, while in Czech Republic, 1,191 questionnaires were analyzed with coverage of 3.1% out of the total number of colonies. The estimation of the economic losses was taking into consideration the value of the colonies, potential production losses and losses from applied adjustment beekeeping practices. For Austria and Czech Republic, the assessment was performed based on the average national market and production information. In addition, for the Republic of Macedonia, market and financial data were collected from the surveyed beekeepers, based on the upgrade made on the COLOSS standard questionnaire. Accordingly, the preliminary results show the total economic losses in EUR from the winter honey bee colony losses (for lost, weak and split colonies) in all three countries. This will help demonstrating the importance of honey bees for the public and agricultural sector and will support the policies for preservation of the honey bees and strengthening the beekeeping sector.

Key words: economic impact, honey bee colony losses, methodology, Austria, Czech Republic, Republic of Macedonia.



ANALIZA TEMPERATURE SATJA Z ZALEGO V GNEZDIH ČMRLJEV

Janez GRAD¹, Anton GRADIŠEK²

Izveček

Prispevek obravnava in analizira temperaturni interval satja s čmrljo zalego, v okviru katerega so se opazovane čmrlje družine uspešno razvijale do trenutka, ko so iz njih pričele izletavati na plano mlade matice in samčki. V raziskavi je bilo upoštevanih 15 čmrljih družin petih vrst čmrljev, ki živijo v Sloveniji in drugod po srednji Evropi in tudi v Sloveniji: *Bombus hypnorum*, *B. pratorum*, *B. pascuorum*, *B. lapidarius* in *B. humilis*. Dobljeni rezultati kažejo, da čmrlja zalega lahko normalno preživi tudi pri določenem nihanju temperature v satju. Najnižja izmerjena temperatura satja je bila 24,1 °C, najvišja pa 35,5 °C.

Ključne besede: čmrlji, čmrlja zalega, satje z zalego, temperatura satja

BROOD TEMPERATURE ANALYSIS IN BUMBLEBEE NESTS

Abstract

We discuss and analyze the temperature interval of the comb filled with the bumblebee brood within which the observed bumblebee nests successfully developed until the young queens and males emerged and started to fly outside the nest in order to mate. 15 nests of 5 bumblebee species founded by the queens emerging in March, April and May of the year 2017 took part in the research. Studied species are common in Slovenia and Central Europe: *Bombus hypnorum*, *B. pratorum*, *B. pascuorum*, *B. lapidarius* and *B. humilis*. The obtained results show that brood can successfully survive certain temperature oscillations. The lowest obtained comb temperature was 24.1 °C and the highest one 35.5 °C.

Key words: *Bombus*, bumblebee, bumblebee brood, brood comb, comb temperature

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za upravo, Ljubljana, Slovenija

² Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija



UVOD

Vsa živa bitja živijo v določenem življenjskem okolju, ki jim zagotavlja obstoj in razvoj. Za različne vrste bitij se zanje primerna življenjska okolja medsebojno lahko razlikujejo, odvisna pa so od mnogo možnih in potrebnih sestavnih faktorjev, elementov, kot so hranilne snovi, vlaga, voda, zrak in seveda tudi temperatura. Merili smo temperature v gnezdu oz. na satju z zalego v gnezdih uspešno se razvijajočih čmrljih družin izbranih vrst čmrljev, ki živijo v Sloveniji. Opravljene meritve temperature satja kažejo temperaturni interval satja z zalego, v okviru katerega so opazovane čmrlje družine preživele in se razvijale do izleganja samčkov in mladih matic. V analizi smo zajeli pet vrst čmrljev: *Bombus hypnorum*, *B. pratorum*, *B. lapidarius*, *B. pascuorum* in *B. humilis* (Goulson, 2003; Grad et al., 2010; Hagen, 1994), meritve pa so potekale v času od 17. 5. 2017 do 26. 7. 2017, vse dokler niso pričele izletavati mlade matice in samčki.

V Sloveniji v začetnem obdobju razvoja čmrljih družin temperatura okolja precej niha. V takšnih okoliščinah se nekatere vrste čmrljev sicer uspešno razvijajo, vendar mnogo njihovih gnezd, predvsem spomladi, propade, ko se iznenada temperature spustijo pod 0 °C, zapade sneg ali nastopi več dni trajajoče hladno deževno obdobje. Po različnih virih je bilo v Sloveniji do sedaj opaženih 35 vrst čmrljev; od teh je najbolj razširjenih 12 vrst, vključno z *B. haematurus*, ki prihaja iz vzhodnega Sredozemlja in zadnja desetletja osvaja Balkan in države severno od njega (Grad et al., 2010; 2016).

Temperaturo notranjosti čmrljih gnezd je obravnavalo ali navajalo v svojih delih že več avtorjev prispevkov o čmrljih; na primer: (Goulson, 2003), (Hagen, 1994), (Heinrich, 1994), (Hintermeier, 1997), (Matheson-editor, 1996), (Weidenmueller, A., 2004), (Witte, Seger, 1999). D. Goulson piše, po viru (Seeley and Heinrich, 1981), da je pri velikem številu delavk temperatura gnezda približno konstantna pri 30-31 °C. Poglabljeno je tematiko obravnaval B. Heinrich, ki je analiziral temperaturo v gnezdih čmrljev *B. vosnesenskii* in *B. polaris*. Med drugim je ugotovil, da temperatura zalege lahko variira med 24-34 °C. A. Weidenmueller pa je pri analizi temperature v gnezdu 4 družin čmrljev *B. terrestris* zabeležila kot ugodno povprečno temperaturo 27.7-28.7 °C, pri temperaturi nad 30 stopinjami pa so čmrlji gnezdo hladili z bolj ali manj intenzivnim brenčanjem (angleško: *fanning*). Ostali avtorji navajajo, da je optimalna temperatura notranjosti čmrljega gnezda okrog 30-32 °C. Navajajo tudi, da je temperatura satja, v katerem ni zalege, lahko za nekaj stopinj nižja kot v satju z zalego. Zanimivi so še drugi prispevki, ki obravnavajo temperaturo gnezda z različnih vidikov in v povezavi z drugimi za preživetje čmrljih družin pomembnimi

okoliščinami in faktorji. Oyen s sod., (2016) je analiziral prilagajanje mejnih vrednosti temperature čmrljev ob višinskih spremembah okolja in njegovih temperatur; Dean (2016) pa je analiziral vpliv temperature gnezda na barvne vzorce izleženih čmrljev in na hitrost rasti čmrlje zalege. Jones in Oldroyd (2007) sta obravnavala pasivni in aktivni pristop socialnih žuželk pri regulaciji toplote v gnezdih; Weidenmuehller s sodelavci (2002) piše o vzdrževanju za razvoj družine primerne temperature gnezda čmrljev *B. terrestris*; izgubo toplote in termoregulacijo gnezda čmrljev vrste *B. lapidarius* pa je obravnaval Schultze-Motel (1991).

METODE

Eksperiment je bil opravljen na petnajstih čmrljih družinah: štirih družinah *Bombus hypnorum*, eni družini *B. pratorum*, dveh družinah *B. lapidarius*, eni družini *B. pascuorum* in sedmih družinah *B. humilis*, naseljenih v panje na lokaciji občine Dol pri Ljubljani. Panji so bili postavljeni v lesenem čmrljaku - predelanem kranjskem čebelnjaku in dveh manjših lesenih hišicah na prisojnih legah. Nekateri panji so bili ves čas v senci, na druge pa je sonce sijalo do največ 9. ure dopoldne. Ko so zunanje temperature v senci presegle 32 °C, so družine z večjim številom delavk hladile notranjost panjev ob vhodu v panj. Pri družinah s kratko življenjsko dobo, to so čmrlji *B. hypnorum* in *B. pratorum*, je merjenje potekalo do 10. 6., pri ostalih vrstah čmrljev, z daljšo življenjsko dobo, pa do 26. 7.

Za vsako družino so bili pri vsakem merjenju evidentirani oznaka družine, maksimalna izmerjena temperatura satja v gnezdu, datum in ura merjenja, zunanja temperatura zraka, dnevna temperatura zraka okolja (minimalna temp. – maksimalna temp.) in okvirno število delavk v gnezdu. Zabeležen pa je bil tudi datum prvega izleta mlade matice iz vsake posamezne družine.

Opravljenih je bilo do osem merjenj s časovnimi presledki 7 – 11 dni. Zaradi napadalnosti delavk vrste *B. hypnorum* so bila merjenja opravljena v popoldanskem času, na lokaciji panja z družino. Pri ostalih vrstah so meritve potekale bodisi popoldne na mestu, kjer je stal panj, bodisi zvečer v zaprtem prostoru (kleti).

Temperaturo smo merili z vboдным termometrom »TFA LT-101« firme Conrad Electronic SE iz Nemčije. Pri vsakem merjenju je bilo tipalo inštrumenta potisnjeno na satje z zalego, pomikano po satju, na koncu pa je bila zabeležena maksimalna temperatura satja. Dotik konice tipala površine satja je bil odločujoč pri meritvi temperature satja in temperatura notranjosti čmrljega gnezda ni vplivala na meritve.

REZULTATI

Rezultati meritev so prikazani v spodnjih tabelah. V posamezni tabeli so podani podatki za posamezno čmrljo družino. Povprečna temperatura se nanaša na obdobje, ko je bilo v gnezdu veliko delavk (ravnovesno obdobje). Struktura tabele je sledeča (vse temperature so podane v °C):

Oznaka družine, datum naselitve lanskoletne matice, datum izleta prve mlade matice, povprečna temperatura

1.–3. vrstica, po stolpcih (4 ali 8 stolpcev):

datum posameznega merjenja, **izmerjena temperatura**

dnevni čas merjenja (ura, minute), zunanja temperatura gnezda

(okvirno) število delavk v družini (glej legendo), interval dnevne temperature okolja

Bombus pratorum, 3. 3., 21. 5., 31,2

17.5., 32,1	24.5., 32,2	31.5., 31,3	7.6., 29,0
21.00, 17	21.15, 19	21.40, 22	20.35, 14
v, 13 - 22	v, 13 - 22	v, 16 - 29	m, 13 - 15 (že brez stare matice in skoraj brez zalege)

Bombus hypnorum-1, 21. 3., 2. 6., 33,9

18.5., 32,0	25.5., 33,9	1.6., 35,0	10.6., 34,6
12.25, 24	12.25, 20.7	17.55, 25	14.45, 24
v, 9 - 25	zv, 13 - 23	zv, 16 - 30	zv, 13 - 24

Bombus hypnorum-2, 24. 3., 1. 6., 33,8

18.5., 35,5	25.5., 32,8	1.6., 33,6	10.6., 33,2
12.45, 24	12.40, 22.5	18.15, 24	15.05, 24
v, 9 - 25	zv, 13 - 23	zv, 16 - 30	v, 13 - 24

Bombus hypnorum-3, 29. 3., 30. 5., 34,4

18.5., 35,0	25.5., 34,0	1.6., 34,9	10.6., 33,7
13.05, 24	13.05, 23	18.30, 24	15.20, 23
v, 9 - 25	zv, 13 - 23	zv, 16 - 30	zv, 13 - 24

Bombus hypnorum-4, 30. 3., 30. 5., 31,7

18.5., 29,2	25.5., 32,2	1.6., 34,6	10.6., 30,7
13.35, 24	12.05, 20.8	17.45, 25	14.30, 24
m, 9 - 25	v, 13 - 23	v, 16 - 30	v, 13 - 24

Bombus lapidarius-1, 27. 4., 21. 7., 31,9

19.5., 27,1	26.5., 31,9	2.6., 31,9	8.6., 31,6	24.6., 33,4	5.7., 32,5	15.7., 33,4	25.7., 33,5
22.15, 18	21.30, 18	21.50, 20	21.30, 15	22.05, 23	15.30, 29	22.00, 20	21.15, 16
zm, 10 - 27	10, 10 - 22	10, 16 - 30	v, 9 - 21	v, 19 - 34	v, 14 - 32	v, 14 - 24	v, 14 - 25

Bombus lapidarius-2, 10. 4., 20. 7., 32,2

18.5., 30,7	25.5., 31,4	1.6., 32,3	8.6., 30,6	24.6., 32,7	5.7., 34,0	15.7., 33,0	25.7., 32,8
21.25, 20	21.30, 17	21.15, 22	22.10, 14	22.20, 23	16.15, 29	21.00, 20	18.20, 16
m, 9 - 25	m, 13 - 23	v, 16 - 30	v, 9 - 21	19 - 34	v, 14 - 32	v, 14 - 24	v, 14 - 25

Bombus pascuorum, 29. 4., 16. 8., 31,2

20.5., 28,5	27.5., 30,4	31.5., 30,3	7.6., 30,6	24.6., 31,4	5.7., 34,6	15.7., 31,4	25.7., 32,5
21.00, 14	21.30, 18	21.10, 22	20.10, 15	21.40, 23	15.50, 29	17.20, 22	14.30, 23
zm, 12 - 16	zm, 12 - 26	10, 16 - 29	m, 13 - 15	v, 19 - 34	v, 14 - 32	zv, 14 - 24	zv, 14 - 25

Bombus humilis-1, 3. 4., 22. 7., 31,9

22.5., 24,1	29.5., 33,0	5.6., 31,1	12.6., 31,9	25.6., 32,2	6.7., 33,7	16.7., 34,9	26.7., 34,5
21.25, 20	22.10, 19	21.50, 21	21.50, 21	19.05, 20	21.45, 22	22.55, 16	21.20, 16
0, 11 - 24	4, 13 - 29	5, 15 - 26	5, 16 - 31	v, 20 - 24	v, 18 - 33	v, 13 - 24	v, 12 - 23

Bombus humilis-2, 9. 4., 21. 7., 31,4

22.5. 28,1	29.5., 28,7	5.6., 29,8	12.6., 32,3	25.6., 32,2	6.7., 33,3	16.7., 33,0	26.7., 33,4
21.15, 20	21.20, 21	21.15, 21	21.15, 22	18.15, 20	21.20, 23	21.40, 17	20.30, 17
1, 11 - 24	2, 13 - 29	5, 15 - 26	5, 16 - 31	v, 20 - 24	v, 18 - 33	v, 13 - 24	v, 12 - 23

Bombus humilis-3, 10. 4., 16. 7., 31,7

23.5., 26,2	30.5., 28,6	6.6., 31,4	13.6., 32,0	25.6., 32,6	6.7., 35,0	16.7., 34,3	26.7., 33,5
21.15, 20	22.30, 21	20.35, 21	21.15, 23	19.40, 19	21.40, 23	22.20, 16	20.45, 17
1, 13 - 26	3, 15 - 30	8, 14 - 24	12, 16 - 31	v, 20 - 24	v, 18 - 33	v, 13 - 24	v, 12 - 23

Bombus humilis-4, 14. 4., 9. 7., 31,9

21.5., 30,4	28.5., 29,7	4.6., 30,2	11.6., 32,0	24.6., 33,7	5.7., 32,8	15.7., 33,4	25.7., 32,6
20.55, 18	20.50, 20	21.15, 21	21.10, 18	23.05, 22	21.35, 23	20.30, 21	14.55, 23
4, 12 - 22	6, 13 - 27	11, 14 - 28	20, 14 - 28	v, 19 - 34	v, 14 - 32	v, 14 - 24	v, 14 - 25

Bombus humilis-5, 2. 5., 18. 7., 31,4

23.5., 26,4	30.5., 28,8	6.6., 31,2	13.6., 32,8	25.6., 34,4	6.7., 32,8	16.7. 31,1	26.7., 34,0
21.30, 20	22.00, 21	20.05, 21	21.40, 23	19.20, 20	22.05, 21	22.30, 16	21.05, 16
0, 13 - 26	4, 15 - 30	5, 14 - 24	10, 16 - 31	v, 20 - 24	v, 18 - 33	v, 13 - 24	v, 12 - 23

Bombus humilis-6, 1. 5., 18. 7., 32,8

22.5. -	29.5., 31,9	5.6., 31,4	12.6., 31,6	25.6., 32,8	6.7., 34,3	16.7., 34,2	26.7., 33,5
- -	21.50, 20	21.30, 21	21.30, 22	18.35, 20	21.00, 23	21.55, 17	20.15, 17
0, 11 - 24	4, 13 - 29	6, 15 - 26	7, 16 - 31	v, 20 - 24	v, 18 - 33	v, 13 - 24	v, 12 - 23

Bombus humilis-7, 13. 6.(gnezdo ogrebeno v panj, matica in 2 delavki), 22. 8., 31,4

24.6., 30,8	5.7., 31,5	15.7., 31,9	25.7., 31,5
22.45, 22	21.50, 23	20.15, 21	18.00, 16
2, 19 - 34	4, 14 - 32	5, 14 - 24	9, 14 - 25

Legenda: **zm** = manj od 10, **m** = manj od 20, **v** = več od 20, **zv** = več od 100.

Tekom opazovanja je nekatera čmrlja gnezda napadla voščena večča vrste *Aphomia socielle* (Lepidoptera: Pyralidae), ki jo opisujejo različni avtorji, na primer v (Goulsen, 2003; Hagen, 1994). Napadi so se izvršili že po zaključku meritev temperatur, razen pri *B. lapidarius* 1 in *B. humilis* 3. Napadeni panji so bili vsakič sproti očiščeni ličink, zato pojav ni vplival na razvoj družin.

RAZPRAVA Z ZAKLJUČKI

V raziskavi smo upoštevali čmrlje družine, ki so preživele v marcu leta 2017 zelo toplo obdobje, ko so lanskoletne matice že zalegale, in nato v drugi polovici aprila nenavadno mrzel več dni trajajoč interval z nočnimi temperaturami pod lediščem in snegom v višjih predelih. Ta vremenski zaobrat je povzročil množičen propad čmrljih gnezd z že obstoječo zalego.

Vse obravnavane družine so bile uspešne; v vseh so se izlegle in iz njih odletele mlade matice in samčki. Izmerjene temperature satja z zalego so bile v različnih panjih in ob različnih merjenjih različne, od najnižje temperature 24,1 °C pri družini *B. humilis*-1, do najvišje temperature 35,5 °C pri čmrljih *B. hypnorum*-2. Pogojene so bile tudi s številom delavk v gnezdu: pri zelo majhnem številu delavk je bila temperatura nižja kot pri velikem številu delavk, ko je temperatura tudi stabilnejša, kar se sklada z ugotovitvami nekaterih raziskovalcev čmrljev, kot je na primer Bernd Heinrich (Heinrich, 1994). Na primer pri *B. humilis*-5: 0 delavk 26,4 °C; 4 d. 28,8 °C, 5 d. 31,2 °C, 10 d. 32,8 °C, več d. 34,4 °C. To je smiselno, saj posamezna delavka ne more učinkovito zagotavljati termoregulacije gnezda, večje število delavk pa lahko. Pri družinah z dvajsetimi ali več delavkami so le-te pri temperaturah okolice

nad 32 °C hladile notranjost panja z ventilacijo pred vhodom v panj.

Časovno izleganje oziroma izletanje mladih matic je potekalo v skladu z dolžino življenjskega obdobja posameznih vrst čmrljev. Najbolj zgodnje so bile matice vrst s kratkim življenjskim obdobjem, *B. pratorum* in *B. hypnorum*. Tako smo zabeležili za vrsto *B. pratorum* 21. 5., za vrsto *B. hypnorum* 30. 5., za vrsto *B. humilis* 9. 7, za vrsto *B. lapidarius* 20. 7. in za vrsto *B. pascuorum* 16. 8.. Zanimivo je, da so se mlade matice iste vrste čmrljev iz različnih družin pojavile približno istočasno, ne glede na datum naselitve lanskoletne (stare) matice.

Opazovanja so pokazala, da je bilo število mladih matic v različnih panjih različno, tudi v okviru iste vrste čmrljev, in ni bilo pogojeno s temperaturo satja. Največ mladih matic je izletelo iz družin *B. hypnorum*, okrog dvajset, najmanj pa iz *B. humilis*-4 in *B. humilis*-7, do tri matice. Povprečne vrednosti izmerjenih temperatur se med družinami razlikujejo in ležijo na intervalu od 31,2 °C pri *B. pascuorum* do 34,4 °C pri *B. hypnorum*-3. Rezultati meritve kažejo na to, da so čmrlji trdoživi in dobro prilagojeni na možne letne vremenske spremembe, nevšečnosti in nevarnosti, ki jih lahko povzroči spreminjajoča se narava.

LITERATURA

- **Dean, C. A. E. (2016):** Developmental timing of pupation and analysis of color pattern response to thermal stress in *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae). Thesis, The Graduate College of the University of Illinois at Urbana-Campaign, 2016. Urbana, Illinois.
- **Goulson, D. (2003):** Bumblebees: Their Behaviour and Ecology. Oxford University Press, Oxford.
- **Grad, J., Gogala, A., Kozmus, P., Jenič, A., Bevk, D. (2010):** Pomembni in ogroženi opraševalci – Čmrlji v Sloveniji. Čebelarstva zveza Slovenije, Lukovica, Slovenija.
- **Grad, J., Oštir, T., Jenič, A. (2016):** Redkejšje vrste čmrljev v Sloveniji, Značilnosti čmrljev in zanimivosti. Celjska Mohorjeva družba, 2016, Celje, Slovenija.
- **Hagen, E. von (1994):** Hummeln: bestimmen, ansiedeln, vermehren, schuetzen. Naturbuch Verlag, Augsburg, Germany.
- **Heinrich, B. (1994):** Bumblebee Economics. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England. Fifth Printing, 1994.
- **Hintermeier, H., Hintermeier, M. (1997):** Bienen, Hummeln, Wespen im Garten und in der Landschaft. Bayerischer Landesverband fuer Gartenbau und Landespflege, Muenchen. 2. Auflage 1997.
- **Jones, J. C. and Oldroyd, B. P. (2007):** Nest Thermoregulation in Social Insects. Advances in Insect Physiology, Vol. 33, 153 – 191.
- **Kearns, C. A., Thomson, J. D. (2001):** The Natural History of Bumblebees: A Sourcebook for Investigations. The Univesity Press of Colorado, Boulder
- **Matheson, A. – editor (1996):** Bumblebe Bees for pleasure and profit. IBRA – International Bee Research Association, UK
- **Oyen, K. J., Giri, S., Dillon, M. E. (2016):** Altitudinal variation in bumble bee (*Bombus*) critical thermal limits. Journal of Thermal Biology 59 (2016) 52 – 57.
- **Prys-Jones, O. E. and Corbet, S. A. (1987):** Bumblebees. Naturalists' Handbooks 6, Cambridge University Press, Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney.
- **Schultze-Motel, P. (1991):** Heat loss and thermore-

gulation in a nest of the bumblebee *Bombus lapidarius* (Hymenoptera, Apidae). *Thermochimica Acta* 193 (1991) 57 – 66.

- **Seeley, T. D. and Heinrich, B. (1981):** Regulation of temperature in nests of social insects. *Insect Thermoregulation*, edited by B. Heinrich, pp. 159 – 234. John Wiley, New York.
- **Weidenmueller, A. (2004):** The control of nest climate in bumblebee (*Bombus terrestris*) colonies: Interindividual variability and self reinforcement in fanning response. *International Society for Behavioral Ecology 2004. Behavioral Ecology* Vol. 15 No. 1: 120 – 128 (2004).
- **Weidenmueller, A., Kleineidam, C., Tautz, J. (2002):** Collective control of nest climate parameters in bumblebee colonies. *Animal Behaviour*, 2002, 1065 – 1071.
- **Witte, G. R., Seger, J. (1999):** Hummeln brauchen blühendes Land. Westarp Wissenschaften-Verlags-gesellschaft mbH, Hohenwars leben.



SPREMLJANJE DNEVNE AKTIVNOSTI ČMRLJEV Z UPORABO MIKROFONA

Anton GRADIŠEK¹, Nicolas CHERON², David HEISE³, Candace GALEN⁴, Janez GRAD⁵

Izvleček

V prispevku predstavimo prve rezultate študije, pri kateri smo s pomočjo mikrofонов, postavljenih pred čmrljak, spremljali dnevno aktivnost, natančneje pašna dejavnost čmrljev. Zvočne posnetke smo obdelali s posebej prilagojenim računalniškim algoritmom, ki prepozna posamezne dogodke (ko čmrlj odleti iz panja ali se vanj vrne). Prav tako algoritem lahko ločuje med prihodi in odhodi. Prikažemo podatke za tri vrste čmrljev (*B. pascuorum*, *B. humilis* in *B. hypnorum*), vsako družino smo spremljali en dan. Prispevek predstavlja prvo fazo sistematične študije aktivnosti čmrljev v odvisnosti od različnih parametrov.

Ključne besede: čmrlji, pašna dejavnost, analiza zvoka

MONITORING DAILY FORAGING ACTIVITY OF BUMBLEBEES USING A MICROPHONE

Abstract

We present initial results of the study where we used microphones, placed in front of nest boxes, to monitor the daily foraging activity of bumblebees. Sound recordings were analyzed using a custom-made computer algorithm which detects flight buzzing sounds coming from arrivals or departures of individual bees. In addition, the algorithm distinguishes between arrivals and departures. We show examples of daily activities for three species (*B. pascuorum*, *B. humilis* and *B. hypnorum*), each was monitored for one day. This paper presents initial results of a longer study where we plan to systematically investigate the activities of bumblebees in various circumstances.

Key words: bumblebees, foraging activity, sound analysis

¹ Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana, Slovenija,

² Polytech Paris Sorbonne, Francija,

³ Lincoln University, ZDA,

⁴ University of Missouri, ZDA,

⁵ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za upravo, Ljubljana, Slovenija



UVOD

Čmrlji (rod *Bombus* iz družine čebel Apidae) so pomembna skupina divjih oprasovalcev. Zaradi drugačne morfološke in življenjskega sloga so pri oprasovanju rastlin pogosto učinkovitejši od medonosnih čebel – na pašo izletavajo tudi ob deževnem in hladnem vremenu, poleg tega pa s posebno tehniko tresenja lahko spravijo cvetni prah tudi iz cvetov, kjer so čebele neuspešne. Tak primer denimo je paradižnik, zato so čmrlji postali pomemben člen pri gojenju nekaterih vrst zelenjave v rastlinjakih.

Spremljanje aktivnosti oprasovalcev je tako zanimivo za širok krog znanstvenikov, tako za agronome, ekologe, kot za strokovnjake, ki se ukvarjajo z ohranjanjem okolja. Čmrlje se lahko preučuje na različne načine. Na terenu sta tipična pristopa opazovanje in lovljenje. Slednje je problematično, saj vključuje odvzem posameznih osebkov iz narave. V literaturi zasledimo tudi študije čmrljev v povsem laboratorijskem okolju, kar se tipično izvaja s komercialno pridobljenimi čmrljimi družinami. V tem primeru je pričakovati nekoliko drugačno obnašanje čmrljev kot povsem v naravnem okolju. Boljši pristop h kontroliranemu opazovanju je namestitev čmrljev v gnezdilnice, ki so nameščene na kontroliranih lokacijah. Namesto v travniški ruši, gozdnem podrastju, opuščeni gnezdnih glodavcev ali v drevesnih duplinah se čmrlji lahko naselijo tudi v posebej prilagojene kartonske škatle ali lesene gnezdilnice (panje), kar omogoča opazovanje v skoraj naravnem okolju. V pričujočem prispevku predstavimo prve rezultate študije, pri kateri obnašanje čmrljev, natančneje pašno dejavnost, spremljamo z mikrofonom. Uporaba mikrofona ima vrsto prednosti pred opazovalcem, ki beleži izhode čmrljev ročno (kot denimo v Grad s sod., 2016). Mikrofon lahko snema neprekinjeno, poleg tega pa lahko z uporabo serije mikrofonom spremljamo vrsto lokacij hkrati. Posnetke kasneje obdelamo z uporabo računalniškega algoritma. Pristop spremljanja čmrljev z uporabo zvoka sicer ni nov. V eni od prejšnjih študij smo zvoke brenčanja med letom uporabili kot način identifikacije posamezne vrste ter tipa čmrlja (delavka ali matica), s pomočjo algoritmov strojnega učenja (Gradišek s sod., 2017). Heise s sod. (2017) so razvili algoritem, ki je namenjen zaznavanju letočih čmrljev v posnetkih mikrofonom, postavljenih v naravi. V pri-

čujoči študiji smo spremljali več družin čmrljev različnih vrst z mikrofoni, postavljenimi pred vhodom v panj. Ko čmrlj odleti iz panja ali pa se vanj vrne, mikrofon posname zvok brenčanja, kar nam da direktno informacijo o izletavanju čmrljev na pašo. V nadaljevanju predstavimo način zbiranja in obdelave posnetkov ter prve rezultate študije pašne dejavnosti v izbranih dneh.

MATERIAL IN METODE

Snemanje dnevne aktivnosti

Za snemanje zvokov smo uporabili USB mikrofone dB9PRO VR1.0. Posamezen mikrofon ima okrog 8 GB pomnilnika, kar zadostuje za več kot 90 ur posnetkov. Ob posameznem polnjenju mikrofon po specifikacijah lahko zajema podatke do 18 ur (v praksi se je pokazalo, da je ta čas bliže desetim uram). Frekvenca zajemanja signala je 48 kHz, s 192 Kbps. V analizi predstavimo tri čmrlje družine, ki smo jih snemali čez dan (Tabela 1). V vsakem primeru je bil napolnjen mikrofon postavljen nekaj centimetrov od vhoda v panj. Vsak večer so bili mikrofoni ponovno napolnjeni.

Analiza signalov

Za osnovno analizo signalov je bil uporabljen program Audacity, ki omogoča hitro pregledovanje in urejanje posnetkov ter izdelavo spektrogramov.

Podrobnejša analiza je potekala v programskem okolju Matlab, s pomočjo lastne programske kode in obstoječih programskih paketov. Ker je naš problem bolj specifičen kot splošni problem, ki so se ga lotili Heise s sod. (2017), mikrofon je v našem primeru namreč vedno postavljen pred panj in najmočnejši signali praktično vedno ustrezajo čmrljem, smo uporabili nekoliko poenostavljen algoritem. Kljub temu se moramo zavedati, da mikrofon poleg brenčanja zajame tudi šume iz okolice, denimo promet, ki so lahko veliko bolj glasni od čmrljev. Algoritem tako prepozna možne dogodke (ko čmrlj leti mimo mikrofona), potem pa za vsakega določi, če gre zares za čmrlja. Meje za detekcijo smo za vsak posnetek predhodno določili ročno, na podlagi nekaj ročno označenih posnetkov. Osnovna

Tabela 1: Podatki o treh družinah čmrljev, ki smo jih spremljali dva izbrana dneva.

Družina	Datum	Velikost družine	Vreme
B. pascuorum	28. maj 2018	10 delavk	14-28 °C, jutranja megla, čez dan sončno, zvečer krajevne nevihte
B. humilis	29. maj 2018	20 delavk	16-26 °C, dopoldne rahlo oblačno, popoldne oblačno, po 16. uri rahel dež, po 18. uri močan dež
B. hypnorum		30 delavk	

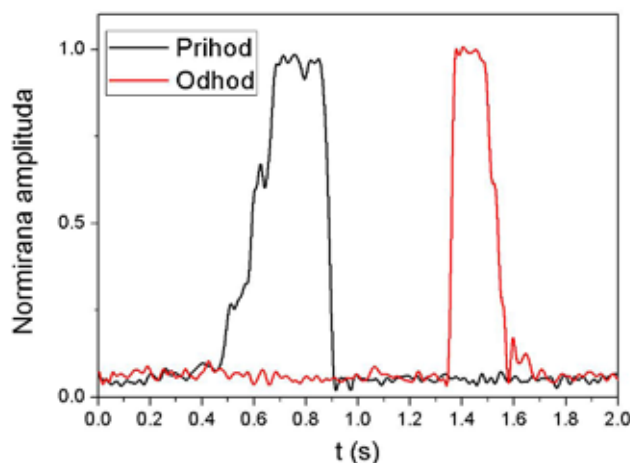
frekvenca, ki jo navajamo v protokolu, velja za *B. pascuorum* (za vrste, ki imajo drugačne osnovne frekvence, glej tudi Gradišek s sod. (2017), se vrednosti nekoliko prilagodijo). Postopek za zaznavanje posameznih dogodkov je sledeč:

1. Celoten posnetek razrežemo na segmente, ki so dolgi 5 sekund. Segment te dolžine je načeloma dovolj dolg, da pokrije celoten dogodek, hkrati pa dovolj kratek, da vsebuje samo enega.
2. Za vsak segment izračunamo Fourierovo transformacijo signala, ki nam signal iz časovne domene pretvori v frekvenčno (spekter).
3. Za vsak segment izračunamo sedem značilnk, na podlagi katerih se odločimo, če segment vsebuje brenčanje ali ne. Vsaka značilnka ima dva možna izhoda (da ali ne).
 - a. Izračunamo povprečno amplitudo v segmentu. Če je amplituda večja od določene meje (=da), gre lahko za možen dogodek.
 - b. Osnovna frekvenca brenčanja je okrog 180 Hz. Poiščemo število vrhov v območju med 160 in 200 Hz (prisotnost vrha pri ustrezni frekvenci, število mora biti manjše od določene vrednosti, v nasprotnem primeru gre za šum).
 - c. Poračunamo razmerje povprečnih amplitud na intervalih okrog vrha (160-200 Hz) ter izven območja vrha (60-120 Hz), razmerje mora biti večje od določene vrednosti. S tem preverimo, da gre dejansko za vrh na pravem mestu in ne za šum v signalu.
 - d. Ponovimo zgornje še za interval nad pričakovanim vrhom, v območju 220-280 Hz.
 - e. Podobno kot v koraku b, pogledamo, če imamo prisoten vrh pri dvakratniku osnovne frekvence f (višja harmonska frekvenca), gledamo na intervalu ($2*f-20$ Hz, $2*f+20$ Hz).
 - f,g. Ponovimo koraka c in d, le da pri frekvenci višjega harmonika (in ustrezno višjih vrednostih intervalov).

Če pet ali več značilnk ustreza kriterijem, se odločimo, da segment vsebuje zvok brenčanja med letom. Tudi meja pet ali več značilnk je bila določena na podlagi serije ročno označenih posnetkov, tako da je bila natančnost detekcije najvišja.

Ko zaznamo let čmrlja mimo mikrofona, lahko ugotovimo tudi, če je čmrlj odletel iz panja ali se je vanj vrnil. Slika 1 (v časovni domeni) prikazuje oba dogodka. Vidimo lahko, da sta navidezno simetrična, kar odslkava dinamiko procesa. Ko čmrlj odleti iz panja, je najprej blizu mikrofona, nato pa se oddalji od njega. Amplituda signala je tako najprej visoka, potem pa pade. Pri vračanju v panj je čmrlj

najprej oddaljen od mikrofona, potem pa se mu približa. Med samim sprehajanjem okrog vhoda čmrlj ne brenči. Za ločevanje prihodov in odhodov moramo tako z algoritmom ugotoviti le, na kateri strani od maksimuma signal pade hitro in na kateri strani počasi.

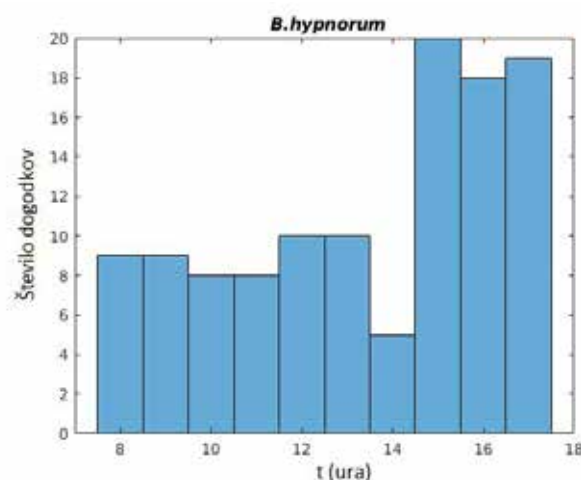
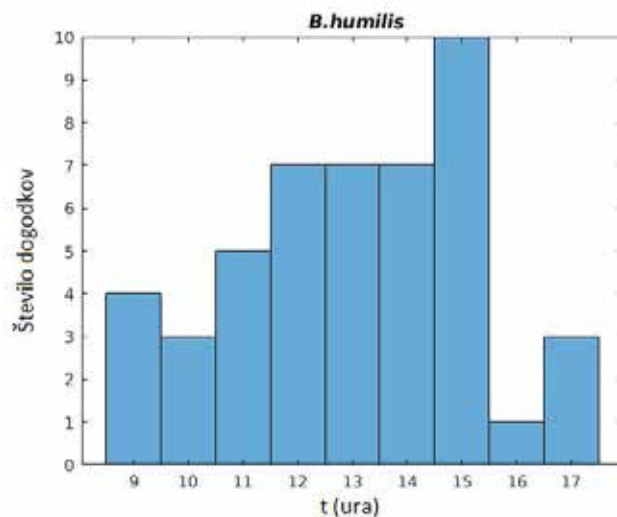
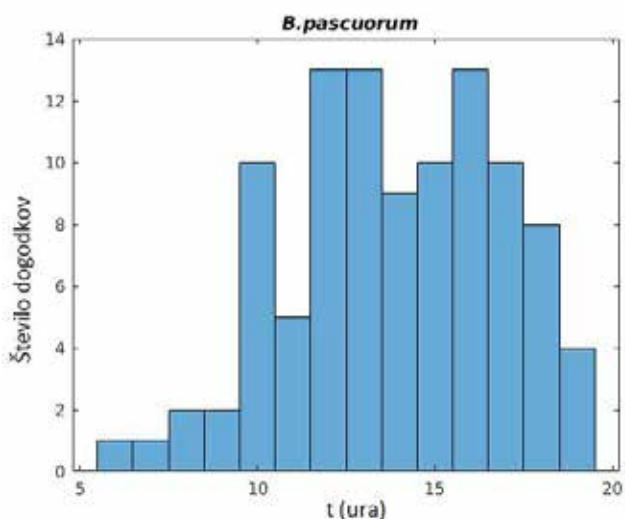


Slika 1: Ovojnica zvočnega signala pri prihodu čmrlja v panj (levo, črna) in pri odhodu (desno, rdeča).

REZULTATI IN DISKUSIJA

Na Sliki 2 so prikazani histogrami odhodov čmrljev na pašo tekom izbranega dneva, po urah.

Na posnetkih *B. pascuorum* smo dogodke prešteli še ročno (podrobno smo pregledali vsak segment, ki je imel dovolj veliko amplitudo in s poslušanjem določili, ali je šlo za dogodek ali za šum), da smo dobili oceno o natančnosti algoritma. Od 180 dejanskih dogodkov (prihodov in odhodov skupaj, P) smo jih z algoritmom zaznali 171 (true positive, TP), pri 9 zaznanih dogodkih v resnici ni šlo za brenčanje (false positive, FP), 9 dogodkov pa algoritem ni zaznal (false negative, FN). Tako lahko določimo občutljivost (sensitivity), $TP/P = TP/(TP+FN) = 0,95$. Preciznost je v našem primeru $TP/(TP+FP) = 0,95$. Seveda gre tu za oceno na enem dnevu posnetkov, občutljivost in preciznost sta pri različnih vrstah in pogojih (zunanji šumi itd.) lahko drugačna.



Slika 2: Histogrami dnevne aktivnosti ob izbranem dnevu za družine čmrljev *B. pascuorum*, *B. humilis* in *B. hypnorum* (prikazani so odhodi, histogrami za prihode so zelo podobni).

Dobljeni histogrami kažejo, da nam analiza posnetkov lahko da primerljivo dober vpogled v dnevno dinamiko čmrlje družine kot ročno štetje (Grad s sod., 2016). Posamezne vrste imajo glede na histograme različne dnevne navade. Delavke *B. pascuorum* so bile na izbrani dan bolj aktivne v osrednjem delu dneva, prav tako *B. humilis*, delavke *B. hypnorum* pa so raje izletavale v popoldanskem času. Izpostaviti velja, da je 29. maja 2018 po šesti popoldne začelo močno deževati, zato so bili mikrofoni prej pospravljeni. Rahel dež okrog četrte ure popoldne je povzročil, da je pri *B. humilis* izletela le ena delavka, pri *B. hypnorum* pa dež, kot kaže, ni znatno vplival na obnašanje. Zanimivo je tudi primerjati maksimalno število dnevnih izhodov v primerjavi z velikostjo družine. Pri *B. pascuorum* z okrog 10 delavkami imamo ob vrhuncu do 13 izhodov na uro, kar pomeni, da so nekatere delavke izletele več kot enkrat. Pri drugih dveh vrstah je maksimalno število izletov manjše kot je bilo v družini delavk. Morda je vzrok za manj izhodov slabše vreme kot dan pred tem.

V nadaljnjih raziskavah bo zanimivo primerjati tudi posamezne dogodke znotraj iste družine čmrljev. Ob različnih vremenskih pogojih in tudi znotraj posameznega dneva

zunanja temperatura lahko znatno niha. Ko se čmrlj vrne v gnezdo, ima letalne mišice predvidoma ogrete na optimalno temperaturo za letenje, ob izhodu pa verjetno potrebuje nekaj časa, da se ogreje. Ta pojav bo zanimivo preučiti tudi s stališča zvoka.

ZAKLJUČEK

V prispevku smo pokazali, da lahko z analizo zvočnih posnetkov s posebnim algoritmom spremljamo dnevno dinamiko pašne dejavnosti čmrljev brez ročnega štetja prihodov in odhodov. Predstavili smo dinamiko za tri različne vrste, vsako družino smo spremljali en dan. V nadaljevanju bo zanimivo opazovati dnevno dinamiko za posame-

zne vrste v odvisnosti od različnih parametrov, kot so vremenski pogoji, obdobja cvetenja posameznih medonosnih rastlin, ter seveda razvojne faze, v kateri se družina nahaja v danem trenutku. Študija odpira tudi vrsto zanimivih raziskovalnih vprašanj povezanih s strukturo zvoka brenčanja ob vzletanju in pristajanju.

ZAHVALA

Raziskava poteka tudi v okviru projekta National Geographic, Grant #NGS-282T-18.

LITERATURA

- Grad, J., Gradišek, A., Gams, M., Čmrlji: pašna dejavnost in zvok brenčanja, Poklukarjevi dnevi 2016, zbornik prispevkov.
- Gradišek, A., Slapničar, G., Šorn, J., Luštrek, M., Gams, M. and Grad, J. 2016: Predicting species identity of bumblebees through analysis of flight buzzing sounds. *Bioacoustics*, 26 (1), 63-76
- Heise, D., Miller-Struttman, N., Galen, C., Schul, J. 2017: Acoustic Detection of Bees in the Field Using CASA with Focal Templates, 2017 IEEE Sensors Applications Symposium (SAS), Glassboro, NJ, pp. 1-5.



RAZUMEVANJE POMENA OPRAŠEVANJA IN PESTROSTI OPRAŠEVALCEV

Danilo BEVK¹, Martina FURLANI

Izvleček

Opraševanje je pomembna ekosistemska storitev. Poleg medonosne čebele (*Apis mellifera*), so pomembni tudi divji opraševalci (divje čebele, muhe trepetavke, metulji...), katerih vloga je bila prepoznana šele zadnjem času in je zato javnosti manj znana. V pričujoči raziskavi smo ocenili razumevanje pomena opraševanja in pestrosti opraševalcev v osnovni šoli in splošni javnosti. Podatke smo pridobili s pomočjo vprašalnika, ki s ga izpolnili devetošolci in spletnega vprašalnika za splošno javnost. Gre za prvo tovrstno raziskavo v Sloveniji. Ugotovili smo, da je zavedanje o pomenu opraševalcev in njihovi pestrosti pri devetošolcih in v splošni javnosti podobno. Obe ciljni skupini se zavedata pomena opraševanja in posledic izginjanja opraševalcev, slabše pa je bilo poznavanje pestrosti opraševalcev in njihove biologije.

Ključne besede: opraševanje, medonosna čebela, čmrliji, čebele samotarke, divji opraševalci

UNDERSTANDING OF THE IMPORTANCE OF POLLINATION AND POLLINATOR DIVERSITY

Abstract

Pollination is an important ecosystem service. In addition to honey bees (*Apis mellifera*), wild pollinators (wild bees, hoverflies, butterflies ...) are also important, but their role has been recognized only recently, so it is not yet well-known to the public. In the present study, we made an assessment of the understanding of the importance of pollination and the diversity of pollinators in primary school pupils and the general public. The raw data were obtained by a questionnaire completed by pupils of the 9th grade of elementary school and an online questionnaire for the general public. This research is the first survey on understanding the importance of pollination and pollinator diversity in Slovenia. We have found that the awareness of the importance of pollination and the pollinator diversity in the elementary school and the general public was similar. Both target groups were aware of the importance of pollination as well as of the consequences of the disappearance of pollinators. The knowledge about diversity and biology of pollinators was worse.

Key words: Pollination, honeybee, bumblebees, solitary bees, wild pollinators

¹ Dr., Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, danilo.bevk@nib.si

UVOD

Opraševanje je pomembna ekosistemska storitev, pomembna tako za delovanje naravnih kot kmetijskih ekosistemov. Opraševalci ne vplivajo samo na količino, ampak tudi na kakovost pridelka (Hoehn in sod., 2008; Garratt in sod. 2014) ter na kakovost prehrane in zdravja ljudi (Smith in sod., 2015). Vrednost opraševanja za kmetijstvo je ocenjena na 235-577 dolarjev letno (IPBS, 2016).

Za najpomembnejšega opraševalca velja medonosna čebela (*Apis mellifera*), vendar pa v zadnjem času ugotavljajo, da je zelo pomembna in nepogrešljiva tudi vloga divjih opraševalcev. Ti so v mnogih primerih celo bolj učinkoviti. Vse bolj jasno je, da je za zanesljivo opraševanje in ohranjanje biodiverzitete ključnega pomena ohranjanje pestrosti opraševalcev (Garibaldi in sod., 2011, 2013; Winfree in sod., 2007).

Med divjimi opraševalci so najpomembnejše divje čebele, torej čmrlji in čebele samotarke. Doslej je bilo v Sloveniji najdenih 563 vrst (Gogala, 2014). Oprašujejo tudi muhe (de Groot in Bevk, 2012; Orford in sod., 2015) in metulji, v manjši meri tudi druge žuželke, npr. nekateri hrošči in ose (Martins, 2014).

Zaradi sprememb v okolju, ki jih je povzročil človek, število in raznolikost opraševalcev hitro upada, zato ponekod že opažajo pomanjkljivo opraševanje (Breeze in sod., 2014). Opraševalce ogrožajo zlasti intenzivno kmetijstvo, urbanizacija, podnebne spremembe in bolezni. Kar 9,2 % čebel v Evropi grozi izumrtje. Pri čmrljih, ki so najbolj raziskani, v Evropi izumrtje grozi 23,6 % vrstam čmrljev, populacije pa upadajo pri 45,6 % vrstah (Nieto in sod. 2014).

V Sloveniji, ki se ponaša z dolgo čebelarstvo tradicijo in velikim številom čebelarjev, se je razvil poseben odnos do mednosne čebele. To že na daleč izkazujejo okrašeni čebelnjaki s poslikanimi panjskimi končnicami. Poseben status čebele se vidi tudi v slovenskem jeziku, kjer za čebelo rečemo, da kot edina žival ne pogine ampak umre, tako kot človek. Čebela je tudi zgled marljivosti (Bevk, 2013).

Medonosni (kranjski) čebeli je namenjene tudi veliko medijske pozornosti, in sicer predvsem v zvezi z umiranjem čebel zaradi zastrupitev s pesticidi, čebeljimi pridelki, medenim oziroma tradicionalnim slovenskim zajtrkom v šolah, spodbujanjem sajenja medovitih rastlin, v zadnjem času pa tudi v zvezi s svetovnim dnevom čebel. Poseben status čebeli dodeljuje tudi Resolucija o zaščiti kranjske čebele, kjer je poudarjen tudi njen pomen pri opraševanju in ohranjanju biodiverzitete (Resolucija o zaščiti Kranjske čebele, 2013).

Divjim opraševalcem je po naših izkušnjah namenjene veliko manj medijske in siceršnje pozornosti. Nekaterim med njimi, npr. čmrljem, se v ljudski predstavi pripisuje celo negativne lastnosti, npr. lenobo. Njihov pomen se v medijih izpostavlja šele v zadnjem času, vendar precej manj kot pomen medonosne čebele. Z raziskavo smo zato želeli ugotoviti razumevanje pomena opraševanja in pestrosti opraševalcev pri učencih v 9. razredu osnovne šole in v splošni javnosti.

MATERIAL IN METODE

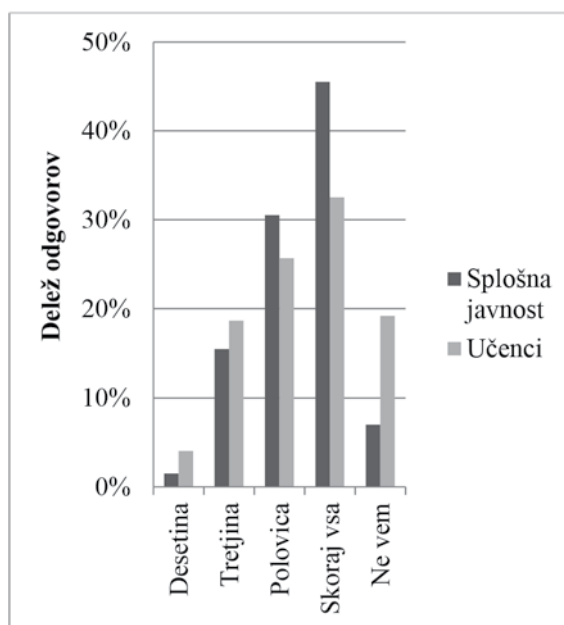
Raziskavo smo opravili s pomočjo vprašalnika v letu 2016 in sicer v dveh ciljnih skupinah, pri učencih 9. razreda osnovne šole in odraslih (splošna javnost). Učenci so izpolnili vprašalnik vpisni obliki, odrasli pa spletni vprašalnik.

Z vprašalnikom smo preverjali poznavanje pomena opraševanja in opraševalcev, poznavanje njihove pestrosti ter vzrokov za njihovo ogroženost. Zanimale so nas tudi izkušnje anketirancev z opraševalci. Vprašanja so bila različnih tipov: izbirnega tipa s po enim odgovorom ali več odgovori, vprašanja razvrščanja postavk po pomembnosti ter vprašanja tipa drži-ne drži.

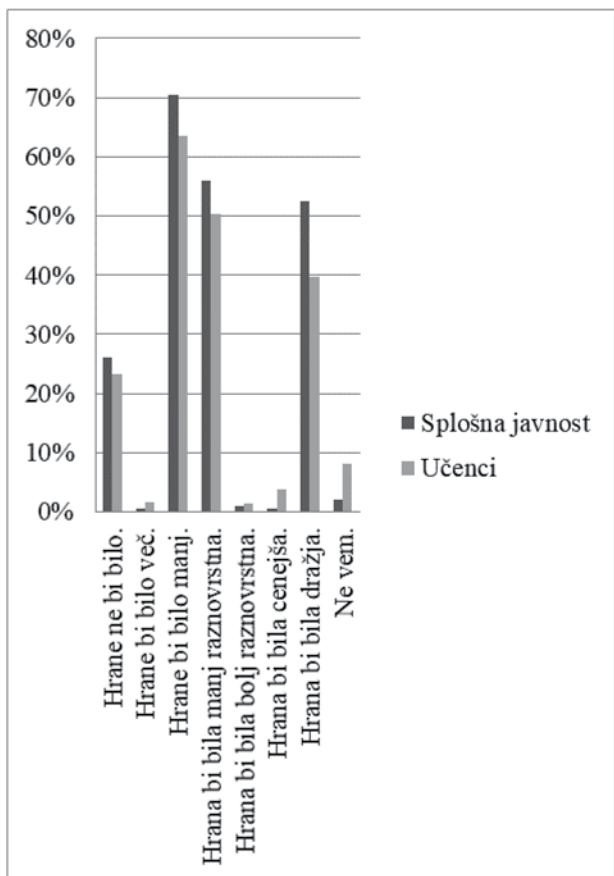
REZULTATI Z RAZPRAVO

V raziskavi smo skupaj zajeli 568 učencev in 200 odraslih prebivalcev Slovenije.

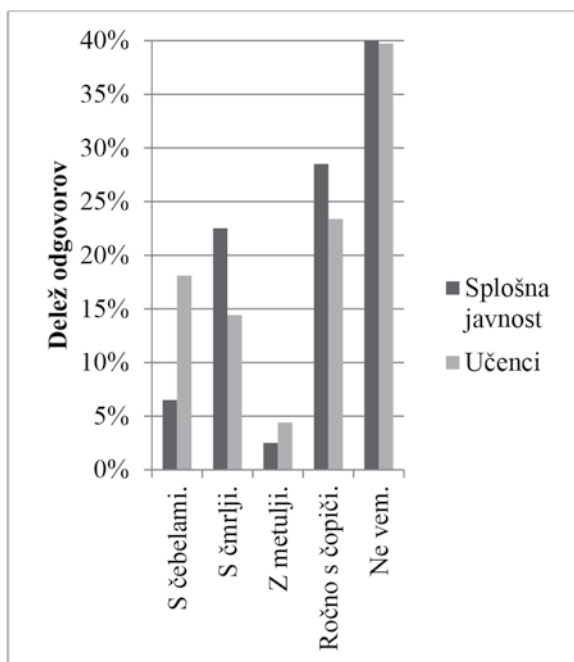
Vprašani se zavedajo pomena opraševanja in opraševalcev. Pri prvem vprašanju (pravilen odgovor ena tretjina) je večina sodelujočih pomen opraševanja za pridelavo hrane celo precenila (slika 1), kar smo pričakovali. Zavedajo se tudi posledic, kaj bi se zgodilo, če bi opraševalci izgini- li (slika 2). Pravilni odgovori so bili: hrane bi bilo manj, bila bi manj raznovrstna in dražja. Večina vprašanih je posledice pravilno predvidela. Dobra desetina je menila, da hrane ne bi bilo. Preverili smo tudi, ali vprašani vedo, da paradižnik v rastlinjaki oprašujejo čmrlji. Pravilno je odgovorila samo približno petina vprašanih (slika 3).



Slika 1: Odgovori na vprašanje, koliko človeške prehrane je odvisne od opraševanja žuželk.

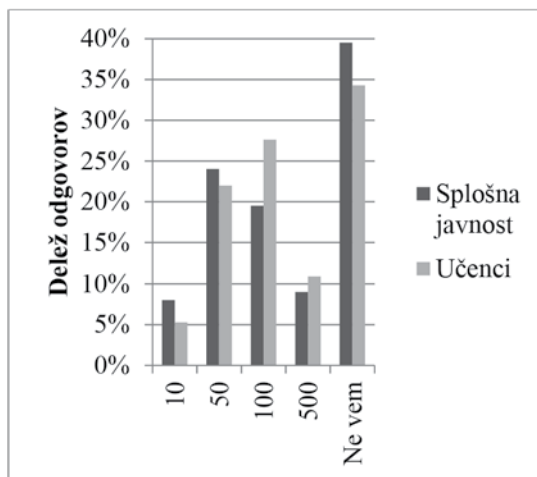


Slika 2: Odgovori na vprašanje, kaj bi se zgodilo s človeško prehrano, če ne bi bilo opravevalcev.



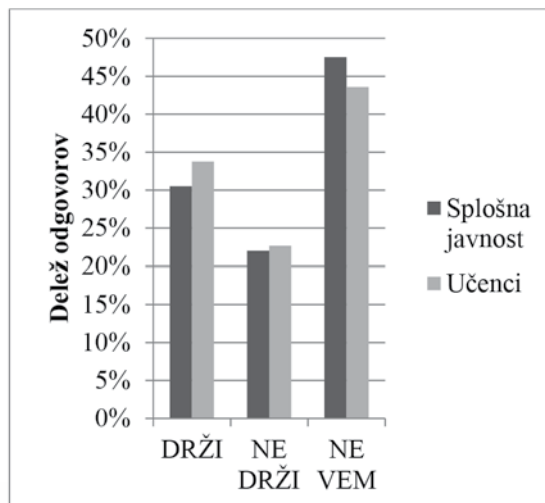
Slika 3: Odgovori na vprašanje, kako v velikih rastlinjarkah opravičujejo paradižnik.

Večina ljudi se ne zaveda pestrosti čebel (slika 4). Največ vprašanih nima predstave o številu vrst v Sloveniji. Preostali so najpogosteje izbrali odgovor 100 oziroma 50 vrst, pravilno (500) pa je odgovorila le desetina vprašanih.

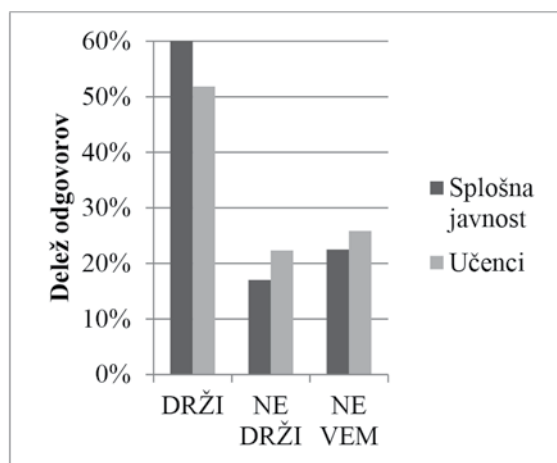


Slika 4: Odgovori na vprašanje, koliko vrst čebel (čmrljev, čebel samotark...) je bilo doslej najdenih v Sloveniji.

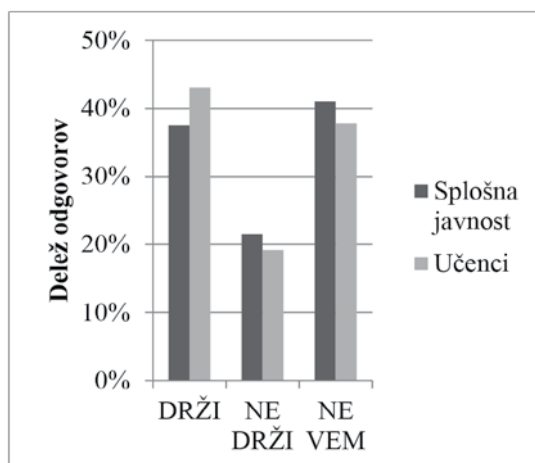
Življenje čmrljev in njihove posebnosti večina ljudi slabo pozna. Večina se ni znala opredeliti, ali čmrlji živijo v podobnih družinah kot kranjska čebela, le da so manjše in kratkotrajne (slika 5). Odgovor je vedela le tretjina. Več kot polovica vprašanih napačno meni, da so čmrlji počasnejši kot kranjska čebela (slika 6). Zanimivo, da se večina pravilno ni strinjala s trditvijo, da je čmrljev pomladi malo in zato ne morejo opravičiti veliko rastlin (slika 7). To je namreč pogost pomislek o čmrljih kot opravevalcih, ki pa ne upošteva njihove večje učinkovitosti in dejavnosti tudi v slabem vremenu. Da čmrlji lahko letijo tudi pri nižjih temperaturah, je vedela le tretjina vprašanih (slika 8), nekoliko več pa se jih je strinjalo, da čmrlji cvet stresejo, kar izboljša opravičitev (slika 9). Samo petina je vedela oziroma se je strinjala s trditvijo, da so čmrlji boljši prenašalci cvetnega prahu (slika 10).



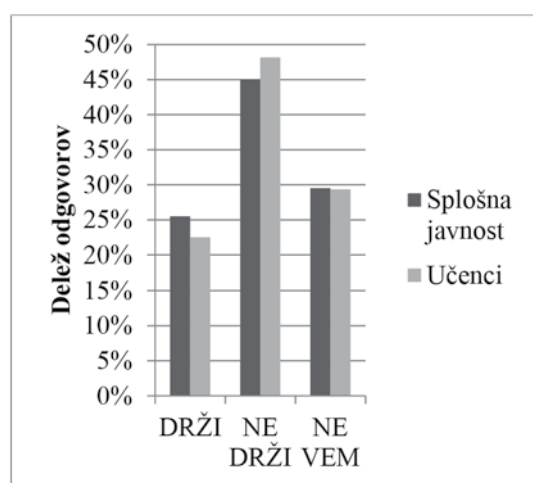
Slika 5: Odgovori na trditev, da čmrlji živijo v podobnih družinah kot kranjska čebela, le da so njihove družine manjše in trajajo le nekaj mesecev.



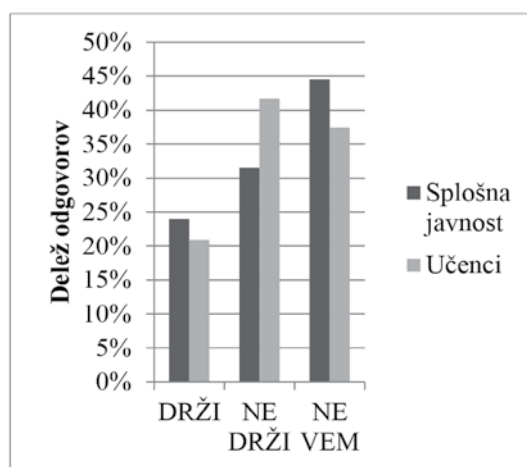
Slika 6: Odgovori na trditev, da so čmrlji počasnejši kot kranjska čebela.



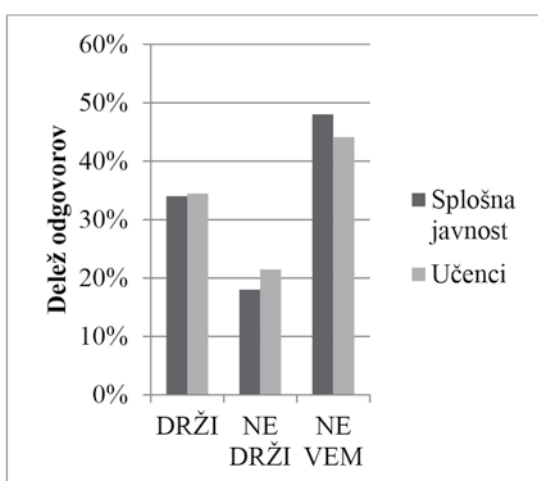
Slika 9: Odgovori na trditev, da čmrlji cvet močno stresajo, zato je oprășitev še boljša.



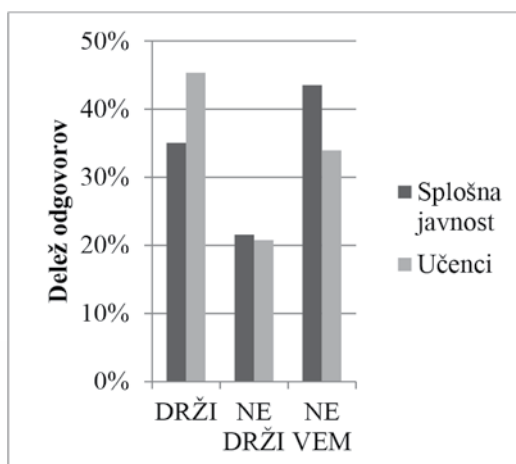
Slika 7: Odgovori na trditev, da je čmrljev pomladi zelo malo, zato ne morejo oprășiti veliko rastlin.



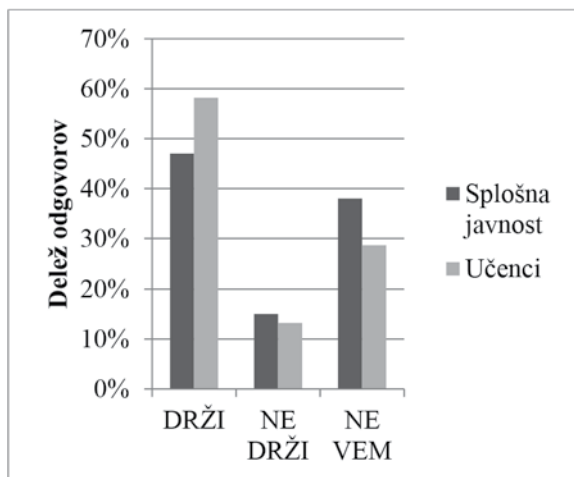
Slika 10: Odgovori na trditev, da so čmrlji boljši prenašalci cvetnega prahu kot kranjska čebela.



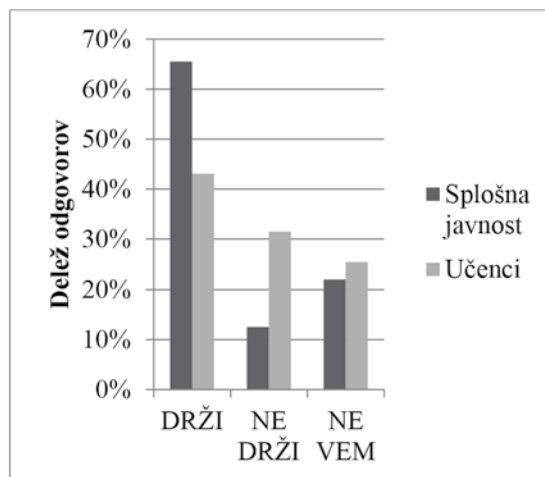
Slika 8: Odgovori na trditev, da čmrlji lahko letajo pri nižjih temperaturah kot kranjska čebela.



Slika 11: Odgovori na trditev, da so čebele samotarke dobile ime zato, ker vsaka samica sama skrbi za svoj zarod.

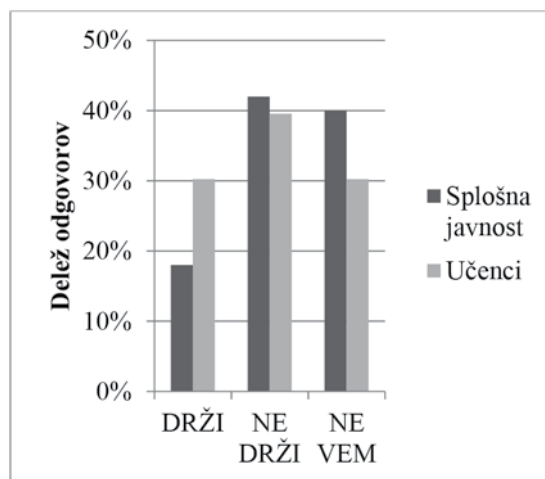


Slika 12: Odgovori na trditev, da čebele samotarke svoja gnezda branijo s piki.



Slika 13: Odgovori na trditev, da divji oprasevalci živijo tudi v mestih.

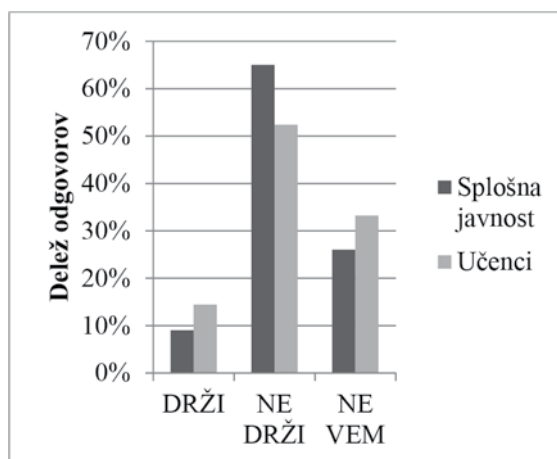
Anketirani so morali po pomembnosti razvrstiti pet dejavnikov ogrožanja oprasevalcev (preglednica 1). Odrasli so kot glavna dejavnika ogrožanja videli intenzivno kmetijstvo in bolezni, učenci pa širjenje mest in intenzivno kmetijstvo. Da divji oprasevalci ne živijo v mestih meni kar tretjina devetošolcev (slika 13), kar je nekoliko presežljivo. Večina vprašanih napačno meni, da je kranjska čebela ogrožena bolj kot divji oprasevalci (slika 14). To je bilo pričakovano in verjetno izhaja iz večje medijske izpostavljenosti ogroženosti čebele. V nasprotju s pričakovanji se več kot polovica ni strinjala z (napačno) trditvijo, da so čmrlji zaradi velikosti manj občutljivi na pesticide (slika 15). Za zagotovitev zanesljivega oprasevanja v prihodnosti večina meni, da je treba ohraniti pestrost oprasevalcev, četrtnina pa meni, da je dovolj že, če ohranimo kranjsko čebelo (slika 16).



Slika 14: Odgovori na trditev, da so divji oprasevalci bolj ogroženi kot kranjska čebela.

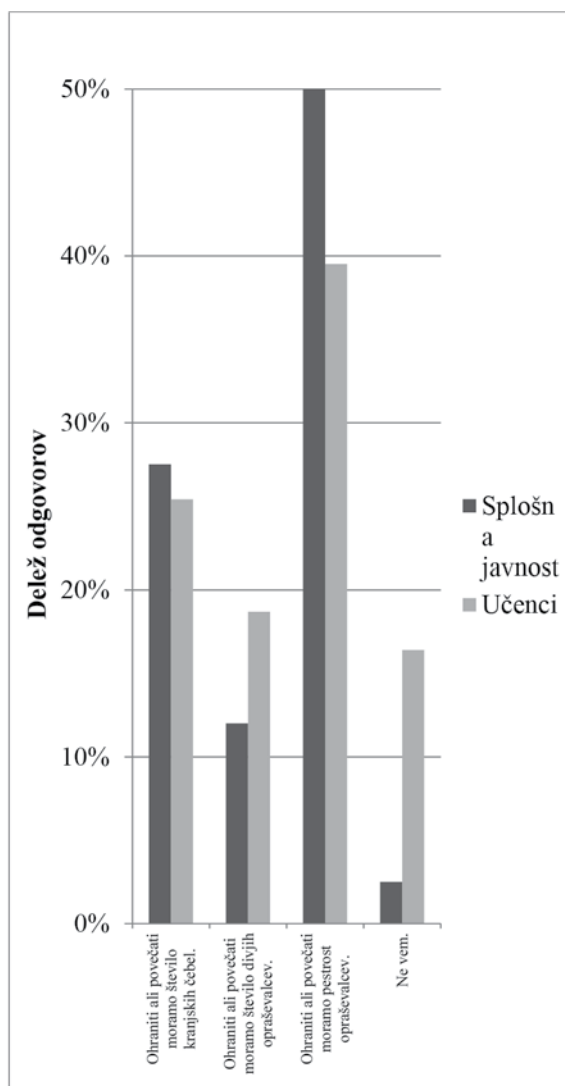
Preglednica 1: Odgovori na vprašanja, kaj najbolj ogroža oprasevalce (1 – najbolj, 5- najmanj).

	Splošna javnost	Učenci
1	Intenzivno kmetijstvo	Širjenje mest
2	Bolezni	Intenzivno kmetijstvo
3	Podnebne spremembe	Podnebne spremembe
4	Širjenje mest	Bolezni
5	Uvažanje čmrljev	Uvažanje čmrljev



Slika 15: Odgovori na trditev, da ker so čmrlji večji, jim pesticidi manj škodijo.

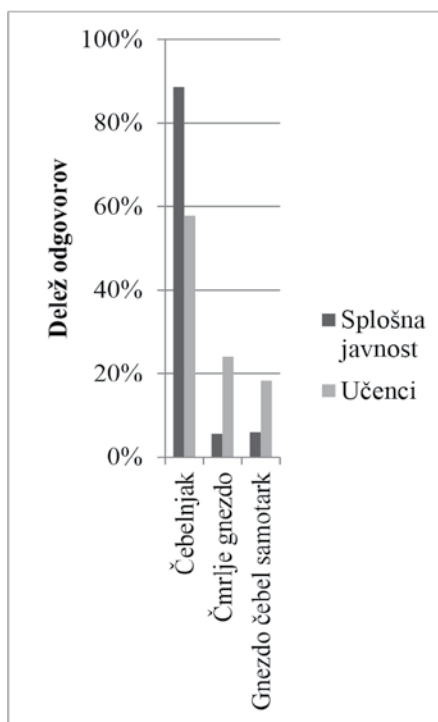




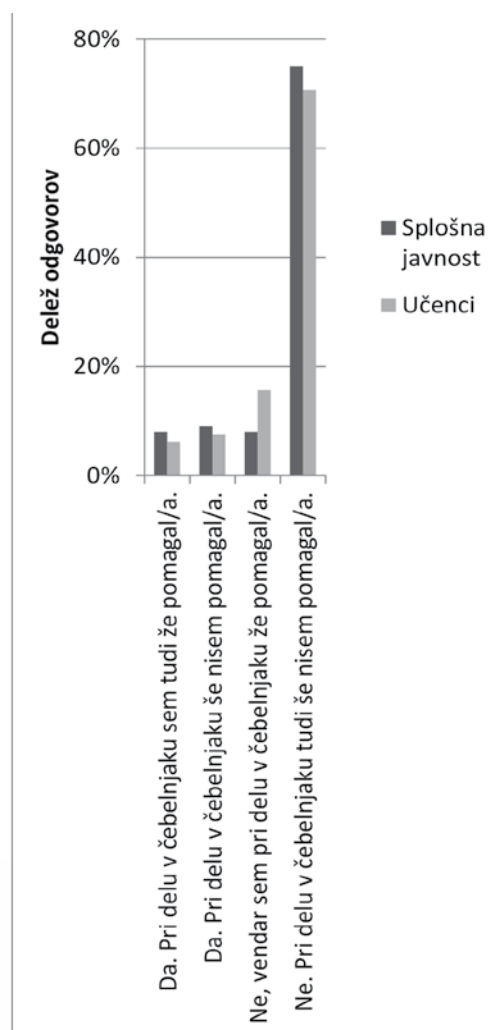
Slika 16: Odgovori na vprašanje, kaj je po vašem mnenju najpomembnejše, da zagotovimo zadovoljivo oprasovanje v prihodnosti.

V zadnjem sklopu vprašanja smo preverjali osebne izkušnje z oprasovalci in odnos do njih. Čebelnjak je videla večina odraslih in samo polovica devetošolcev (slika 17). Gnezdo čmrljev in čebel samotark je videlo veliko manj vprašanih, a gnezdo čmrljev še vedno presenetljivo veliko otrok. Večina vprašanih doma ali v družini nima čebelarja (slika 18). Kljub temu je precej otrok, v čebelnjaku že pomagalo, kar je verjetno rezultat šolskih aktivnosti. Kako od gnezdišč za divje oprasovalce ima le približno desetina vprašanih, razveseljuje je, da je odstotek višji pri otrocih (slika 19).

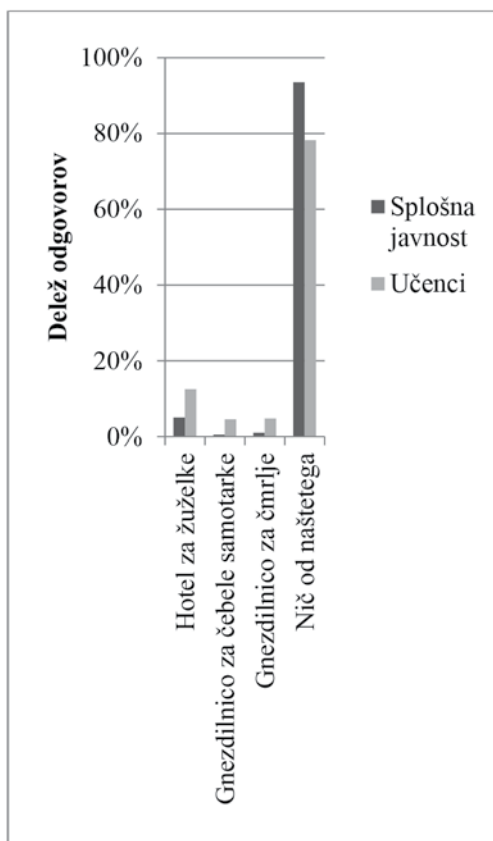
Z zadnjim vprašanjem smo preverili strah do medonosne čebele, čmrljev in čebele samotark (slika 20). Razveseljuje je, da je večina vprašanih menila, da našteje žuželke niso nevarne, vendar je delež otrok s takim mnenjem bistveno manjši. Kar četrtini otrok se čmrlji in čebele samotarke zdijo nevarne, kar je celo več kot pri kranjski čebeli. Strah verjetno izhaja iz slabega poznavanja teh žuželk.



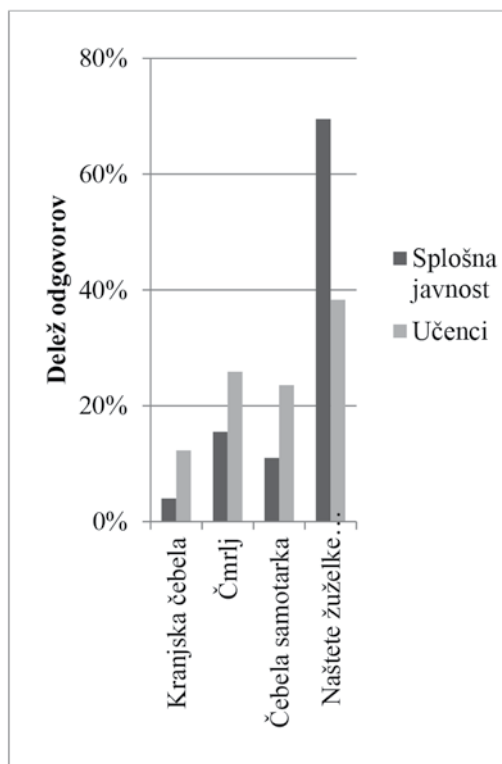
Slika 17: Odgovori na vprašanje, kaj od naštetega ste že videli.



Slika 18: Odgovori na vprašanje, ali imate v družini čebelarja.



Slika 19: Odgovori na vprašanje, ali imate doma kaj od naštetega.



Slika 20: Odgovori na vprašanje, katere od naštetih žuželk se vam zdijo nevarne in se jih zato bojite.

ZAKLJUČKI

Zaključimo lahko, da se tako odrasli kot učenci dobro zavedajo pomena opravevalcev in opravevanja, slabše pa je poznavanje pestrosti opravevalcev in biologije čmrlejev in

čebel samotark. Ker gre za prvo tovrstno raziskavo v Sloveniji, so rezultati pomembni za ustrezno komunikacijo z javnostjo na to temo.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se vsem sodelujočim v raziskavi, še posebej učiteljem, ki so omogočili izvedbo raziskave v šolah. Raziskava je financirana iz sredstev Programske skupine P1-0255 in projekta CRP V4-1622 (Pomen divjih opravevalcev pri opravevanju kmetijskih rastlin in trajnostno

upravljanje v kmetijstvu za zagotovitev zanesljivega opravevanja), ki ju financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.

LITERATURA

- Bevk, D. (2013). Čebele: včeraj, danes, jutri. *Gea*, 23, 20-33.
- Breeze, T. D. in sod. (2014). Agricultural policies exacerbate honeybee pollination service supply-demand mismatches across Europe. *PLoS ONE* 9(1): doi:10.1371/journal.pone.0082996
- De Groot, M., Bevk, D. (2012). Ecosystem services in phenology of hoverflies (Diptera: Syrphidae) in a Slovenian forest stand. Research gate.
- Garibaldi, L. A. in sod. (2013). Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 339, 1608. DOI: 10.1126/science.1230200.
- Garibaldi, L. A. in sod. (2011). Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honey bee visits. *Ecology letters*, 14, 1062-1072. doi: 10.1111/j.1461-0248.2011.01669.x
- Garratt, M. P. D., Breeze, T. D., Jenner, N., Biesmeijer, J. C., Potts, S.G. (2014). Avoiding a bad apple: Insect pollination enhances fruit quality and economic value. *Agriculture, Ecosystem and environment*, 184, 34-40.
- Gogala, A. (2014) Čebele Slovenije. Ljubljana: Založba ZRC, ZRC SAZU
- Hoehn, P., Tschardtke, T., Tylianakis, J. M., Steffan-Dewenter, I. (2008). Functional group diversity of bee pollinators increases crop yield. *Proceedings of the royal society*, 275, 2283-2291.
- IPBES. 2016. The assessment report on pollinators, pollination and food production: Summary for policymakers. Potts S. G., Imperatriz-Fonseca V. L., Ngo H. T., Biesmeijer J. C., Breeze T. D., Dicks L. V., Garibaldi L. A., Hill R., Settele J., Vanbergen A. J., Aizen M. A., Cunningham S. A., Eardley C., Freitas B. M., Gallai N., Kevan P. G., Kovács-Hostyánszki A., Kwapong P. K., Li J., Li X., Martins D. J., Nates-Parra G., Pettis J. S., Rader R., V.B. F. (ur.). Bonn, Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services: 36 str.
- Martins, D. J. (2014). Our friends the pollinators. Nature Kenya, the East Africa natural history society. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
- MojaAnketa. Pridobljeno s: <http://www.mojaanketa.si/>
- Nieto, A. in sod. (2014). European red list of bees. Luxembourg: Publication Office of the European Union.
- Orford, K. A., Vaughan, I. P., Memmott, J. (2015). The forgotten flies: the importance of non-syrphid Diptera as pollinators. *Royal society publishing*, 282: 20142934. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.2934>
- Senapathi, D. in sod. (2015). The impact of over 80 years of land cover changes on bee and wasp pollinator communities in England. *Proceedings royal society publishing*, 282: 20150294. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.0294>
- Smith, M. R., Singh, G. M., Mozaffarian, D., Myers, S. S. (2015). Effects of decreases of animal pollinators on human nutrition and global health: modelling analysis. *Lancet* 386, 1964-72. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61085-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61085-6)
- Resolucija o zaščiti Kranjske čebele. (2013). Uradni list republike Slovenije, št. 92/07
- Vilhar, B. in sod. (2011). Učni načrt. Program osnovna šola. Biologija. Ljubljana: Ministrstvo za šolstvo in šport, Zavod RS za šolstvo.
- Winfree, R., Williams, N. M., Gaines, H., Ascher, J. S., Kremen, C. (2008). Wild bee pollinators provide the majority of crop visitation across land-use gradient in New jersey and pennsylvania, USA. *Journal of applied ecology*, 45, 793-802. doi: 10.1111/j.1365-2664.2007.01418.x



VPELJAVA LASTNOSTI ODPORNOSTI PROTI VAROJAM V LOKALNI REJSKI PROGRAM ZA *Apis mellifera ligustica*

COSTA C.¹, MARZI G.

Izveček

Vzreja čebeljih matic ima v Italiji, še posebno pa v deželi Emilija – Romanja, dolgoletno tradicijo. Lastnosti, pomembne za odpornost na varoje, običajno niso bile upoštevane pri odbiri in testiranju družin. Projekt se je začel leta 2014 s čebeljimi družinami lokalnih vzrejevalcev. Lastnosti, pomembne pri odpornosti na varojo so čistilno vedenje (ocenjevano s »pin-testom«), obremenjenost z varojo (naravni odpad varoj in število varoj na odraslih čebelah) ter zaviranje razmnoževanja pršic (SMR; primerjava razvojnega stanja potomstva varoj glede na razvojno stanje bube). Pri odbiri smo upoštevali že uveljavljene lastnosti, kot sta medonosnost in mirnost. Parjenje je nadzorovano na plemenilni postaji, vzpostavljeni za ta namen v gorski dolini. Od leta 2015 vzredimo po 100 matic vsako leto. Pred parjenjem zagotovimo, da so matičarji in trotarji rasno čiste družine *Apis mellifera ligustica*. Plemenske vrednosti, ocenjene z BLUP modelom (www.beebreed.eu), kažejo izboljšanje odpornosti na varojo od generacije P (starševska generacija; PV = 99.8%; N=30) do F2 generacije (PV = 102.3; N=39). V najboljših družinah smo ocenili lastnost zaviranja razmnoževanja pršic po protokolu RNSBB (Research Network for Sustainable Bee Breeding). V 24 družinah (11 v 2016 in 13 v 2017) smo pregledali 5362 celic. Rezultati so bili zelo variabilni, povprečni odstotek pršic, ki se niso razmnoževale, je bil 45 % (21 % min, 84 % maks) v 2016 in 51 % (25 % min in 81 % maks) v letu 2017. Naša raziskava je pokazala, da sta SMR in čistilno vedenje v pozitivni korelaciji, s čimer smo potrdili prejšnje študije. Ponovno pokrivanje zalege je bilo pogostejše v napadenih celicah (33 %) kot v nenapadenih celicah (14 %), medtem ko odnos med SMR in ponovnim pokrivanjem zalege ni izrazit. Na delavnicah v projektu sodelujejo lokalni vzrejevalci, ki iz družin z najboljšo čistilno sposobnostjo vzrejajo mlade matice in jih prašijo na plemenilni postaji. S tem prispevajo k širjenju izboljšane odpornosti proti varojam v lokalnem okolju.

Ključne besede: *Varroa destructor*, odpornost na varoje, vzreja matic, zaviranje razmnoževanja pršic

INTRODUCING MEASUREMENT OF VARROA RESISTANCE TRAITS IN A LOCAL BREEDING PROGRAMME FOR *Apis mellifera ligustica*

Abstract

Italy and especially the region Emilia Romagna have a long tradition in honey bee queen breeding. Traits for varroa resistance however are not routinely included in the testing and selection activities. The aim of this project was thus to introduce testing for varroa resistance traits in colony evaluation procedures. The project started in 2014 with stock from local queen breeders. Traits for varroa resistance are hygienic behaviour (measured with the Pin Test), varroa infestation levels (natural mite fall and infestation rate on adult bees) and suppression of mite reproduction (measured by analysing varroa progeny stage relative to honey bee pupa development). Traditional traits, honey production and gentleness are also considered. To ensure controlled mating between selected queens and drones, a mating station was established in a mountain valley. Starting in 2015, on average of 100 queen bees have been produced each year. Before reproduction, the selected colonies are analysed to ascertain they correspond to the autochthonous subspecies *Apis mellifera ligustica*. Breeding values calculated with BLUP Animal Model (on www.beebreed.eu) show an increase in Varroa Resistance from the P generation (BV= 99.8 %; N=30) to F2 (BV=102.3

¹ CREA-Agriculture and Environment Research Centre, cecilia.costa@crea.gov.it, tel. +39 0522 285532

%; N= 39). The best colonies have been analysed for screening of the suppression of mite reproduction trait (SMR), using the protocol developed by the Research Network for Sustainable Bee Breeding. A total of 5362 capped cells from 24 colonies were analysed, 11 in 2016 and 13 in 2017. A great variability was found, with average non-reproduction rate 45% (21% min, 84% max) in 2016 and 51% (25% min, 81% max) in 2017. Confirming previous studies, SMR was found to be positively correlated to hygienic behaviour. The recapping behaviour was also observed and found to be higher in infested cells (33%) than in non-infested cells (14%), while its relation to SMR was not so clear. Local beekeepers are being involved with training events, and their most hygienic colonies are used for production of virgin queens which are mated in the isolated station and then used in their operations, thus contributing to distribution of the resistance traits in the local environment.

Key words: *Varroa destructor*, varroa resistance traits, queen breeding, suppression of mite reproduction



IZOLACIJA DEDNINE IZ NEINVAZIVNIH BIOLOŠKIH VIROV PRI MATICAH KRANJSKE ČEBELE (*Apis mellifera carnica*)

MOŠKRIČ A.¹, MOLE K.², DOVČ P.³, PREŠERN J.¹

Izveček

Tudi v vzreji in selekciji čebel se postopoma razvijajo metode, ki vključujejo genotipizacijo in uporabo MAS (marker assisted selection = na markerje oprta selekcija). Za uspešno genotipizacijo je ključna zagotovitev zadostne količine DNA primerne čistosti in kakovosti iz informativnega biološkega vzorca. Neinvaziven odvzem bioloških vzorcev za izolacijo dednine matic je posebno atraktiven metodološki izziv. Ta omogoča pridobitev informacije o genotipu osebkov brez žrtvovanja osebkov in nimajo vpliva na dolgoživost. Kutikula žuželk je ekstracelularnega izvora in sama ne vsebuje celic, vendar pa posamezne epiteljske celice ob levitvi ostanejo pritrjene nanjo. Te celice predstavljajo potencialno uporaben vir dednine za nadaljnje študije. Levi bub matic dostopen neinvazivni vir dednega materiala. Predstavili bomo prve rezultate uspešnosti in primernosti izbranih metod za izolacijo DNA iz levov bub matic kot neinvazivnega vira biološkega materiala pri kranjski čebeli. Uspešna izolacija DNA iz levov bub matic omogoča genotipizacijo matic še pred parjenjem ter odbiro tistih matic, ki so nosilke genotipov, ki nas zanimajo. Razvoj in evalvacija primerne metode izolacije DNA iz neinvazivnih virov predstavlja pomemben korak pri vzreji in selekciji kranjske čebele s pomočjo genetskih markerjev.

Ključne besede: *Apis mellifera carnica*, kranjska čebela, izolacija DNA, levi, matica, PCR, COI, tRNA^{Leu}, neinvazivno vzorčenje, genetski markerji

ISOLATION OF GENOMIC DNA FROM NON-INVASIVE SAMPLES OF CARNIOLAN HONEY BEE QUEENS (*Apis mellifera carnica*)

Abstract

There is a growing interest for development and utilisation of methods that employ genotyping and take advantages of MAS (marker assisted selection) in honey bee selection. Biological source of DNA of appropriate purity and quality is most important parameter for successful genotypization. Non-invasive ways to obtain DNA of honey bee queens present attractive alternative since they do not require sacrifice of specimen and have no impact on individual longevity. Cuticle of insects is of extracellular origin and does not contain cells by itself. However, epithelial cells may remain attached to it as a consequence of moulding. These cells present potentially useful source of DNA for further studies. Exuviae of honey bee queen pupae are thus accessible source of genetic material. In this study we present first results of successful isolation of DNA from exuviae of honey bee queen pupae and amplification of two specific mitochondrial fragments from non-invasive (exuviae), semi-invasive (wing-clippings) and invasive (legs or antennae) sources. Successful isolation of DNA from exuviae of honey bee queen pupae may enable genotyping of honey bee queens before mating and selection of specific genotypes for further breeding. Development and evaluation of suitable method for DNA isolation from non-destructive biological sources presents important step in breeding and selection of Carniolan honey bee using genetic markers.

Key words: *Apis mellifera carnica*, Carniolan honey bee, DNA isolation, exuviae, honey bee queen, PCR, COI, tRNA^{Leu}, non-invasive sampling, genetic markers

¹ Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana

² Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva ulica 101, 1000 Ljubljana

³ Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Groblje 3, 1230 Domžale

UVOD

V vzrejo čebel se postopoma uvajajo metode, ki vključujejo genotipizacijo in uporabo z markerji podprte selekcije (MAS - marker assisted selection; Ruvolo-Takasusuki in sod., 2016; Holloway in sod., 2013). Eden od pomembnih korakov za uspešno genotipizacijo je izolacija zadostne količine DNA primerne čistosti in kakovosti iz informativnega biološkega vzorca. Izolacija iz tkiva žuželk, kamor spada tudi čebela, načeloma ni problematična in obstaja veliko število uveljavljenih in preizkušenih tehnik, ki omogočajo izolacijo DNA zadostne količine in primerne čistosti za nadaljnjo analizo (npr. Sudhagar in sod., 2014). V ta namen je osebek potrebno žrtvovati, nas pa zanima predvsem genetski material trotoev (haploidni) in matic (diploidne), ki prenašajo svoje genetske lastnosti v naslednjo generacijo, in je žrtvovanje osebkov nezaželeno. Večji izziv je izolacija DNA iz semi- in neinvazivno pridobljenih vzorcev pri maticah. Semi-invazivno pridobljeni vzorci so koščki krila, ki jih čebelarji pogosto matici odrežejo, preden jo vključijo v družino. Pri tem matica preživi in jo delavke redko zavrnejo. V literaturi obstajajo navedbe o uspešni izolaciji DNA iz koščkov kril za namen genotipizacije pri čebelah (Faccini in sod., 2018; Chaline in sod., 2003; Gould in sod., 2011; Gregory in Rinderer, 2004). Neinvazivni vzorci pa so levi bub matic, torej kutikula, ki ostane v matičniku po izleganju odrasle matice. Kutikula sama po sebi ne vsebuje celic, vendar se ob levitvi obloga zadnjega in sprednjega črevesa ter notranjost trahej z nekaj celicami, ki vsebujejo DNA, odloži skupaj z njo (Berholf, 1925). Te zadostujejo za nadaljnje analize. Ideja o uporabi kutikularnih ostankov za potrebe genotipizacije pri entomoloških vzorcih ni nova. Uspešnost izolacije DNA so pokazali pri nekaterih skupinah žuželk (Watts in sod., 2005; Nguyen in sod., 2017), ter tudi pri čebelah (Gregory in Rinderer, 2004). Levi bub matic so

dostopen neinvazivni vir dednega materiala, hkrati pa je učinkovita izolacija DNA metodološki izziv.

Cilj naše raziskave je postaviti izhodišča in raziskati možnosti za uspešno izolacijo DNA iz neinvazivnega vira pri maticah kranjske čebele za potrebe genotipizacije. V prvem koraku smo pripravili relativno enostaven protokol za vzrejevalce matic za vzorčenje matičnikov po izleganju matic. Kutikularne ostanke iz matičnikov smo shranili na -20°C in za izolacijo izbrali najprimernejše vzorce. Kot pozitivno kontrolo uspešnosti metode izolacije smo uporabili kot biološki vir okončino ali anteno matice, semi-invaziven vir so predstavljali koščki kril matic. Uspešno izolacijo DNA smo potrdili na podlagi pomnoževanja specifičnih mitohondrijskih fragmentov (COI in tRNA-Leu) s PCR ter sekvenciranjem pridobljenih zaporedij in ugotavljanjem identitete na ravni vrste medonosna čebela *Apis mellifera*.

Uspešna izolacija DNA iz levov bub matic omogoča genotipizacijo matic še pred parjenjem ter odbiro tistih matic, ki so nosilke genotipov, ki nas zanimajo. Razvoj in evalvacija primerne metode izolacije DNA iz neinvazivnih virov predstavlja pomemben korak pri vzreji in selekciji kranjske čebele s pomočjo genetskih markerjev.

MATERIALI IN METODE

Vzorčenje in priprava vzorcev za izolacijo DNA

V dogovoru z nekaterimi vzrejevalci matic smo v sezoni 2018 pridobili matičnike po izleganju matic. V ta namen smo pripravili enostaven protokol odvzema in shranjevanja matičnikov za pošiljanje po pošti. Vzrejevalcem smo v naprej poslali primerno število sterilnih 50 ml epruvet, v katere so po priloženem navodilu shranili matičnike po izleganju matic in jih po pošti poslali v roku 48 ur. Na vsako epruveto so vzrejevalci zabeležili datum poganja in



Slika 1. Primer matičnika po izleganju matice – LEVO matičnik po izleganju matice; DESNO – notranjost matičnika z vidnim rumenkastim kosmom na dnu in ob strani stene matičnika. To so ostanki kutikule po levitvi.

številko plemenilčka, v kolikor so bili ti podatki na voljo. Vzrejevalci so posebno skrb pri odvzemu namenili časovnemu okviru in sicer so matičnike za zagotovitev virov DNA morali odstraniti iz družine neposredno po poleganju matic oziroma v najkrajšem možnem času, preden so čebele delavke matičnike očistile. Prevzete vzorce smo shranili na -20°C do nadaljnje obdelave. Noge, antene in krila matic smo pridobili iz poginulih matic družin Kmetijskega Inštituta Slovenije, ki smo jih predhodno shranili v sterilne mikrocentrifugirke na -20°C . Poleg tega smo skozi celo sezono shranjevali matičnike poleženih matic iz družin Kmetijskega Inštituta Slovenije.

Iz matičnikov smo z čisto spatulo postrgali vsebino v novo sterilno mikrocentrifugirko volumna 2 ml. V nekaterih matičnikih smo lahko s prostim očesom ločili kosem rumenkaste barve na dnu matičnika (sklepamo, da gre za zmes izločkov, hranil in levov po levitvah ličnike) ter svetlo rjave prosojne zmečkanemu papirju podobne strukture, ki štrlijo ob notranji strani matičnika (sklepamo, da so to ostanki kutikule po zadnji levitvi bube matice; po Berhoff, 1925; Elias-Neto in sod., 2009; Slika 1). Oboje smo s spatulo oziroma pinceto prenesli v ločeno sterilno mikrocentrifugirko. Tako pripravljene vzorce smo shranili na -20°C .

Izolacija DNA

Vzorce tkiva matic (noge, antene, krila) ter ostanke kutikule iz matičnikov smo uporabili kot izvorni material za preizkus izolacije DNA z 2 kompleta za izolacijo s kolonami, ki smo ju dodatno optimirali: ISOLATE II Genomic DNA Kit (Bioline) in QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN). Pri izolaciji DNA smo sledili navodilom proizvajalca, spreminjali pa smo naslednje parametre:

1. mehanska homogenizacija vzorca s pestilom/mehanska homogenizacija s kroglicami na napravi Tissue-Lyser (Qiagen)
2. inkubacija vzorca po mehanski homogenizaciji v pufru za lizo in ob dodatku Proteinaze K 3 ure na 56°C /prekonočna inkubacija na 56°C
3. uporaba pufru PBS v koraku mehanske homogenizacije/brez uporabe pufru PBS (pri kompletu QIAamp DNA Mini Kit).
4. Za elucijo izolirane DNA smo uporabili 50 μl pufru za elucijo.
5. Ločeno odstranjevanje rumenkastega kosma na dnu matičnika in nitaste strukture ob strani matičnika z ločeno izolacijo, kjer je bilo mogoče. Za ta korak smo se odločili, ker je rumenkast kosem bolj viskozne, lepljive strukture in bi lahko sestava primesi v njem motila nadaljnje korake izolacije DNA in kasneje verižne

reakcije s polimerazo.

6. Nekaj minutno centrifugiranje pri najvišjem številu obratov pred nalaganjem vzorca na kolono kot dodatni korak. Na kolono smo naložili zgolj supernatant – del vzorca, ki se je po centrifugiranju ločil od spodnje usedline (ostanki primesi, krilc, noge). Tako smo preprečili zamašitev separacijske membrane.

Pomnoževanje specifičnih fragmentov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Uspešnost izolacije smo najprej preverili na agarozni gelski elektroforezi, tako da smo nanесли 5 μl izolata v jamičo. Ugotovili smo, da je DNA, izolirana iz okončin, vidna na gelu, izolati hitinskih ostankov iz matičnikov in kril pa ne (Slika 2). Zato smo v nadaljevanju pripravili poskus pomnoževanja specifičnih fragmentov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), da bi potrdili uspešnost izolacije DNA ter skladnost pomnožene DNA na ravni vrst (*Apis mellifera*) iz neinvazivnih in semi-invazivnih vzorcev.

Fragment intergenske regije t-RNA^{Leu} – Cox2 (v nadaljevanju tRNA-Leu) je najbolj široko uporabljan mitohondrijski marker za razlikovanje med linijami in podvrstami medonosne čebele (pregledni članek Meixner in sod., 2013). Za podvrste, ki pripadajo evlucijski liniji C (kamor spada tudi kranjska čebela), je značilno kratko zaporedje in odsotnost variabilnosti v dolžini fragmenta tRNA-Leu. Do danes je znanih 9 haplotipov kranjske čebele (Franck in sod., 2000a; 2000b; Sušnik in sod., 2004; Božič in sod., 2016).

Metoda "DNA barcoding" z markerjem COI, ki je visoko ohranjen na ravni vrst, se uspešno uporablja pri identifikaciji organizmov (Herbert in sod., 2003). Uporabnost pri razlikovanju med podvrstami medonosne čebele na podlagi tega markerja pa je zaenkrat omejena (Bouga in sod., 2011). Syromyatnikov in sod. (2018) so pokazali možnost uporabe COI markerja za razlikovanje nekaterih podvrst medonosne čebele v Rusiji.

S PCR smo uspešno pomnožili oba od zgoraj opisanih markerjev (tRNA-Leu in COI). Osnovni volumen reakcije je bil 15 μl . Reakcijska mešanica je vsebovala 7,5 μl 2x mešanice DreamTaq MasterMix (ThermoFischer Scientific, ZDA), po 0,2 μl 20 uM vsakega začetnega oligonukleotida, 2 μl izolirane DNA in 5,1 μl destilirane H₂O (Sigma, ZDA). Izolate iz okončin, ki so služili za pozitivno kontrolo, smo predhodno 10 x redčili v destilirani vodi. Informacije o markerjih, nukleotidnih zaporedjih oligonukleotidnih začetnikov, nastavitve programa PCR smo povzeli po literaturi (Garnerey in sod., 1993 (tRNA-Leu) in Folmer in sod., 1994 (COI)). PCR smo izvedli v cikličnih termostatih SureCycler 8800 (Agilent), Veriti (Applied Biosystems), GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) ali T1 Thermocycler (Biometra).

Detekcija izolirane dednine in produktov PCR z agarozno gelsko elektroforezo

Uspešnost pomnoževanja nukleotidnega zaporedja smo preverili tako, da smo 5 µl pomnoženega produkta nanesli v jamice v 1 % agaroznem gelu z dodatkom EtBr (etidijevoga bromida) v 0,5 x pufru TBE na horizontalni elektroforezi. Za oceno dolžine fragmenta smo uporabili standardno lestvico GeneRuler™ 100 bp DNA (ThermoScientific, ZDA), ki smo jo sočasno z vzorci nanesli v eno od jamic na gelu. PCR produkte smo po končani elektroforezi vizualizirali s pomočjo UV transiluminatorja pri valovni dolžini 280 nm.

Čiščenje produktov PCR, sekvenciranje, urejanje zaporedij

Uspešno pomnožene produkte PCR smo encimsko očistili z reagentom ExoSAP-IT (ThermoFischer Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca. Določanje nukleotidnega zaporedja očiščenih produktov PCR so izvedli po Sangerjevi metodi v podjetju SeqMe (Češka) z obema začetnima oligonukleotidoma.

Kromatograme DNA zaporedij smo združili v programu Geneious v 11.1.5. (<https://www.geneious.com>) in popravili morebitne napake v branju zaporedja. Nato smo urejena homologna zaporedja poravnali bodisi z dodatkom ClustalW (Thompson in sod. 1994) ali z dodatkom MAFFT v.7 (Katoh, 2013) z uporabo algoritma E-ins-i v programu Geneious. Vsako od poravnav smo skrbno pregledali za morebitne napake v branju. Kodirajoča zaporedja markerja COI smo prevedli v aminokislinska zaporedja in preverili, da ne vsebujejo stop-kodonov. Vsa zaporedja smo preverili s spletnim orodjem BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ali se po podobnosti ujema jo z že znanimi zaporedji pri rodu *Apis*. Fragment COI, ki je uveljavljen univerzalen marker v metodi identifikacije organizmov »Barcoding« pa smo dodatno uporabili za preverjanje identifikacije na vrstni ravni v podatkovni zbirki BOLD (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_IdentificationRequest).

Filogenetska analiza

Za vsakega od markerjev smo pripravili unilokusno filogenetsko analizo, s katero smo preverili filogenetske odnose naših vzorcev ter izbora homolognih zaporedij rodu *Apis*, ki so dostopna v podatkovni zbirki GenBank (NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> na dan 15. 9. 2018). Za zunanjik smo uporabili homologna zaporedja vzhodne čebele *Apis cerana*. Vrzeli v poravnavi smo kodirali kot »-«, manjkajoče dele zaporedij pa smo kodirali kot »?«. S pomočjo programa jMODELTEST2 (Darriba in sod., 2012; Guindon in Gascuel, 2003) na strežniku CI-

PRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/portal2/>) smo določili najprimernejši substitucijski model za vsako poravnavo po kriteriju AIC (Akaike Information Criterion). Najprimernejši substitucijski model za marker COI je GTR + I, za marker tRNA-Leu pa HKY85 + G.

Filogenetsko drevo smo izračunali v programu MrBayes v.3.2.3. (Ronquist in sod. 2012) na strežniku CIPRES Science Gateway tako, da smo nastavili dva vzporedna algoritma MCMCMC vsakega s tremi toplimi in eno hladno verzijo, število generacij pa smo prilagodili glede na velikost nabora vzorcev tako, da je prišlo do konvergence v vzporednih algoritmih (standardna deviacija ločenih frekvenc 0.01 ali manj). 3×10^6 je bilo večinoma dovolj veliko število generacij za konvergenco, sicer smo število generacij povečali. Program je zabeležil vsako 1000. generacijo. Prvih 25 % vzorčenih dreves smo zavrgli, preostala drevesa pa so služila za določitev 50 % večinskega drevesa soglasja (50 % majority rule consensus tree). Za statistično podporo kladov so služile posteriorne verjetnosti na vsaki cepitvi. Genska drevesa smo grafično prikazali v programu Fig-Tree 1.4.3. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>) in jih uredili za prikaz rezultatov.

REZULTATI Z RAZPRAVO

Levi bub matic kot dostopen in primeren vir dednine za genotipizacijo – izhodišče za vpeljavo genetskih markerjev v rejski program?

V letošnji sezoni smo za potrebe analiz zbrali preko 100 matičnikov pri 13 vzrejevalcih in čebelarjih. Ugotovili smo, da je protokol vzorčenja matičnikov po izleganju matic primeren in dovolj enostaven, po končanih analizah pa bomo za mnenje zaprosili tudi sodelujoče in poizkusili upoštevati njihove predloge.

Za potrebe izolacije dednine iz tkiv (krilca in okončine) smo uporabili 8 matic, ki so v letošnji sezoni poginile. Uspešno smo izolirali DNA iz hitinskih ostankov matic po izleganju, iz koščkov kril in iz okončin. Naši rezultati kažejo, da so hitinski ostanki v matičnikih po izleganju matic stabilen in obstojen vir DNA na sobni temperaturi in ne potrebujejo posebnih pogojev kratkoročnega shranjevanja. Na podlagi agarozne gelske elektroforeze, s katero smo vizualizirali po 5 µl izolirano DNA, smo ugotovili, da je količina DNA v izolatih iz kutikularnih ostankov iz matičnikov in krilc v 5 µl izolata pod mejo detekcije na gelu (Slika 2).

Kljub nizki koncentraciji DNA v vzorcih smo uspešno pomnožili 2 fragmenta mitohondrijske DNA (COI in tRNA-Leu).

Ugotovili smo, da so za uspešno izolacijo DNA iz ostan-



Slika 2. Agarozna gelska elektroforeza izolatov DNA (volumen posameznega izolata na gelu je 5 μ l). Zadostna količina DNA za detekcijo je bila uspešno izolirana iz vzorca noge (N1 in N2), DNA iz kutikularnih ostankov matičnikov (1-5) in krilc (k1 in k2) ni vidna. L je standardna lestvica 100 bp plus.

kov hitina iz matičnikov in krilc ter uspešno pomnožitev fragmentov mitohondrijske DNA pomembni naslednji koraki:

1. Mehanska liza je pomembna pri uspešni izolaciji DNA in uporaba homogenizatorja TissueLyser s kroglicami je dala boljši rezultat kot homogenizacija ročno s pestilom.
2. Prekonočna inkubacija vzorcev v začetnem koraku lize na 56°C je dala boljši rezultat kot zgolj nekajurna inkubacija.
3. Pri pomnoževanju fragmentov se je pokazalo, da so bili uspešno pomnoženi vsi izolati iz matičnikov kjer smo za vir DNA uporabili izključno košček nitaste strukture, ne pa tudi izolati istih matičnikov iz rumenkastega kosma na dnu matičnika. Ta grudičast, lepljiv vir nam je povzročal že pri sami izolaciji določene težave (nekajkrat je prišlo do zamašitve membrane na koloni, obvezno smo morali uvesti dodaten korak centrifugiranja vzorca pred nanosom na kolono). Predvidevamo, da je razlog za slabši rezultat izolacije DNA iz rumenkastih kosmov dvojen: 1. Zaradi prisotnosti v kosmu v postopku izolacije zadostna količina DNA iz tega vira ni primerno dostopna ali pa 2. so v izolatu ostale po izolaciji prisotne nečistoče, ki inhibirajo polimerazno aktivnost.

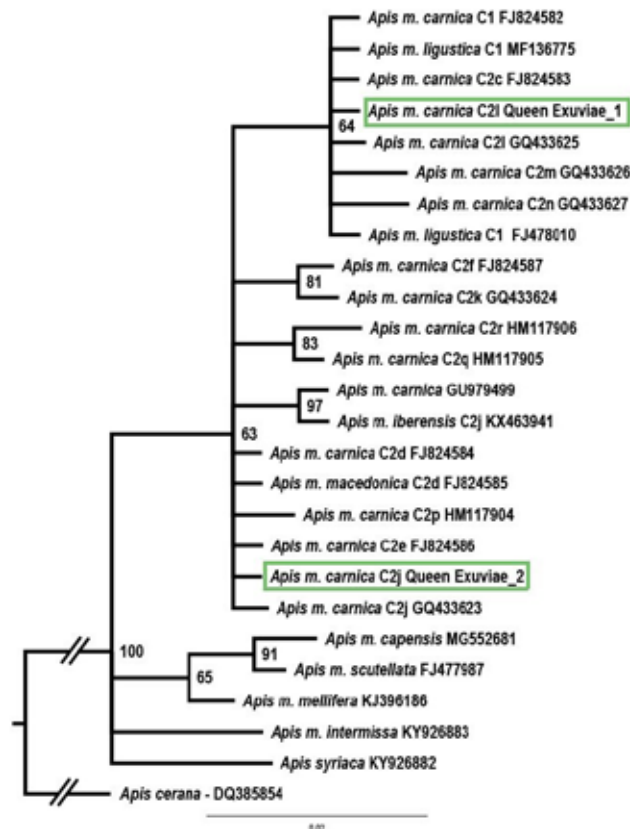
Da bi zagotovili, da DNA izolirana iz ostankov hitina in koščka krila ni kontaminacija (DNA bakterij, plesni, cvetnega prahu) ampak pripada čebeli, smo za pozitivno kontrolo uporabili DNA izolirano iz noge ali antene matice. Vsa uspešno pomnožena zaporedja iz ostankov hitina in krila so se ujemale z zaporedji pridobljenimi iz vzorcev okončin matice.

Uspešno smo pomnožili 536 bp dolg fragment tRNA-leu pri 24 vzorcih. Med temi vzorci smo razločili 2 haploti-

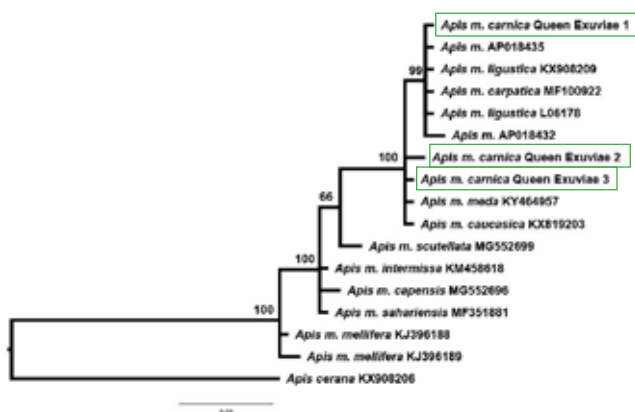
pa, ki smo ju uporabili v filogenetski analizi. Haplotipa se ujemata z do sedaj znanimi in opisanimi haplotipi v populaciji čebeljih družin v Sloveniji (Božič in sod., 2016). Haplotip 1 ustreza haplotipu C2i s šifro GQ433625, haplotip 2 ustreza haplotipu C2j s šifro GQ433623 (GenBank, Razpet in sod., 2009).

661 bp dolg fragment za COI smo uspešno pomnožili pri 32 vzorcih. Med temi vzorci smo razločili 3 haplotipe, ki smo jih uporabili v filogenetski analizi. Haplotipe smo preverili v podatkovni zbirki BOLD, ki omogoča identifikacijo na podlagi regije COI na ravni vrste. Rezultat je pokazal 99,85 % ujemanje z vrsto *Apis mellifera*.

Naši preliminarni rezultati kažejo, da so levi bub matic dostopen in primeren vir dednine za genotipizacijo matic kranjske čebele. Izpopolnjena metoda bo omogočila vplejavo genetskih markerjev v rejski program v Sloveniji in hitrejšo selekcijo linij kranjske čebele z zanimivimi rejskimi lastnostmi. Hkrati bo izpopolnjena metoda omogočila enostaven monitoring – spremljanje morebitne introgresije genov drugih podvrst v genski sklad populacij v Sloveniji.



Slika 3. Filogenetsko drevo z bayesovim pristopom za marker tRNA-Leu. Vrednosti na drevesu so posteriorne verjetnosti za posamezno cepitev. Z zelenim okvirjem sta označena haplotipa *A. m. carnica*, katerih fragment je pridobljen iz izolatov hitinskih ostankov matic po izleganju iz matičnikov.



Slika 4. Filogenetsko drevo z bayesovim pristopom za marker COI. Vrednosti na drevesu so posteriorne verjetnosti za posamezno cepitev. Z zelenim okvirjem so označeni haplotipi kranjske čebele *A. m. carnica*, pridobljeni iz izolatov hitinskih ostankov matic po izleganju iz matičnikov.

Filogenetska analiza

Naravno območje razširjenosti medonosne čebele *Apis mellifera* L. je Evropa, Afrika in Bližnji Vzhod. Adaptaci-

ZAKLJUČKI

Neinvazivni in semi-invazivni biološki vzorci (levi bub in koščki krila) pri maticah so posebno atraktiven vir DNA, saj omogočajo pridobitev informacij o genotipu osebkov brez žrtvovanja in nimajo bistvenega vpliva na dolgoživost.

Eksoskeleti žuželk, ki ostanejo v matičniku po izleganju matic, so sestavljeni iz necelularnih glikoproteinov in so primeren vir za neinvazivno genotipizacijo čebeljih matic. DNA, izolirana iz levov bub matic, se genotipsko ujema z DNA, izolirano iz vzorcev krilc in nog matic. To smo pokazali s specifičnim pomnoževanjem s PCR, pri čemer smo uporabili marker COI (za vrstno identiteto) ter marker tRNA-Leu (diskriminacija na ravni linij). Ugotovili smo, da je med metodami, ki smo jih preizkusili, najprimernejša metoda za izolacijo DNA iz hitinskih ostankov s kompletom QIAamp Mini s prekonočno inkubacijo v koraku lize ter z uporabo mehanske homogenizacije s kroglicami na napravi TissueLyser (QiaGen). Vključno z metodo vzorčenja, ki je prilagojena enostavnemu vzorčenju

ja na raznolike življenjske pogoje je pripeljala do diverzifikacije na več kot 24 podvrst, ki se združujejo v 4 linije: Afriška (A), Zahodno Evropska (M), Vzhodno Evropska (C) in Bližnje Vzhodna (O) (Ruttner, 1988). Kranjska čebela *Apis mellifera carnica* Pollman spada v filogenetsko linijo C, poleg nje pa to linijo tvorijo še *A. m. ligustica* Spinola, *A. m. cecropia* Kiensenwetter in *A. m. macedonica* Ruttner (Ruttner, 1988). Medtem ko genotipizacija regije tRNA-Leu omogoča razlikovanje med posameznimi linijami, smo se v tej študiji omejili na vprašanje, ali je izolirana DNA iz ostankov hitina v matičnikih čebelja, ali gre za kak drug vir (npr. kontaminacijo). Ugotovili smo, da vsa pridobljena zaporedja poravnana z zaporedji iz podatkovne zbirke GenBank po podobnosti ustrezajo vrsti *Apis mellifera*. Unilokusna filogenetska analiza za vsak marker to tudi potrjuje (sliki 3 in 4).

matičnikov po izleganju matic s strani vzrejvalcev, nam ta metoda izolacije DNA iz neinvazivnega vira olajša/poenostavi postopek pridobivanja podatkov o genotipu matic še pred oploditvijo in vzpostavitvijo družine. Tak postopek genotipizacije omogoča selekcijo zaželjenih osebkov in podporo tradicionalnim metodam selekcije družin z izraženimi zaželjenimi lastnostmi. Z uspešnim izločanjem matic z nezaželjenimi lastnostmi v čim bolj zgodnji fazi reje, se lahko zmanjšajo stroški reje, čas in trud, ki ga vložijo čebelarji za vzdrževanje in testiranje družin. Hkrati bo izpopolnjena metoda omogočila enostaven monitoring – spremljanje morebitnega vnašanja genov drugih podvrst v genski sklad populacij v Sloveniji.

Predstavljena raziskava je izhodišče za nadaljnjo optimizacijo protokola za genotipizacijo matic na podlagi DNA iz ostankov hitina po zadnji levitvi. Na ta način bo omogočeno spremljanje rejskih lastnosti na ravni DNA, odbira matic za vzrejo in selekcijo, analize pa bodo na voljo tudi za uporabo v primeru izvoza matic kranjske sivke v tujino.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujemo vsem vzrejevalcem in čebelarjem, ki so v letošnjem letu sprejeli povabilo za sodelovanje in nam posredovali primerno ohranjene matičnike (Bevk Danilo, Bukovšek Štefan, Bukovšek Janko, Dremelj Janez, Grm Darko, Jezeršek Cvetka, Kolar Peter, Novak Miha, Nakrst Mitja, Petelin Irma, Peternelj Jože, Starovasnik Milan, Zemljič Andrej). Zahvaljujemo se tudi sodelavcem na Kmetijskem inštitutu Slovenije, ki so s svojimi predlogi, znanjem in strokovno pomočjo prispe-

vali k prvim rezultatom na področju izolacije dednine iz matičnikov v Sloveniji. Projekt je financiran iz sredstev programske skupine P4-0133 (Trajnostno kmetijstvo na Kmetijskem inštitutu Slovenije) in sredstev projekta "Raziskovalci-2.0-KIS-529015", ki ga sofinancirata Republika Slovenija (Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport) in Evropska Unija iz Evropskih strukturnih in investicijskih skladov.

LITERATURA

- Berhof, L.M. 1925. The moults of the honey bee. *Journal of Economic Entomology*. 18: 380-384.
- Bouga, M., Alaux, C., Bienkowska, M., Ralph, B., Carreck, N.L., Cauia, E., Chlebo, R., Dahle, B., Dall'Olio, R., De la Rua, P., Gregorc, A., Ivanova, E., Kence, A., Kence, M., Kezić, N., Kiprijanovska, H., Kozmus, P., Kryger, P., Le Conte, Y., Aleksandar, B. 2011. A review of methods for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *Journal of Apicultural Research*. 50: 51-84. doi: 10.3896/IBRA.1.50.1.06.
- Božič, J., Kordiš, D., Križaj, I., Leonardi, A., Močnik, R., Nakrst, M., Podgoršek, P., Prešern, J., Sušnik Bajec, S., Zorc, M., Zorc, J., Dovč, P. Novel aspects in characterisation of Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica*, Pollmann 1879). V: DOVČ, Peter (ur.). *Technology driven animal production, 24th International Symposium Animal Science Days, Ptuj, September 21st-23rd, 2016*, (Acta agriculturae slovenica, ISSN 1854-4800, Supplement, 2016, 5). Ljubljana: Biotechnical Faculty. 2016, suppl. 5: 18-27.
- Châline, N., Ratnieks, F., Raine, N., Badcock, N., Burke, T. 2004. Non-lethal sampling of honey bee, *Apis mellifera*, using wing tips. *Apidologie*. 35: 311-318.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 8: 772
- Elias-Neto, M., Soares, M.P.M., Bitondi, M.M.G. 2009. Changes in integument structure during the imaginal molt of the honey bee. *Apidologie*. 40: 29-39. doi: 10.1051/apido:2008064
- Facchini, E., Rizzi, R., Chessa, S. 2018. DNA extraction from wings as a suitable approach for queen bees genotyping. *International Journal of Health, Animal Science and Food Safety*. 5. doi : <https://doi.org/10.13130/2283-3927/10065>
- Folmer, O.M., Black, M., Hoeh, R., Lutz, R., Vrijehok, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5: 304-313.
- Franck, P., Garnery, L., Celebrano, G., Solignac, M., Cornuet, J.-M. 2000. Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*). *Molecular ecology*. 9: 907-921. doi : 10.1046/j.1365-294x.2000.00945.x.
- Franck, P., Garnery, L., Solignac, M., Cornuet, J.-M. 2000. Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from Near East. 31: 167-180. DOI: 10.1051/apido:2000114.
- Garnery, L., Solignac, M., Celebrano, G., Cornuet, J.-M. 1993. A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L. *Experientia*. 49: 1016-1021. doi:10.1007/BF02125651.
- Gould, E. M., Taylor, M.A., Holmes, S. J. 2011. A more consistent method for extracting and amplifying DNA from bee wings. *Apidologie*. 42: 721-727. doi: 10.1007/s13592-011-0077-x.
- Gregory, P.G., Rinderer, T.E. 2004. Non-destructive sampling of DNA used to genotype honey bee (*Apis mellifera*) queens. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 111: 173-177.
- Guindon, S., Gascuel, O. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by

- maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696-704.
- Holloway, B., Tarver, M.R., Rinderer, T.E. 2013. Fine mapping identifies significantly associating markers for resistance to the honey bee brood fungal disease, Chalkbrood, *Journal of Apicultural Research*, 52:3: 134-140. doi: 10.3896/IBRA.1.52.3.04
 - Katoh, S. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 772-780.
 - Meixner, M.D., Pinto, M.A., Bouga, M., Kryger, P., Ivanova, E., Fuchs, S. 2013. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 52. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.05.
 - Mikhail, S.Y., Borodachev, A.V., Kokina, A.V., Popov, V.N. 2018. A Molecular Method for the Identification of Honey Bee Subspecies Used by Beekeepers in Russia. *Insects*. 9. doi: 10.3390/insects9010010.
 - Nguyen, H.Q., Kim, Y. I., Borzée, A., & Jang, Y. 2017. Efficient isolation method for high-quality genomic DNA from cicada exuviae. *Ecology and Evolution*, 7(20): 8161-8169. doi: 10.1002/ece3.3398
 - Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*. 61(3): 539-542. doi:10.1093/sysbio/sys029.
 - Ruttner, F., 1988. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, 284 pp.
 - Ruvolo-Takasusuki, M.C.C., Arielen Patricia Balista Casagrande Pozza, Ana Paula Nunes Zago Oliveira, Rejane Stubs Parpinelli, Fabiana Martins Costa-Maia, Patricia Faquinello and Vagner de Alencar Arnaut de Toledo. 2016. Improvement and Selection of Honeybees Assisted by Molecular Markers, *Beekeeping and Bee Conservation Emerson Dechechi Chambo*, IntechOpen, doi: 10.5772/62426. Available from: <https://www.intechopen.com/books/beekeeping-and-bee-conservation-advances-in-research/improvement-and-selection-of-honeybees-assisted-by-molecular-markers>
 - Sudhagar, S., Rami Reddy, P.V., Sridhar, V., Kamala Jayanthi, P.D., Vani, R. 2014. Qualitative and quantitative differences in DNA extracted from different body parts of *Apis* spp. (Hymenoptera:Apidae) and its validation using microsatellite markers. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*. 20: 55-58.
 - Susnik, S., Kozmus, P., Poklucar, J., Meglic, V. 2004. Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. *Apidologie*. 35: 623-636. doi: 10.1051/apido:2004061
 - Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22):4673-4680.
 - Watts, P.C., Thompson, D.J., Daguét, C., Kemp, S.J. 2005. Exuviae as a reliable source of DNA for population-genetic analysis of odonates. *Odonatologica*. 34: 183-187.

NEGATIVNI UČINKI SREBROVIH NANODELCEV NA KRAJNSKO ČEBELO

GLAVAN, Gordana¹; DROBNE, Damjana¹; KOS Monika^{1,2}; Janko BOŽIČ¹; JEMEC KOKALJ, Anita¹

Izvleček

Nosema je eden izmed vzrokov za umiranje čebeljih družin. V zadnjem času je bila ugotovljena možnost zdravljenja nosečnosti s koloidnim srebrom, ki vsebuje tudi srebrove nanodelce (Ag-ND). Po drugi strani pa raziskave kažejo na negativne učinke Ag-ND na organizme, učinki Ag-ND pa na čebele niso raziskani. V tej študiji smo raziskali vpliv kroničnega 9-dnevnega uživanja Ag-ND v 1,5 M saharozni raztopini na preživetje čebel in na njihovo prehranjevanje. Z akutnim 24-urnim testom izbire med saharozno raztopino in saharozno raztopino, ki je vsebovala različne koncentracije Ag-ND, pa smo ugotavljali ali čebele raje izbirajo ali zavračajo določene koncentracije Ag-ND. Čebele smo tekom poskusov hranili s saharozno raztopino, ki je vsebovala različne koncentracije Ag-ND (2, 10, 50, 250 in 500 mg L⁻¹). Ker disperzije Ag-ND poleg delcev vsebujejo tudi znatno količino srebrovih ionov, smo enake poskuse naredili tudi z različnimi koncentracijami raztopine srebrovega nitrata (AgNO₃). Ugotovili smo, da je uživanje saharoznih raztopin, ki so vsebovale Ag-ND (500 mg L⁻¹) ali AgNO₃ (250 mg L⁻¹), po 9 dneh povzročilo postopno umiranje čebel. Ugotovili smo tudi zmanjšano stopnjo prehranjevanja, ki je bila verjetno odraz negativnih učinkov Ag-ND in AgNO₃ na zdravje čebel. Učinki na umrljivost ter prehranjevanje so se pri tretiranju z AgNO₃ pokazali že pri nižjih koncentracijah v primerjavi z Ag-ND, zato je raztopina srebrove soli za čebele bolj strupena. Z izbirnimi testi smo pokazali, da čebele raje izbirajo saharozno raztopino v primerjavi z raztopino, ki je vsebovala Ag-ND ali AgNO₃, kar pomeni, da so čebele sposobne zaznavati spremenjene lastnosti saharozne raztopine, kaj dejansko zaznavajo pa je potrebno nadaljnje raziskati. Testirane koncentracije v tej študiji so bile višje, kot jih poročajo proizvajalci koloidnega srebra, ki je v prosti prodaji. Kljub temu je naša raziskava pokazala na možne negativne posledice pri uporabi koloidnega srebra pri morebitnem zdravljenju bolezni čebel. Komercialni pripravki s koloidnim srebrom, za katere so značilne pomanjkljive deklaracije, velikokrat vsebujejo pretežno srebrove ione. Ugotavljamo, da lahko nenamenska uporaba takšnih pripravkov, ki niso registrirani za zdravljenje čebel, potencialno ogroža čebele.

Ključne besede: koloidno srebro, srebrovi nanodelci, srebrov nitrat, kranjska čebela, smrtnost, prehranjevanje

NEGATIVE IMPACTS OF SILVER NANOPARTICLES ON CARNOLIAN HONEY BEE

Abstract

Nosema is one of the reasons for bee colony death. Recently, the possibility of treating nosemosis using colloidal silver was suggested, which contains silver nanoparticles (Ag-NPs). On the other hand, research shows the negative effects of Ag-NPs on organisms, but the effects of Ag-NPs on bees have not been elucidated. In this study we evaluated the effects of oral chronic 9-day administration of Ag-NPs in a sucrose solution on the survival and feeding of bees. We also performed an acute 24-hour test of the choice between sucrose solution and a sucrose solution containing various concentrations of Ag-NPs to determine whether the bees preferred or rejected certain concentrations of Ag-NPs. During the experiments the bees were fed with a sucrose solution containing various concentrations of Ag-NPs (2, 10, 50, 250, and 500 mg L⁻¹). In addition, it is known that the Ag-NPs dispersions may contain also a considerable amount of silver ions, therefore the same experiments were done with various concentrations of silver nitrate solution (AgNO₃). We found that the consequence of feeding with Ag-NPs (500 mg L⁻¹) or AgNO₃ (250 mg L⁻¹) solutions is gradual dying of bees. We also found a reduced level of feeding, which is probably

¹ Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenija

² Raziskovalna enota, Biotehniški center Naklo, Strahinjški center, 4202 Naklo

a reflection of the negative effects of Ag-NPs or AgNO₃ on bee's health. Effects on mortality and feeding have been shown in treatment with AgNO₃ at lower concentrations compared to Ag-NPs, which is why the solution of silver nitrate was more toxic for bees. We have also shown that bees preferred to choose a sucrose solution compared to a solution containing Ag-NPs or AgNO₃, which means that the bees were able to detect altered sucrose solution. Whether they indeed sensed silver, remains to be investigated in the future. Our test concentrations were higher as those reported in colloidal silver formulations available on the market. Nevertheless, our study has shown the possible negative consequences of using colloidal silver in the potential treatment of bee diseases. Commercial colloidal silver products, frequently equipped by inadequate declarations, often contain predominantly silver ions. We conclude that the unintentional use of such preparations that are not registered for the treatment of bees potentially threaten bees.

Key words: colloidal silver, silver nanoparticles, silver nitrate, Carniolan honey bee, mortality, feeding



UVOD

K umiranju družin medonosnih čebel prispeva veliko dejavnikov, raziskovalci najbolj izpostavljajo okužbe z različnimi virusi, nosemo (*Nosema apis*, *N. ceranae*), varojo (*Varroa destructor*), uporabo pesticidov, izgubo habitatov in upad genetske raznovrstnosti (Neumann in Carreck, 2010). Zdravljenje različnih bolezni čebel se je izkazalo za zahtevno in temelji predvsem na uporabi različnih sintetičnih snovi kot so npr. akaricidi, ki so lahko za čebele škodljivi, njihove ostanke pa lahko najdemo v medu, vosku in cvetnem prahu (Imdorf in sod., 1999). Zato v zadnjem času čebelarji iščejo alternativna sredstva, ki bi bila učinkovita, vendar za čebele neškodljiva.

Nekateri raziskovalci so predlagali, da je koloidno srebro ena izmed potencialnih snovi s protimikrobnimi lastnostmi za zdravljenje bolezni čebel (Khan in sod., 2018). Pripravki koloidnega srebra, ki so na voljo na trgu, načeloma predstavljajo vodno disperzijo srebrovih delcev različnih velikosti (mikro in nano) in srebrovih ionov (Silver Colloids, <http://www.silver-colloids.com/>). Velikokrat pa zaradi cenejše proizvodnje kot koloidno srebro prodajajo raztopine, ki vsebujejo visok odstotek (do 90 %) srebrovih ionov, manjši delež pa predstavljajo srebrovi delci. V raziskavah vpliva koloidnega srebra na organizme se zaradi lažje razlage rezultatov večinoma uporabljajo disperzije definiranih velikosti srebrovih delcev, ki so v glavnem manjši od 100 nm in jih zato imenujemo nanodelci (Ag-ND).

Avtorji Borsuk in sod. (2013) so pokazali, da je nosemanost mogoče zdraviti z uporabo Ag-ND. Čebele so hranili s sladkorno raztopino, ki je vsebovala 25 mg L⁻¹ Ag-ND, zaradi česar se je v njihovih prebavilih močno zmanjšalo število spor noseme (*Nosema spp.*). Kljub temu avtorji iste raziskave svetujejo previdnost pri uporabi pripravkov z Ag-ND, saj so pokazali tudi krajše preživetje čebel ter kopičenje srebra v čebelah. V neki drugi raziskavi pa so pokazali, da je oralna izpostavitve čebel *Apis cerana* srebrovim ionom v panjih, ki so bile predhodno okužene z virusom KSBV (Korejski virus mešičkaste zalege), povečala njihovo preživetje (Ahn in sod., 2015). Biocidne lastnosti Ag-ND pa so bile pokazane tudi proti povzročiteljem hude gnilobe pri čebelah (*Paenibacillus larvae* in *Paenibacillus alvei*) (Culha in sod., 2017).

Danes je na voljo veliko število raziskav, kjer so dokazali škodljive vplive Ag-ND na organizme (Ivask in sod., 2014). Hkrati pa obstaja več spletnih strani in spletnih forumov, kjer čebelarjem laično promovirajo uporabo koloidnega srebra za zdravljenje čebel. Zato je bil namen naše raziskave ugotoviti vpliv oralne kronične izpostavitve različnih koncentracij Ag-ND na kranjsko čebelo *Apis mellifera carnica*. V prvem delu raziskave smo ugotavljali preživetje in stopnjo prehranjevanja čebel. V drugem delu

raziskave pa nas je zanimalo, ali čebele zaznavajo srebro v saharozni disperziji Ag-ND, pri čemer smo naredili test izbire. Pri tem testu so imele čebele možnost izbire med saharozno raztopino ter saharozno raztopino, ki je vsebovala različne koncentracije Ag-ND. Ugotavljali smo ali čebele raje izbirajo ali zavračajo določene koncentracije Ag-ND. Ker disperzije Ag-ND vsebujejo poleg delcev tudi znatno količino srebrovih ionov (v našem primeru kar cca. 50%), smo naredili poskuse tudi z raztopinami srebrove soli brez dodanih Ag-ND, za kar smo uporabili različne koncentracije raztopine AgNO₃, da bi ugotovili prispevek srebrovih ionov k morebitnim opaženim učinkom na čebele.

MATERIAL IN METODE

Srebrovi nanodelci in AgNO₃

Poskuse smo izvedli s srebrovimi nanodelci (Ag-ND) (proizvajalec Colorobbia S.p.A., Italija). Koncentracija celokupnega Ag v disperziji Ag-ND je bila 41.14 g L⁻¹, delež Ag⁺ zvrsti pa 46-68 % (Jemec in sod., 2016). Nanodelci Ag-ND so bili stabilizirani s polimerom polivinilpolidonon (PVP), kar omogoča njihovo večjo stabilnost v disperziji. Ločenih testov s stabilizatorjem PVP nismo naredili, saj sta bili vrsta in koncentracija PVP v disperziji Ag-ND zaupna podatka proizvajalca in ju nismo poznali (Jemec in sod., 2016). Velikost delcev pomerjenih v prahu je bila 21±8 nm (presevna elektronska mikroskopija), v saharozni raztopini pa v območju 332-994 nm (hidrodinamski radij je bil odvisen od testne koncentracije). Vzporedno smo proučevali tudi srebrovo sol (AgNO₃) (Sigma-Aldrich, Nemčija).

Disperzijo Ag-ND smo pred poskusom premešali s 5 min močnim stresanjem (pri 3000 rpm, IKA Vortex 4 basic, IKA, Nemčija) brez dodatnega soniciranja in jo pripravili v 1,5 M raztopini saharoze z najvišjo izpostavitveno koncentracijo 500 mg L⁻¹ (celokupna konc. Ag). To je bila izhodiščna raztopina za pripravo ostalih koncentracij: 2, 10, 50 in 250 mg Ag-ND L⁻¹. V primeru AgNO₃ so bile koncentracije Ag: 2, 10, 50, 250 in 500 mg Ag L⁻¹. Kontrolna skupina čebel je bila hranjena samo z raztopino saharoze.

Poskusi s čebelami

Delavke kranjske sivke *Apis mellifera carnica* (Pollman, 1879) smo nabrali v čebelnjaku Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani pozno pomladi (maj). Nabrali smo jih zjutraj na dan poskusa na zgornjih letvicah satov nakladnega panja z uporabo aspiratorja. Nabrane čebele smo naključno razporejali v pripravljene lesene kletke z jekleno mrežico na eni in premičnim

steklom na drugi strani. V kletko sta bili vstavljeni dve brizgi, kjer smo čebelam ponudili saharozno raztopino in deklorirano vodo. Med nabiranjem smo čebelam v kletkah ponudili vodo in saharozo (1,5 M) *ad libitum*. Po nabiranju smo kletke s čebelami za 2 h postavili v inkubator (34 °C, 60±5 % RH) in jim ponudili le deklorirano vodo. Izvedli smo dva tipa poskusov: (i) akutni 24 h poskus z izbiro hrane in (ii) kronični 9-dnevni prehranjevalni poskus. S 24-h akutnim prehranjevalnim testom z izbiro hrane smo preverili sposobnost zaznave, preference ali izogibanja testni kemikaliji v hrani. V ta namen smo uporabili polietilenske posodice (9 x 7 x 7 cm; d x š x v) s pokrovom. V testno posodo so bile vstavljene tri brizge, v katerih smo čebelam ponudili deklorirano vodo in hrano *ad libitum*. Dno smo prekrili s celuloznim filtrirnim papirjem. Čebelam smo sočasno ponudili hrano v dveh stranskih brizgah; v eni brizgi je bila raztopina saharoze (kontrolna hrana), v drugi brizgi pa raztopino 1,5 M saharoze z Ag-ND ali AgNO₃. Pripravili smo 6 testnih parov: "0-0", "0-2", "0-10", "0-50", "0-250" in "0-500" mg L⁻¹. Za vsak tretma smo pripravili tri testne posodice, v vsaki je bilo 10 čebel. Poskuse smo vzdrževali v inkubatorju pod enakimi pogoji kot kronične teste. Po 24 h smo testne posodice natančno pregledali, prešteli poginule čebele in določili količino pojedene hrane v vsaki brizgi.

Prehranjevalni kronični poskus smo naredili kot smo že poročali v Kos in sod. (2018). Za vsako koncentracijo (Ag-ND ali AgNO₃: 0, 2, 10, 50, 250 in 500 mg L⁻¹) testne raztopine smo pripravili kletko z 20-28 čebelami. Vsakih 24 h smo hrano zamenjali in stekali pojedeno hrano. Dnevno smo opazovali preživetje čebel in odstranjevali mrtve čebele. Poskus je trajal 9 dni.

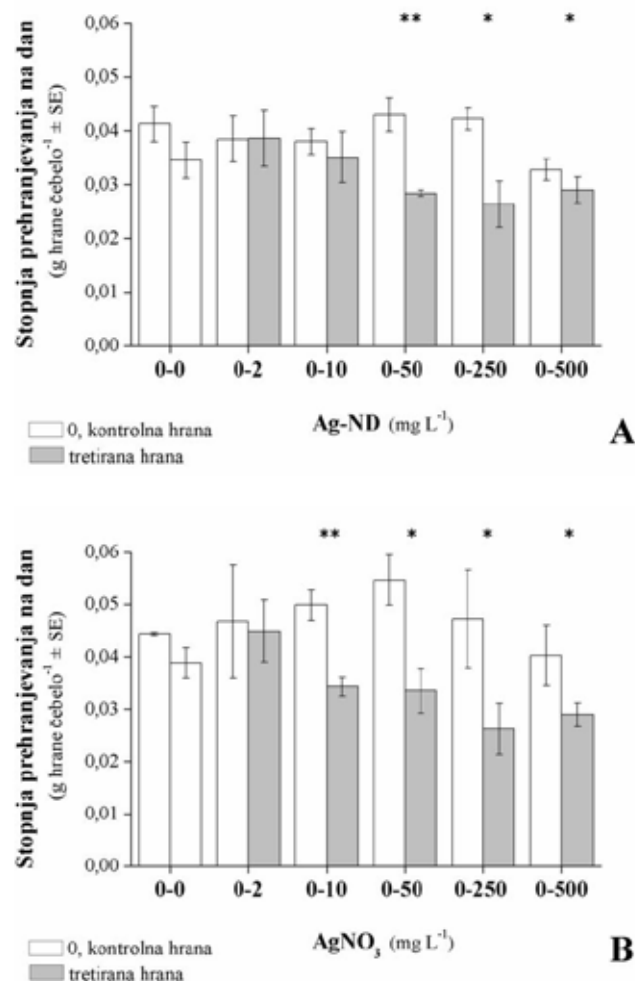
REZULTATI Z RAZPRAVO

Akutni 24 h poskus z izbiro hrane

Ugotovili smo, da čebele v obeh primerih, pri Ag-ND in AgNO₃, raje izbirajo saharozno raztopino v primerjavi z raztopino, ki vsebuje Ag-ND ali AgNO₃. V primeru Ag-ND smo očitno izbiro kontrolne hrane oziroma izogib disperziji Ag-ND v saharozni raztopini opazili v primeru 50, 250 in 500 mg L⁻¹; pri AgNO₃ pa že od koncentracije 10 mg L⁻¹ dalje (Slika 1). Med 24-urnim poskusom čebele niso umirale.

Večji izogib AgNO₃ v primerjavi z Ag-ND lahko pripišemo različnemu deležu Ag⁺-ionskih zvrsti v saharoznih raztopinah z AgNO₃. Namreč v primeru AgNO₃ pričakujemo, da se je v raztopini saharoze raztopila vsa sol in je zato vso srebro v ionski obliki. V primeru disperzij Ag-ND pa je delež Ag⁺-ionskih zvrsti 46-48 %. To pomeni, da je v tretmaju z isto koncentracijo Ag v primeru AgNO₃

koncentracija Ag⁺-ionskih zvrsti približno dvakrat večja kot v primeru Ag-ND (Preglednica 1).



Slika 1. Rezultati 24 h poskusa z izbiro hrane. Grafikona prikazujeta količino zaužite saharozne raztopine brez (beli stolpci, kontrolna hrana) ali z dodatkom Ag-ND (A) ali AgNO₃ (B) (sivi stolpci, tretirana hrana). Prikazani sta srednja vrednost in standardna napaka (3 vrednosti za vsak tretma). Zvezdice označujejo statistično razliko v primerjavi s kontrolo ($p < 0.05$).

Da se čebele lahko izogibajo hrani z Ag-ND ali AgNO₃, morajo imeti sposobnost zaznave srebra v raztopinah. Po vsej verjetnosti zaznavajo prisotnost srebrovih ionov, vendar tega s fiziološkimi študijami pri čebelah še niso pokazali. V podobnem poskusu smo Glavan in sod. (2017) pokazali, da so imele čebele raje saharozno raztopino, ki je vsebovala ZnO-ND (in je vsebovala tudi cinkove ionske zvrsti) v primerjavi s čisto saharozno raztopino. Z dodatnimi poskusi smo ugotovili, da po vsej verjetnosti čebele zaznavajo cinkove ionske zvrsti v saharoznih raztopinah (neobjavljeni rezultati). Iwasaki in Sato (1984) ter Keast in sod. (2004) so ugotovili, da ioni nekaterih kovin, kot so cink, baker, kobalt in mangan, inhibirajo zaznavanje

sladkosti saharozne raztopine z moduliranjem delovanja gustatornih receptorjev za sladko. V primeru, da je učinek Ag⁺-ionskih zvrsti na zaznavanje sladkosti podobno inhibitoren, lahko tako razložimo, zakaj so čebele raje posegale po čisti saharozni raztopini, vendar bo to potrebno še eksperimentalno dokazati. Možno pa je tudi, da je izogib srebru posledica učinkov srebrovih ionov na druge fiziološke procese.

Smrtnost v kroničnem poskusu

Smrtnost čebel v kontrolni skupini je bila v obeh poskusih (Ag-ND in AgNO₃) ob koncu 9-dnevne izpostavitve nižja od 15 %, kar je skladno s priporočili v OECD (2016) glede veljavnosti testa. Smrtnost je bila v primeru obeh testnih kemikalij koncentracijsko odvisna, saj je naraščala z naraščajočo koncentracijo Ag-ND ali AgNO₃ v hrani. Smrtnost je bila višja v primeru AgNO₃, saj so že pri koncentraciji 250 mg Ag L⁻¹ poginile vse čebele in je bila tako smrtnost 100%. V tretmajih z Ag-ND pa smo najvišjo smrtnost čebel 34,78% zabeležili pri koncentraciji 500 mg Ag-ND L⁻¹ (Preglednica 1).

Preglednica 1: Smrtnost (v %) čebel Apis mellifera carnica v 9-dnevem kroničnem prehranjevalnem testu s hrano, onesnaženo z nanodelci srebra (Ag-ND) ali srebrovo soljo (AgNO₃). Podane so nominalne koncentracije Ag-ND ali Ag iz AgNO₃ in izmerjene koncentracije Ag⁺-zvrsti v disperziji Ag-ND (mg L⁻¹).

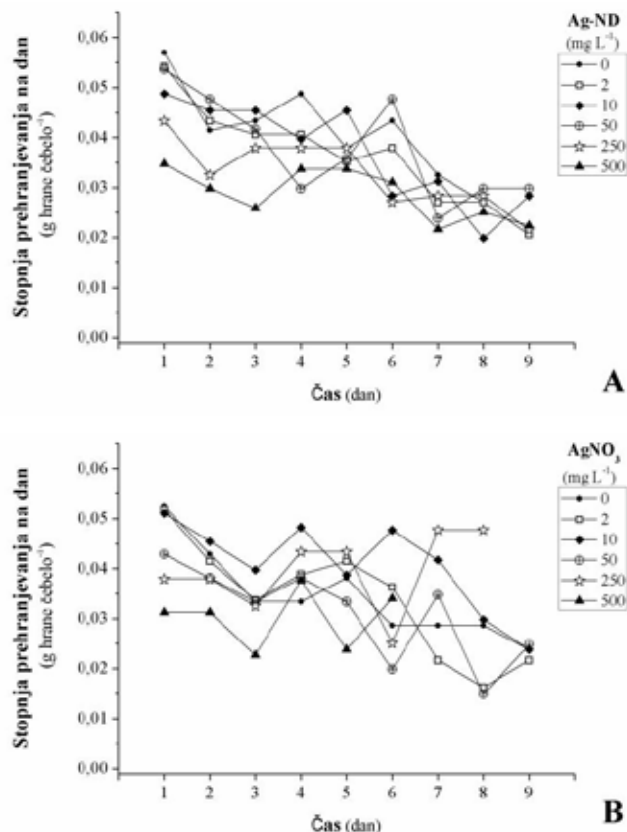
Poskusna snov (mg L ⁻¹)	Število čebel/skupino	Število mrtvih čebel/skupino	Smrtnost (%)
Ag-ND (konc. Ag⁺ zvrsti)			
0	22	0	0,00
2 (0.95)	22	0	0,00
10 (5.16)	21	0	0,00
50 (27.57)	20	0	0,00
250 (108.47)	22	1	4,55
500 (192.67)	23	8	34,78
Ag iz AgNO₃			
0	25	0	0,00
2	23	2	8,70
10	21	1	4,76
50	25	1	4,00
250	22	22	100 (9. dan)
500	20	20	100 (6. dan)

Glede na podatke v literaturi je znano, da večinski delež vpliva Ag-ND na organizme lahko pripišemo delovanju Ag⁺, le majhen delež pa delovanju delcev samih (Jemec in sod., 2016). Zato podobno kot v primeru akutnega testa

lahko razliko v opaženem učinku med Ag-ND in AgNO₃ pripišemo deležu Ag⁺-zvrsti v posamezni testni snovi. Naši rezultati preživetja (100% preživetje do 50 mg/L) so primerljivi z raziskavo vpliva Ag-ND na čebele, kjer so ugotovili, da je bilo po 11 dneh tretiranja z 25 mg Ag-ND L⁻¹ preživetje čebel 75 % (Borsuk in sod., 2013). Vendar pa so direktne primerjave med študijami z Ag-ND težke, saj avtorji ne podajajo podatka o koncentraciji prostih Ag⁺. Drugih podobnih raziskav v zvezi s preživetjem po tretiranju z Ag-ND ali AgNO₃ na čebelah po našem vedenju še ni bilo objavljenih.

Stopnja prehranjevanja v kroničnem poskusu

Rezultate prehranjevanja smo podali kot količino zaužite hrane na živo čebelo na dan (zaužite hrane/živo čebelo/dan), kar je najbolj točen način glede na sprotno umiranje čebel med poskusom. Opazili smo, da so čebele v obeh primerih; t.j. Ag-ND ali AgNO₃, tekom poskusa postopoma zmanjševale količino zaužite hrane. Zmanjševanje stopnje prehranjevanja je bila v obeh primerih zelo podobna (Slika 2). V primeru Ag-ND smo izračunali tudi kumulativno količino hrane zaužite v 9 dneh podano na



Slika 2. Rezultati prehranjevanja v 9-dnevem kroničnem poskusu s čebelami Apis mellifera carnica. Prikazana je količina zaužite hrane/dan/živo čebelo v primeru Ag-ND (A) ali AgNO₃ (B). Prikazane so srednje vrednosti.

žive čebele. Ugotovili smo, da je prehranjevanje po 9 dneh statistično značilno manjše (t-test, $p < 0,05$) od kontrole pri najvišjih dveh tretmajih, t.j. za 16% in 27% pri 250 in 500 mg L⁻¹, v istem vrstnem redu. V primeru AgNO₃ pa je bil izračun kumulativno zaužite hrane nerealen zaradi večjega sprotnega umiranja čebel, zato ga tu ne podajamo. Zmanjšana stopnja prehranjevanja je lahko odraz negativnih učinkov Ag-ND in AgNO₃ na zdravje čebel.

Primerjava naših rezultatov s koncentracijami srebra v okolju ter v pripravkih koloidnega srebra na tržišču

Trenutno pričakovane okoljske koncentracije Ag-ND, ocenjene na podlagi trenutnih trendov proizvodnje in uporabe, so zelo nizke (Gottschalk in sod., 2015). Ocenjuje se namreč, da je koncentracija Ag-ND v izpuhkih iz čistilnih naprav v območju med 0,01 in 60 ng L⁻¹, največja pa v aktivnem blatu, in sicer 4-250 µg kg⁻¹. V primeru čebelje paše ne pričakujemo tako visokih koncentracij Ag-ND kot smo jih uporabili v tej študiji. V tej študiji smo izbrali zelo visoke koncentracije, saj smo želeli ugotoviti, pri katerih tretmajih opazimo kvarne učinke, poleg tega nas je

zanimala primerjava s koloidnim srebrom, ki je v prosti prodaji.

Na tržišču je trenutno zelo veliko različnih proizvodov, ki vsebujejo koloidno srebro in se oglašujejo za vsestransko uporabo. Koncentracija koloidnega srebra, ki jih navajajo proizvajalci, se gibljejo v območju 10-40 mg L⁻¹ (vir www.amazon.com; proizvajalci Koloidales Silber Argentum200; Silver 25, VivoITA; Healthyody inc.; Kaiame Naturals Colloidal Silver; Organa; NutriNoche). Vendar pa iz deklaracij ni jasno, ali gre za koncentracije Ag delcev ali Ag⁺ ionov. Tudi velikost delcev ter stabilizatorji navadno niso podani, tako ni jasno ali gre za nanodelce ali njihove precej večje agregate. Poleg tega nismo uspeli pridobiti podatkov o tem, če in katere koloidne pripravke pri nas uporabljajo čebelarji. Če upoštevamo koncentracije srebra v koloidnem srebrom, ki je v prosti prodaji, lahko glede na naše rezultate zaključimo, da se negativni učinki na čebele pokažejo pri 10x višjih koncentracijah. Poudariti je potrebno, da to velja za 9-dnevno tretiranje čebel, podaljševanje izpostavitve pa zelo verjetno še poveča smrtnost pri čebelah.

ZAKLJUČEK

V raziskavi smo ugotovili, da je 9-dnevno kronično hranjenje čebel s saharozno raztopino, ki vsebuje Ag-ND, škodljivo za čebele pri koncentraciji 500 mg Ag-ND L⁻¹, pri AgNO₃ pa v primeru 250 mg Ag L⁻¹. Pri tem smo ugotovili tudi zmanjšano stopnjo prehranjevanja, ki je verjetno odraz negativnih učinkov Ag-ND ali AgNO₃ na zdravje čebel. Pokazali smo tudi, da čebele raje izbirajo saharozno raztopino v primerjavi s saharozno raztopino, ki vsebuje Ag-ND ali AgNO₃, za AgNO₃ je bilo tako vedenje opaženo že pri nižjih koncentracijah. To pomeni, da so čebele sposobne zaznavati srebro, verjetno srebrove ione, v raztopini saharoze. V preliminarnih poskusih smo ugotovili tudi vplive Ag-ND na aktivnost encima, ki je vpleten v delovanje živčevja (acetilholinesteraze; AChE) in na aktivnost encima za razstrupljanje glutation S-transferaze (GST) (neobjavljeni rezultati). Aktivnost encima GST, ki

je pokazatelj zastrupitve, je bila povišana že pri najnižji koncentraciji Ag-ND. Aktivnost encima AChE v glavah čebel je bila povišana pri vseh izpostavitvenih koncentracijah Ag-ND, ki smo jih uporabili v raziskavi, kar kaže na učinke na živčni sistem.

Če upoštevamo koncentracije srebra v koloidnem srebrom, ki je v prosti prodaji, lahko glede na naše rezultate zaključimo, da se negativni učinki na čebele pokažejo pri 10x višjih koncentracijah. Vendar je potrebno poudariti, da se Ag ioni v čebelah lahko tudi kopičijo, kar lahko dolgoročno vpliva na njihovo preživetje. Glede na naše rezultate in zapisano razpravo je raba Ag-ND v prehrani čebel potencialno nevarna, seveda pa tudi nelegalna, saj ni nobenega registriranega veterinarskega pripravka na osnovi Ag-ND za namen zdravljenja katerekoli bolezni čebel.

ZAHVALA

Raziskava je bila financirana s strani Agencije za raziskovalno dejavnost RS (raziskovalni program: P1-0184).

Zahvaljujemo se doc.dr. Primožu Zidarju za pomoč pri zasnovi poskusa.



LITERATURA

- Ahn AJ, Ahn KS, Suh GH, Noh JH, Kim YH, Yoo MS, Kang SW, Shin SS, 2015. Efficacy of silver ions against Sacbrood virus infection in the Eastern honey bee *Apis cerana*. *J Vet Sci.*, 16(3): 289-295.
- Borsuk G, Paleolog J, Olszewski K, Strachecka A, 2013. Laboratory assessment of the effect of nanosilver on longevity, sugar syrup ingestion, and infection of honeybees with *Nosema* spp.. *Med. Weter.*, 69: 730-732.
- Culha M, Kalay S, Sevim E, Pinarbas M, Bas Y, Akpınar R, Karaoglu SA, 2017. Biocidal properties of maltose reduced silver nanoparticles against American foulbrood diseases pathogens. *Biometals*, 30: 893-902.
- Glavan G, Milivojević T, Božič J, Sepčić K, Drobne D, 2017. Feeding preference and sub-chronic effects of ZnO nanomaterials in honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 72(3): 471-480.
- Gottschalk F, Lassen C, Kjoelholt J, Christensen F, Nowack B, 2015. Modeling flows and concentrations of nine engineered nanomaterials in the Danish environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(5): 5581-5602.
- Imdorf A, Bogdanov S, Ibáñez Ochoa R, Calderone NW, 1999. Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie*, 30: 209-228.
- Ivask A, Juganson K, Bondarenko O, Mortimer M, Aruoja V, Kasemets K, Blinova I, Heinlaan M, Slaveykova V, Kahru A, 2014. Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: a comparative review. *Nanotoxicology*, Suppl 1:57-71.
- Iwasaki K, Sato M, 1984. Inhibitory effects of some heavy metal ions on taste nerve responses in mice. *Jpn J Physiol.*, 34(5): 907-918.
- Jemec A, Kahru A, Potthoff A, Drobne D, Heinlaan M, Böhme S, Geppert M, Novak S, Schirmer K, Rekulapally R, Singh S, Aruoja V, Sihtmae M, Juganson K, Kallinen A, Singh S, 2016. An interlaboratory comparison of nanosilver characterisation and hazard identification: harmonising techniques for high quality data. *Environment International*, 87: 20-32.
- Keast RS, Canty TM, Breslin PA, 2004. Oral zinc sulfate solutions inhibit sweet taste perception. *Chem Senses.*, 29(6): 513-521.
- Khan SU, Anjum SI, Ansari MJ, Khan MHU, Kamal S, Rahman K, Shoaib M, Manh S, Khan AJ, Khan SU, Khan D, 2018. Antimicrobial potentials of medicinal plant's extract and their derived silver nanoparticles: A focus on honey bee pathogen. *Saudi Journal of Biological Sciences* (In press). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.02.010>
- Kos M, Jemec Kokalj A, Glavan G, Zidar P, Marolt G, Novak S, Božič J, Drobne D, 2017. Biochemical and behavioural responses of the honeybees *Apis mellifera carnica* to cerium (IV) oxide nanoparticles via dietary exposure. *Environmental Science: Nano*, 4: 2297-2310.
- Neumann P, Carreck C, 2010. Honey bee colony losses: a global perspective *J. Apic. Res.*, 49: 1-6.

PRVI DOKAZ PRISOTNOSTI VIRUSA LAKE SINAI PRI ČEBELAH IN ČMRLJIH V SLOVENIJI

Laura ŠIMENC¹, Urška KUCHAR, Urška JAMNIKAR CIGLENEČKI, Ivan TOPLAK

Izvleček

O prisotnosti virusa Lake Sinai (LSV) v Sloveniji do te študije nismo imeli nobenih podatkov. Ta virus smo prvič ugotovili v arhivskem vzorcu čebelje družine iz leta 2010 v katerem smo s tehnologijo NGS določali genom virusa kronične paralize čebel (CBPV). Da bi ugotovili razširjenost LSV v Sloveniji, smo od oktobra 2016 do januarja 2018 zbrali 56 vzorcev čebel iz klinično prizadetih čebeljih družin in 41 vzorcev klinično zdravih čmrljev iz petih različnih lokacij po Sloveniji ter jih s specifično metodo RT-PCR pregledali na prisotnost LSV. S tehnologijo Ion Torrent NGS smo določili celotni genom virusa Lake Sinai iz vzorca umrlih čebel s paralizo. Zaporedje celotnega genoma virusa LSV iz vzorca M92/2010 obsega 5.926 nukleotidov in je prvo zaporedje celotnega genoma genetske linije LSV 3 v genski banki. Temu genomu je najbolj podoben genom LSV iz Avstralije iz leta 2014 (KY465717), oba genoma se ujemata v 86 %. Med leti 2016 in 2018 smo ta virus dokazali v 75,92 % pregledanih vzorcev čebel in v 17,07 % pregledanih čmrljev. S filogenetsko analizo 557 nukleotidov dolge regije genoma, ki kodira polimerazo RNA smo primerjali 22 pozitivnih vzorcev čebel in 3 pozitivnih vzorcev čmrljev ter dokazali 3 različne genetske linije LSV. Ugotovili smo tudi, da so virusni sevi, ki smo jih ugotovili pri čmrljih, identični sevom pri čebelah.

Ključne besede: čebele, čmrlji, virus Lake Sinai, celotni genom, sekvenciranje naslednje generacije

FIRST DETECTION OF LAKE SINAI VIRUS IN HONEYBEES AND BUMBLEBEES IN SLOVENIA

Abstract

No data regarding Lake Sinai bee virus (LSV) infections was available for our country until this study. The first positive sample of LSV in Slovenia (M92/2010) was discovered from an archive honeybee sample collected in 2010 in which we were discovering a genome of chronic bee paralysis virus (CBPV) with next generation sequencing technology. To reveal LSV occurrence in Slovenia we collected 56 honeybee samples with clinical signs of disease and 41 samples of healthy bumblebees from five different locations throughout Slovenia. Samples were tested with a specific RT-PCR method for the detection of LSV RNA. The complete genome sequence of the LSV M92/2010 strain consists of 5.926 nucleotides and is the first determined complete genome sequence of LSV3 lineage, with 86% nucleotide identity to the most closely related strain NT-LSV3 from Australia (KY465717). Between the years 2016 and 2018 we proved LSV in 75,92 % of honeybee samples and in 17,07 % of bumblebee samples. With phylogenetic analysis of 557 nucleotides long genome region for RNA depended RNA polymerase of 22 LSV positive honeybee samples and 3 positive bumblebee samples we discovered 3 different lineages of LSV in Slovenia. We also proved that circulating strains of LSV in honeybees and bumblebees are identical.

Key words: honeybees, bumblebees, Lake Sinai virus, genome, next generation sequencing

¹ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenija; laura.simenc@vf.uni-lj.si

UVOD

LSV so prvič opisali leta 2008 pri čebelah blizu jezera Sinai v Združenih državah Amerike. Njegovo prisotnost so ugotovili z metodo sekvenciranja naslednje generacije (NGS, angl. Next Generation Sequencing). Raziskovalci so kasneje odkrili več genetskih linij tega virusa tako v ZDA, kot tudi v Španiji, Belgiji in Turčiji, pri različnih vrstah čebel in čmrljev (Runckel in sod., 2011).

LSV je čebelji virus, o katerem še ni dosti znanega. Genom virusa predstavlja enovijačna pozitivno polarna molekula RNA. Poznanih je že skupno 33 celotnih genomov tega virusa, prav tako pa tudi nekaj odsekov genoma tega virusa (vir: GenBank, 1.9.2018)

Različni sevi LSV so genetsko zelo raznoliki in so razdeljeni na več genetskih linij, od LSV1 do LSV8, nekateri sevi LSV pa ostajajo še ne klasificirani (Daughenbaugh in sod., 2015). Glede prenosa, delovanja ter patogenosti tega virusa je še zelo malo znanega. Na podlagi dosedanjih ugotovitev se predvideva, da je virus nizko patogen, saj okužba pri čebelah poteka prikrito. Ni pa natančneje bilo proučeno, kakšne so posledice mešanih okužb z drugimi čebeljimi virusi in kako te kombinacije virusov vplivajo na čebele in čebelje družine. Prav tako ni še dosti znanega o prenosu virusa LSV med čebelami in čmrlji ter drugimi opraševalci (Fürst in sod., 2014).

Ker LSV v Sloveniji še nismo ugotavljali, smo se odločili, da v tej študiji specifično metodo RT-PCR pregledamo manjše število vzorcev čebel in čmrljev. Pozitivnim vzorcem čebel in čmrljev smo določili nukleotidno zaporedje v zelo ohranjenem delu virusnega genoma in jih primerjali z ostalimi sevi iz genske banke.

MATERIALI IN METODE

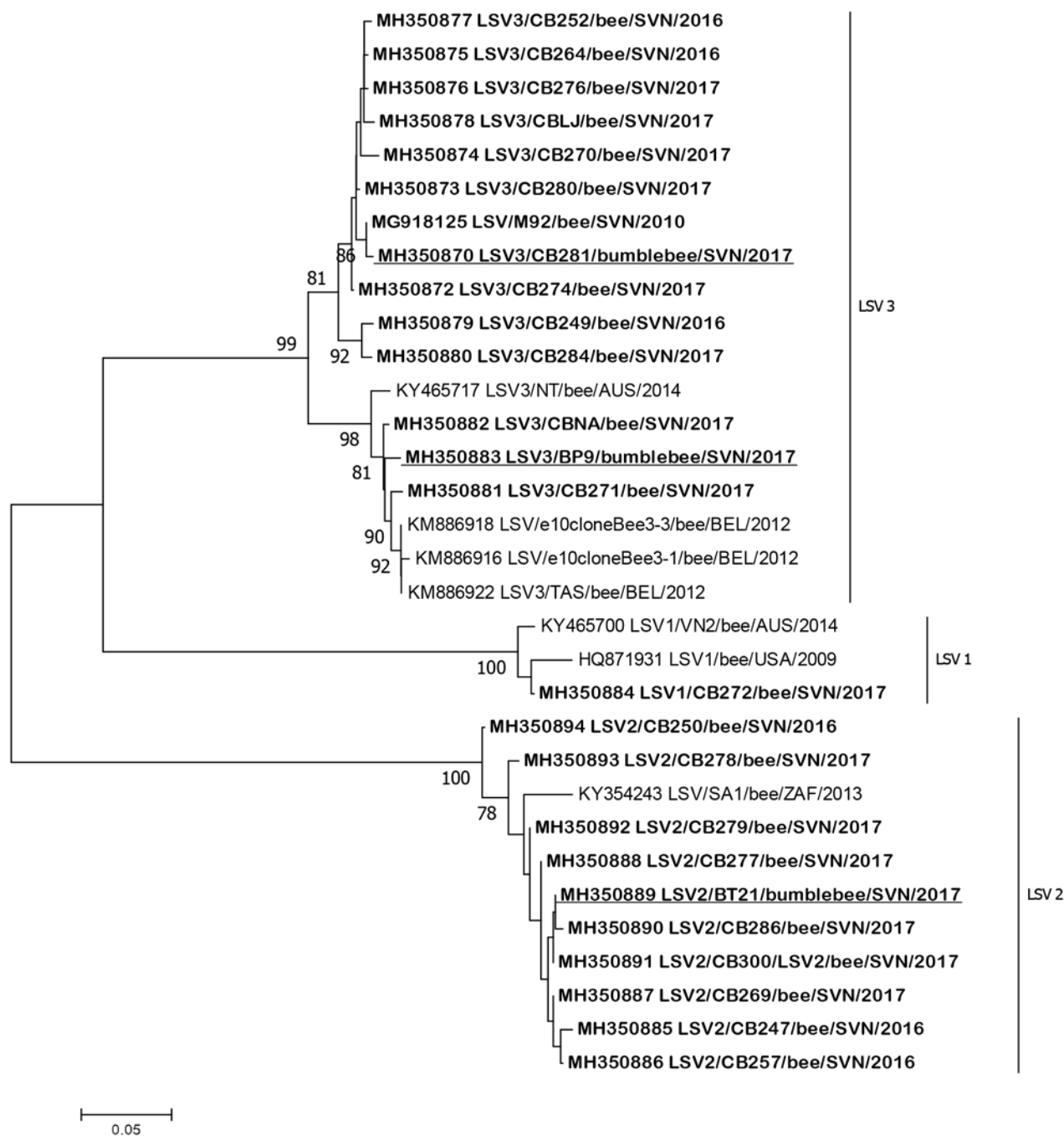
Od oktobra 2016 do januarja 2018 smo zbrali 56 vzorcev čebel iz klinično prizadetih čebeljih družin poslianih na preiskavo na 5 čebeljih virusov iz 32 različnih lokacij in 41 vzorcev klinično zdravih čmrljev iz 5 različnih lokacij po Sloveniji ter jih s specifično metodo RT-PCR pregledali na prisotnost LSV. Vzorce smo do začetka preiskave zamrzili na < -50 °C. 10 čebelam iz posameznega vzorca smo dodali 5 ml medija RPMI (Gibco, Velika Britanija) in jih homogenizirali v epruveh z Ultra-Turrax DT-20 (IKA, Nemčija), ter centrifugirali 15 min pri 2500 g. Podobno smo pripravili vzorce čmrljev, le da smo 1 čmrlju dodali 3 ml medija RPMI in vsakega čmrlja testirali posebej. Celokupno RNA smo izolirali iz suspenzije posame-

znega vzorca s kompletom QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Nukleinsko kislino LSV smo dokazovali z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) po postopku, ki je bil predhodno opisan (Toplak in sod., 2012). Uporabili smo predhodno opisane oligonukleotidne začetnike za RdRp regijo virusnega genoma: LSV1765-F in LSV2368-R (Ravoet in sod., 2015). Rezultate smo ovrednotili na podlagi velikosti produktov RT-PCR v agaroznem gelu kot pozitivne v primeru pričakovane velikosti produkta, 603 nukleotide za LSV. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 5 združenih močno pozitivnih vzorcev čebel, kot negativno kontrolo pa RPMI. V primeru pozitivnega rezultata smo produkte RT-PCR posameznega virusa direktno sekvencirali po Sangerju. Za sekvenciranje celotnega genoma LSV M92/2010 smo uporabili metodo next generation sequencing (NGS), ki je bila predhodno opisana (Jamnikar-Ciglencečki in sod., 2017). Urejena nukleotidna zaporedja slovenskih sevov LSV in sevov, pridobljenih iz genske banke, smo analizirali s programi iz programskega paketa MEGA, verzija 7 (Kumar et al., 2016). Nukleotidna zaporedja smo poravnali s programom ClustalW (Thompson in sod., 1994). Za posamezne pare nukleotidnih zaporedij smo s programom MEGA na podlagi modela p-distance izračunali matriko genetskih razdalj (angl. pairwise distances). Filogenetska drevesa smo poiskali z uporabo metode povezovanja s sosedom (angl. Neighbor-Joining, NJ) (Saitou in Nei, 1987). Za iskanje dreves s prej omenjenima metodama smo uporabili evlucijski model Kimura 2. Z metodo samovzorčenja (angl. bootstrapping) s 1000 ponovitvami smo ocenili zanesljivost filogenetskih dreves.

REZULTATI Z RAZPRAVO

Prvi pozitivni rezultat LSV v Sloveniji smo dobili v arhivskem vzorcu čebel iz leta 2010 z metodo NGS. Zaporedje celotnega genoma LSV iz vzorca M92/2010 obsega 5.926 nukleotidov in je prvo zaporedje celotnega genoma genetske linije LSV 3 v genski banki. Temu genomu je najbolj podoben genom LSV iz Avstralije iz leta 2014 iz genske banke (KY465717), oba genoma sta si identična v 86 % (vir: GenBank).

Z metodo RT-PCR smo ugotovili prisotnost nukleinske kisline virusa LSV v 41 (75,92 %) od 56 pregledanih vzorcev čebel. Prisotnost LSV smo z metodo RT-PCR dokazali tudi v 7 (17,07 %) od 41 pregledanih čmrljev. Podobno raziskavo so naredili tudi v Belgiji, kjer so ugotovili prisotnost LSV pri 21,1 % čmrljev (Parmentier in sod. 2016). S filogenetsko analizo 22 pozitivnih vzorcev čebel in 3



Slika 1: Filogenetska primerjava 557 nukleotidov dolgih zaporedij regije, ki kodira polimerazo RNA. V to primerjavo je vključenih 21 naših vzorcev čebel in 3 vzorci čmrljev sekvenciranih po Sangerju, celotni genom arhivskega vzorca iz leta 2010 (M92-2010) in najbližje sorodni vzorci LSV iz tujine (Belgije, Avstralije, Združenih držav Amerik in Južne Afrike).

vzorci čmrljev smo ugotovili, da lahko naše seve LSV uvrstimo v tri različne genske linije: LSV1, LSV2 in LSV3. S filogenetsko primerjavo smo ugotovili veliko genetsko raznolikost sevov LSV v Sloveniji. V zelo ohranjenem delu virusnega genoma, ki kodira RNA polimerazo imajo med seboj od 76,4 do 99,6 % identičnost nukleotidnega zaporedja. Primerjava s sevi iz genske banke je pokazala, da so naš sevi genetsko najbolj identični virusnim sevom iz Belgije (98,9 %), Avstralije (97,8 %), Združenih držav

Amerike (97,6 %) in Južne Afrike (96,9 %). Ugotavljamo tudi, da so virusni sevi pri čmrljih genetsko identični sevom pri čebelah, 98,7-99,6 % (Slika 1), kar je primerljivo z raziskavami v tujini, kjer so našli tako pri čebelah kot pri divjih čebelah in čmrljih identične seve LSV (Parmentier in sod. 2016).

Ugotavljamo, da so sevi LSV tudi v Sloveniji genetsko zelo raznoliki, podobno kot so to odkrivali v tujini, saj smo na majhnem področju, kot je Slovenija odkrili naj-

manj 3 različne genetske linije LSV (Daughenbaugh KF, 2015). Zanimivo in na nek način tudi razumljivo je, da si čebele in čmrlji delijo enake virusne seve, saj se med seboj srečujejo na istih cvetlicah na paši.

Iz izvedene študije ne moremo sklepati, ali LSV povzroča kakšno klinično sliko pri čebelah ali čmrljih, vendar je splošno znano, da čebelji virusi, ki imajo veliko število

genetskih različic niso visoko patogeni. Za LSV še ni znano, ali povzroča kakršne patološke spremembe oziroma povzroča izgube v populaciji čebel in čmrljev. Vprašanje pa je ali ta virus ima kakšen vpliv pri oslabljenih čebeljih družinah, pri močnih okužbah z varojo ali pri mešanih okužbah z večjim številom virusov.

ZAKLJUČEK

Prvič smo dokazali prisotnost LSV pri čebelah in čmrljih v Sloveniji. Dokaz LSV v arhivskem vzorcu potrjuje, da je bil virus prisoten pri nas že leta 2010. Prvi smo določili celoten genom LSV3 in ga poslali v gensko banko. Med leti 2016 in 2018 smo ta virus dokazali v visokem odstotku pregledanih vzorcev čebel (75,92 %) in v manjšem odstot-

ku pregledanih čmrljev (17,07 %). S filogenetsko primerjavo delov genoma LSV smo ugotovili, da so pri čebelah in pri čmrljih prisotni isti sevi LSV, ki jih lahko uvrstimo v 3 različne genetske linije LSV1, LSV2 in LSV3, kar govori o veliki genetski raznolikosti sevov LSV po Sloveniji.

ZAHVALA

Zahvalili bi se veterinarjem, ki so pomagali z zbiranjem vzorcev prizadetih čebel Alenki Jurič, mag. Miri Jenko Rogelj, Suzani Skerbiš, mag. Vidi Lešnik, mag. Ivu Planincu, Martini Škof, Mateji Ratiznojnik in Aniti Vraničar Novak. Zahvala gre tudi Danilu Bevku, ki je vzorčil zdrave čmrlje, da smo lahko ugotovili dragoceno primerjavo med

prenosom virusov med tima dvema vrstama pomembnih opraševalcev rastlin. Zahvalili pa se bi tudi Dr. Danijeli Rihtarič, Poloni Žagar in Nataliji Novak, ki so pomagale pri laboratorijskih preiskavah dokazovanja čebeljih virusov. Opravljene raziskave so financirane iz sredstev Programske skupine P4-0092.

LITERATURA

- Daughenbaugh KF, Martin M, Brutscher LM, Cavigli I, Garcia E, Lavin M, Flenniken ML. Honey Bee Infecting Lake Sinai Viruses. *Viruses* 2015, 7, 3285-3309.
- Fürst MA, McMahon DP, Osborne JL, Paxton RJ, Brown MJF. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* 2014; 506: 364-366.
- Jamnikar-Ciglencčki U, Toplak I, Kuhar U. Complete genome of chronic bee paralysis virus strain SLO/M92/2010, detected from *Apis mellifera carnica*. *Genome Announcements* 2017; 5: e00602-17.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33, 1870-1874.
- Parmentier L, Smagghe G, De Graaf DC, Meeus I. Varroa destructor Macula-like virus, Lake Sinai virus and other new RNA viruses in wild bumblebee hosts (*Bombus pascuorum*, *Bombus lapidaries* and *Bombus pratorum*). *Journal of Invertebrate Pathology* 2016; 134 6-11.
- Ravoet J, De Smet L, Wenseleers T, De Graaf DC. Genome sequence of Lake Sinai Virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphism in a single host. *Virus Res* 2015; 201: 67-72.
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, DeRisi JL. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, Crithidia. *PLoS ONE* 2011,6, e20656.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-5.
- Toplak I, Rihtarič D, Jamnikar Ciglencčki U, Hostnik P, Jenčič V, Barlič-Maganja D. Detection of six honeybee viruses in clinically affected colonies of Carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slov Vet Res* 2012; 49: 83-91.

DELOVANJE ZDRAVILA VARROMED® ZA ZATIRANJE VAROJ (*Varroa destructor*) POZIMI OB UMETNI PREKINITVI ZALEGANJA V JUŽNI EVROPI

Jorge RIVERA-GOMIS, Marco PIETROPAOLI, Giovanni FORMATO¹

Izvleček

Zajedavec *Varroa destructor* je eden od najpomembnejših povzročiteljev bolezni čebel (*Apis Mellifera* Linnaeus). Za njegovo zatiranje je na voljo veliko različnih učinkovin in načinov, nobeden pa ni popoln in si zato neprestano prizadevamo za učinkovitejše in za človeka, čebele ter okolje tem bolj sprejemljive načine zatiranja. Akaricide delimo v dve skupini: sintetične in akaricide na osnovi naravnih kislin ter eteričnih olj. Prvi so običajno zelo učinkoviti, vendar puščajo ostanke v vosku in medu, zajedavci pa postajajo nanje odporni. Na drugi strani pa so akaricidi, ki vsebujejo substance, ki se lahko uporabljajo v ekološkem čebelarstvu, za okolje sprejemljivejše in je tveganje za njihove ostanke manjše, vendar pa je njihova učinkovitost nižja in med čebeljimi družinami neizenačena. Od leta 2017 je v ES registrirano zdravilo VarroMed®, v katerem sta aktivni učinkovini oksalna in mravljinčna kislina. V raziskavi smo proučevali učinek zdravila VarroMed® za zimsko zatiranje varoj v Južni Evropi. Poskus smo izpeljali ob umetni prekinitvi zaleganja s priprtjem matice. Srednja vrednost učinkovitosti v skupini zdravljeni z zdravilom VarroMed® je bila $95.6\% \pm 3.5\%$, v kontrolni skupini pa je odpad varoj znašal $8.6\% \pm 7.3\%$. Rezultati kažejo visoko učinkovitost zdravila VarroMed®, ko v čebelji družini ni zalege. V nadaljevanju bo potrebno podobne študije opraviti v različnih klimatskih pogojih.

Ključne besede: zimsko zatiranje varoj, učinkovitost, VarroMed®, prekinitev zaleganja, zapiranje matice

VarroMed® PERFORMANCES IN SOUTHERN EUROPE FOR *Varroa destructor* CONTROL IN HONEYBEE (*Apis mellifera*) COLONIES DURING WINTER WITH ARTIFICIAL BROOD INTERRUPTION

Abstract

Varroa destructor is one of the most important pathogens of honeybee (*Apis Mellifera* Linnaeus). Many different compounds and techniques are used in order to control this parasite. Even though the perfect acaricide does not exist, continuative efforts are done towards more sustainable and respectful (for human, bees and the environment) products. Acaricides can be divided in two groups: synthetic acaricides and organic acaricides. Usually the first ones have a high and homogenous efficacy, but residues can be found in wax and honey. Furthermore, mite population is acquiring resistance to these chemicals. Organic compounds, on the other hand, are more environment friendly and present a low risk of residues, but their efficacy is frequently lower and more variable among colonies. VarroMed® is a varroacide product authorized in EU since 2017. The active principles are oxalic and formic acid. In this study, performances of VarroMed® were evaluated against *V. destructor* in Southern Europe. The trial was carried out in colonies after an artificial brood interruption period induced by queen caging. The mean acaricidal efficacy in the group treated with VarroMed® was $95.6\% \pm 3.5\%$, while the mite fall in the control group was $8.6\% \pm 7.3\%$. The results showed a high efficacy of VarroMed® in absence of brood. Further studies should be carried out in order to evaluate the VarroMed® performances in different climatic conditions.

Key words: winter treatment, efficacy, VarroMed®, brood interruption, queen caging

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri", Rome, Italy, e-mail: giovanni.formato@izslt.it

INTRODUCTION

Varroa destructor is one of the most important pathogens of honeybee (*Apis Mellifera* Linnaeus). Many different acaricide compounds and techniques are used in order to control this parasite.

Even though the perfect acaricide does not exist, continuous efforts are done towards always more sustainable and respectful (for human, bees and the environment) products. Acaricides can be divided in two main groups: synthetic acaricides and organic acaricides (Rosenkranz et al., 2010). Usually the first have a high and homogenous efficacy, but residues can be found in wax and honey. Furthermore, resistance of the mite population to these chemicals has been reported (Milani, 1995). Organic acaricides, on the other hand, are more environmentally friendly and have a low risk of residues, but frequently their efficacy is lower and more variable among colonies.

VarroMed® (BeeVital GmbH) is a varroacide product authorized in EU since 2017. It is based on organic acids and can be used during the whole year in presence or absence of brood.

An effective way of increasing the efficacy of acaricide products is their use during a broodless period, that can be induced artificially. A summary of different techniques to have broodless colonies can be found in Box 1.

The goals of our field trial was to evaluate the performance of VarroMed® during winter in a temperate area in combination with an artificial brood interruption period.

Materials and methods

The active principles of VarroMed® are oxalic dihydrate (44mg/ml) and formic acid (5mg/ml).

In this study, performances of VarroMed® were evaluated against *V. destructor* in Italy, Southern Europe during Ja-

nuary and February 2018 in central Italy.

Due to the absence of broodless conditions during winter in central Italy, an artificial brood interruption was provided by caging all the queens in VAR-CONTROL® cages 21 days before the VarroMed® treatment was performed.

We assessed the variation in colony strength in both groups by using the Liebefeld method (Delaplane et al., 2013). One group was treated with VarroMed® following the indications of the producer for winter treatment (Figure 3), and the other one was left untreated following the protocol reported in Figure 4.

The mite fall was quantified by changing the sticky sheets in the bottom board every 2-3 days during the whole period of the trial. The residual amount of mites was evaluated with a follow up treatment combining a single dose of both amitraz and fluvalinate.

Results and discussion

The mean acaricide efficacy in the treated group with VarroMed® was $96.6\% \pm 3.5\%$ (n=9), while the mite fall in the control group was $8.6\% \pm 7.3\%$ (n=9). There was a significant statistically difference between both groups ($p < 0.0001$). The mean amount of varroa mites at the end of the treatment was 408 mites/colony.

There was no significant variation in the colony strength of the colonies (p-value (Two-tailed) = 0.689).

Temperature ranged from 0°C to 12°C and relative humidity ranged from 22% to 100%. As VarroMed® is advised at any time of the year, these conditions should be valid for the use of the product.

The high acaricidal efficacy observed in our trial ($95.6\% \pm 3.5\%$) was similar to other acaricidal treatments in absence of brood (Rosenkranz et al., 2010). This fact could be attributed to the presence of oxalic acid in the

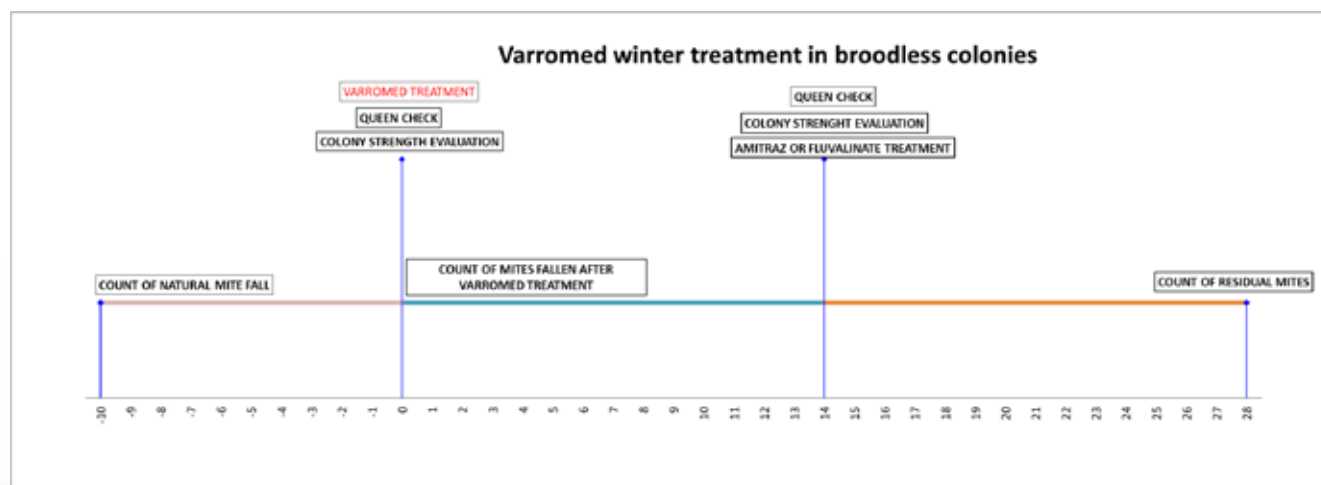


Figure 3- Protocol for the treated group

Inducing a brood interruption period into honeybee colonies forces the varroa mites to stay in the phoretic phase. This condition renders all varroa mites vulnerable to treatments with acaricide products like oxalic acid and thymol. Therefore, combining a brood interruption period with an acaricidal treatment boosts the acaricidal efficacy (until around 90% efficacy) (Rosenkranz et al., 2010; Giacomelli et al., 2016), protecting our bees from the effects of the varroa mite infestation. The brood interruption alone, as beekeeping technique, has an acaricidal efficacy that is around 40% (Giacomelli et al., 2016).

Brood interruption can be obtained by different techniques:

-Brood removal: You can remove all frames with brood making sure that the queen remains in the beehive with the majority of adult bees, then you can treat with an acaricidal product. You can form nucs with the brood frames removed and treat them with a product effective on the varroa inside the brood (e.g. formic acid based products), or you can wait until a new queen emerges and perform another treatment in absence of brood, before receptive brood is present in the nuc.

-Queen caging on a comb (Figure 1): Caging the queen on a comb will allow the queen to continue laying eggs (but only in that comb), while the rest of the brood will emerge. You should remove that comb the 20th day after the queen caging, and you should treat the



Figure 1- Queen caging in a comb with possibility of laying eggs



Figure 2- Cage with queen caged inside without possibility of laying eggs

day 21st (if there was no drone brood the 1st day) or the day 25th (if drone brood was present the 1st day) with an acaricidal product.

-Queen caging on a cage without possibility of laying eggs: Caging the queen in a cage that do not allow to lay eggs totally interrupts the presence of brood in the hive, leaving the varroa mites without a shelter and vulnerable to an acaricidal treatment. The cages used for this purpose are similar to that shown in Figure 2, that have small entrances that allow the worker bees to come and go but do not allow the queen to get out. The queen should be freed the 21st day of caging if there was no drone brood the 1st day and the 25th if there was drone brood. The acaricidal treatment should be applied the same day that the queen is freed.

Box 1- Brood interruption techniques

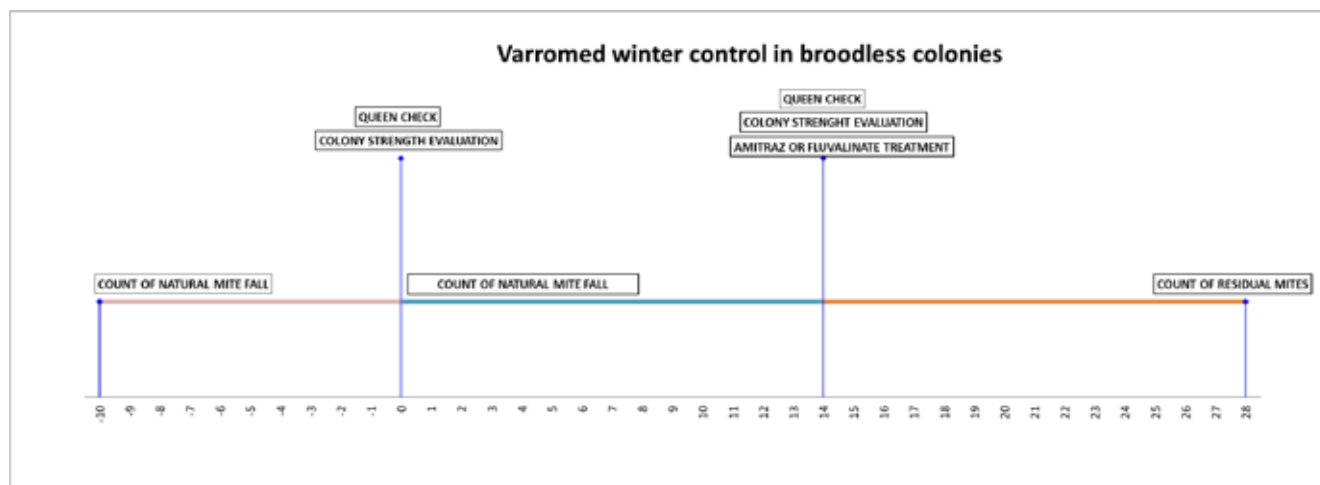


Figure 4- Protocol for the control group

product, that has been proven as an effective acaricide in absence of brood, having an efficacy above 90% (Rosenkranz et al., 2010). However, different results should be expected in a different season of the year due to the pre-

sence of brood, which is known to decrease the efficacy of oxalic acid based acaricidal treatments (Rosenkranz et al., 2010).

CONCLUSIONS

VarroMed® treatment in absence of brood is an effective acaricide against *V. destructor*. Broodless conditions can be naturally present in different climatic areas of Europe, and this condition could be valid to decrease the infestation level of varroa into the colonies and arrive with an

acceptable amount of mites to the next productive season. Even if this condition cannot be naturally present, we verified that adopting the queen caging technique is a valid and effective way to boost the efficacy, ensuring the survival of the colonies.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the beekeepers association of Lati-um region (ARAL) and the Apimondia Secretary-General Riccardo Jannoni-Sebastianini for their kind contribution. We also thank to the COLOSS association, especially the

Working Group “Assessment of new control methods” of the Varroa Control Task Force, for their discussions and suggestions.

REFERENCES

- Delaplane, K. S., van der Steen, J., & Guzman-Novoa, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-12
- Giacomelli, A., Pietropaoli, M., Carvelli, A., Iacoponi, F., & Formato, G. (2016). Combination of thymol treatment (Apiguard®) and caging the queen technique to fight *Varroa destructor*. *Apidologie*, 47(4), 606-616.
- Milani, N. (1995). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie*, 26(5), 415-429
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of invertebrate pathology*, 103, 96-S119

MEDONOSNA ČEBELA IN ČMRLJI SE OKUŽUJEJO Z ISTIMI VIRUSNIMI SEVI

Ivan TOPLAK¹, Laura ŠIMENC¹, Metka PISLAK OCEPEK¹, Danilo BEVK²

Izvleček

Upadanje števila različnih vrst oprasovalcev je lahko med drugim tudi posledica bolezni in dovzetnosti na okužbe z različnimi RNA virusi. V zadnjih letih je vse več dokazov, da bi se nekatere vrste čebeljih virusov lahko prenašale med različnimi vrstami oprasovalcev. V tej študiji smo z molekularnimi metodami izvedli genetsko tipizacijo pozitivnih vzorcev virusa akutne paralize čebel (ABPV), virusa črnih matičnikov (BQCV), virusa mešičkaste zalege (SBV) in virusa Lake Sinai, ki smo jih ugotovili pri čebelah (*Apis mellifera carnica*) in čmrljih (*Bombus lapidarius*, *B. pascuorum*, *B. terrestris*, *B. lucorum*) v Sloveniji. Posamezno vrsto čebeljega virusa smo dokazovali s specifično metodo RT-PCR. V primeru pozitivnega rezultata smo produkte RT-PCR posameznega virusa direktno sekvencirali po Sangerju. S primerjavo od 408 do 783 nukleotidov dolgih odsekov virusnih genomov smo pri čebelah in čmrljih ugotovili od 98,5 do 100 % ujemanje nukleotidnega zaporedja, kar je nedvoumen dokaz, da isti sevi čebeljih virusov okužujejo obe skupini oprasovalcev. Z izvedeno študijo v Sloveniji prvič dokazujemo, da so čebele in čmrlji okuženi z genetsko istimi sevi virusov ABPV, BQCV, SBV in virusom Lake Sinai. Vsekakor bo za uspešnejši nadzor virusnih okužb pri čebelah potrebno tovrstne študije razširiti tudi na druge vrste oprasovalcev.

Ključne besede: čebele, čmrlji, določanje nukleotidnega zaporedja, prenos, epidemiologija

HONEYBEES AND BUMBLEBEES ARE INFECTED WITH THE SAME STRAINS OF VIRUSES

Abstract

The decline of the number of different types of pollinators may be result of disease and susceptibility for infections with various RNA viruses. In recent years there has been growing evidence that certain types of honeybee viruses could be transmitted between different pollinators. In this study, sequencing of positive samples of acute bee paralysis virus (ABPV), black queen cell virus (BQCV), sacbrood bee virus (SBV) and Lake Sinai virus were carried out using molecular methods. Samples were collected and found positive in honeybees (*Apis mellifera carnica*) and bumblebees (*Bombus lapidarius*, *B. pascuorum*, *B. terrestris*, *B. lucorum*) in Slovenia. An individual type of bee virus was proven using a specific RT-PCR method. RT-PCR products of individual viruses were directly sequenced by Sanger method. By comparison 408 to 783 nucleotides of long fragments of viral genomes, we found 98,5 to 100% nucleotide identity in bees and bumblebees, which is clear evidence that the same strains of honeybee viruses are infecting both types of pollinators. This study, conducted in Slovenia, for the first time proves that bees and bumblebees are infected with genetically identical strains of ABPV, BQCV, SBV and Lake Sinai virus. For the successful control of viral infections in bees, further studies should also be extended to other types of pollinators.

Key words: bees, bumblebees, sequencing, transmission, epidemiology

¹ Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Gerbičeva 60, Ljubljana, Slovenija

² Nacionalni inštitut za biologijo, Večna pot 111, Ljubljana, Slovenija



UVOD

Čebele ogrožajo različni patogeni, vključno z virusnimi okužbami (Evans in Schwarz, 2011). Pri medonosnih čebelah (*Apis mellifera*) so opisali že več kot 20 različnih vrst virusov. Najbolj proučevani so virus akutne paralize (ABPV), virus črnih matičnikov (BQCV), virus kronične paralize (CBPV), virus deformiranih kril (DWV) in virus mešičkaste zalege (SBV). Na najbolj patogenih čebeljih virusih, kot so ABPV, CBPV, DWV in SBV so v zadnjem desetletju opravili številne raziskave v zvezi z izginjanjem čebel in ugotavljanjem njihovega vpliva na zdravje čebelje družine. Rezultat povečanega zanimanja in širitev raziskav virusnih okužb čebeljih družin ter uporaba novih tehnologij, kot je naslednja generacija sekvenciranja, je odkritje nekaterih novih virusov, na primer odkritja virusa Lake Sinai v letu 2010. Za nekatere viruse še ni jasno, kakšen vpliv imajo na čebeljo družino, saj imajo virusne okužbe pri čebelah pogosto značaj kronične okužbe (Runckel in sod., 2011).

Dinamika virusnih okužb je preko leta v zdravi čebelji družini velika, najzanesljivejši pokazatelj prisotnosti virusne okužbe pa je pregled vzorcev čebel delavk (Jamnikar Ciglencečki in sod., 2014). Virusne okužbe so v prizadetih čebeljih družinah v Sloveniji pogosto ugotovljene, običajno pa ugotavljamo sočasno prisotnost večjega števila različnih virusov, število pa narašča s klinično sliko prizadete čebelje družine (Toplak in sod., 2010, Toplak in sod., 2012).

Upadanje števila različnih vrst opravevalcev je lahko med drugim tudi posledica delovanja patogenov. Prostoživeči čmrlji (*Bombus* spp.) so poleg čebel med najpomembnejšimi vrstami opravevalcev in so prav tako ogroženi, kot medonosne čebele in druge vrste divjih opravevalcev (Fürst in sod., 2014). V študiji, ki so jo v Veliki Britaniji izvajali na 26 lokacijah so dokazali, da se čebelji virusi (BQCV, DWV, ABPV, slow bee paralysis virus-SBPV) pojavljajo pri čebelah in čmrljih (*Bombus* spp.), z metodo RT-PCR pa so določili različne količine virusa pri čmrljih. Ugotovili so, da je pogostost pojavljanja posameznega virusa pri čebelah dober pokazatelj prisotnosti virusov pri čmrljih (McMahon in sod., 2015).

Pri pregledu 4 vzorcev različnih vrst umrlih čmrljev smo v Sloveniji leta 2017 z metodo RT-PCR prvič dokazali prisotnost nukleinske kisline dveh čebeljih virusov (ABPV in BQCV) pri čmrljih. Pregledani 4 vzorci čmrljev so vsebovali vrste *Bombus humilis*, *Bombus pascuorum*, *Bombus hypnorum* in *Bombus lapidarius* (Grad in Toplak, 2018). V predhodnih raziskavah je bilo večkrat dokazano, da se čebelji virusi znotraj čebeljih družin prenašajo horizontalno in vertikalno, prav tako je varoja (*Varroa destructor*) med sesanjem hemolimfe zelo dobra prenašalka številnih virusov pri čebelah (Chen in sod., 2006). Prenos različ-

nih vrst patogenov med različnimi vrstami je že dolgo poznan tako pri živalih, kot pri človeku (Woolhouse in sod., 2005), zato je preučevanje teh možnosti pomembno tudi za čebele, ki se v naravi ob neposrednih ali posrednih stikih srečujejo tudi z drugimi opravevalci. Zelo malo pa je poznanega o dovzetnosti in načinih prenosa med različnimi vrstami opravevalcev. Dosedanje ugotovitve nakazujejo veliko kompleksnost virov okužbe in težavno interpretacijo virusnih okužb, ko govorimo o medsebojnem vplivu različnih opravevalcev.

V izvedeni študiji smo z filogenetsko primerjavo virusnih sevov ABPV, BQCV, Lake Sinai virusa in SBV iz pozitivnih vzorcev čebel in čmrljev prvič v Sloveniji želeli ugotoviti, ali so isti sevi posamezne vrste čebeljih virusov prisotni tudi pri čmrljih.

MATERIAL IN METODE

V obdobju od 2007 do 2018 smo vzorčili čebele delavke iz šibkih ali odmrlih čebeljih družin, umrle čebele delavke ali žive čebele z znaki paralize pred panjem, odmrlo zalego in varoje iz celotnega ozemlja Slovenije. V avgustu 2017 smo na štirih različnih lokacijah (Sevno, Lukovica, Naklo, Ljubljana) na cvetočih travnikih vzorčili klinično zdrave čmrlje vrste *B. lapidarius* (BL), *B. pascuorum* (BP), *B. terrestris*/*B. lucorum* (BT) in istočasno na vsaki lokaciji 10 klinično zdravih čebel delavk. Vzorce smo do začetka preiskave zamrznili in jih hranili na < - 50 °C.

Naključno odbranim desetim čebelam iz vzorca smo dodali 5 ml medija RPMI (Gibco, Velika Britanija) in jih homogenizirali v epruveh z Ultra-Turrax DT-20 (IKA, Nemčija), ter centrifugirali 5 min pri 2500 g. Podobno smo pripravili vzorce čmrljev, s tem da smo 1 čmrlju dodali 3 ml medija RPMI in vsakega čmrlja testirali individualno. Celokupno RNA smo izolirali iz suspenzije posameznega vzorca s kompletom QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca.

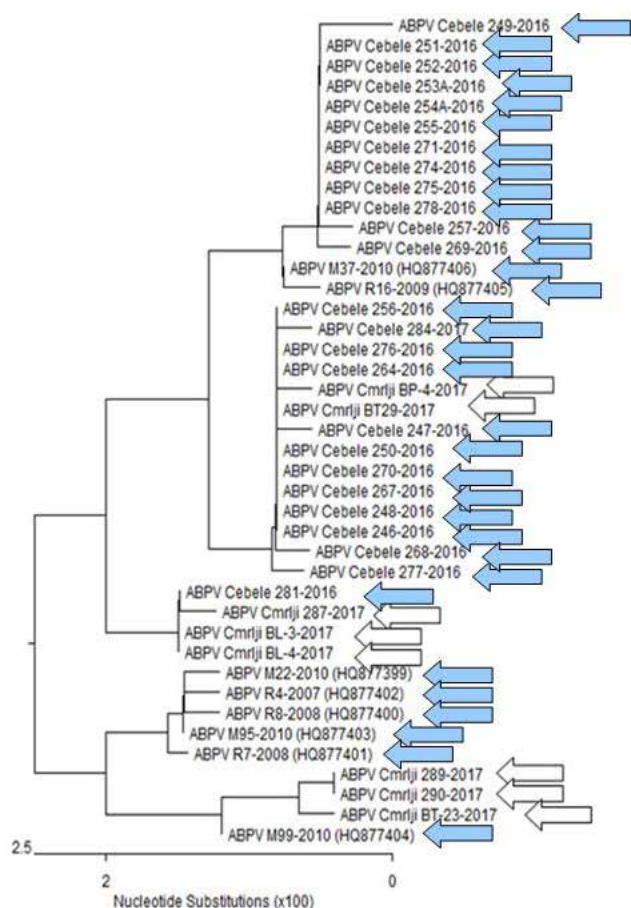
Nukleinsko kislino petih čebeljih virusov (ABPV, BQCV, CBPV, DWV in SBV) smo dokazovali z metodo reverzne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) po postopku, ki je bil predhodno opisan (Toplak in sod., 2012). Virus Lake Sinai smo dokazovali z metodo RT-PCR in predhodno opisanimi oligonukleotidnimi začetniki LSV1765-F in LSV2368-R (Ravoet in sod., 2015). Rezultate smo ovrednotili na podlagi velikosti produktov RT-PCR v agaroznem gelu kot pozitivne v primeru pričakovane velikosti produkta: za ABPV 452 nukleotidov (nt), za BQCV 770 nt, za CBPV 570 nt, za DWV 504 nt, za Lake Sinai virus 603 nt in za SBV 814.

V primeru pozitivnega rezultata smo produkte RT-PCR posameznega virusa direktno sekvencirali po Sangerju.

Izvedli smo filogenetske primerjave s programom DNA-STAR 5.05 (Lasergen, ZDA) ugotovljenih pozitivnih vzorcev štirih virusov (ABPV, BQCV, DWV in SBV) pri čebelah in čmrljih ter rezultate interpretirali na podlagi ujemanja nukleotidnega zaporedja.

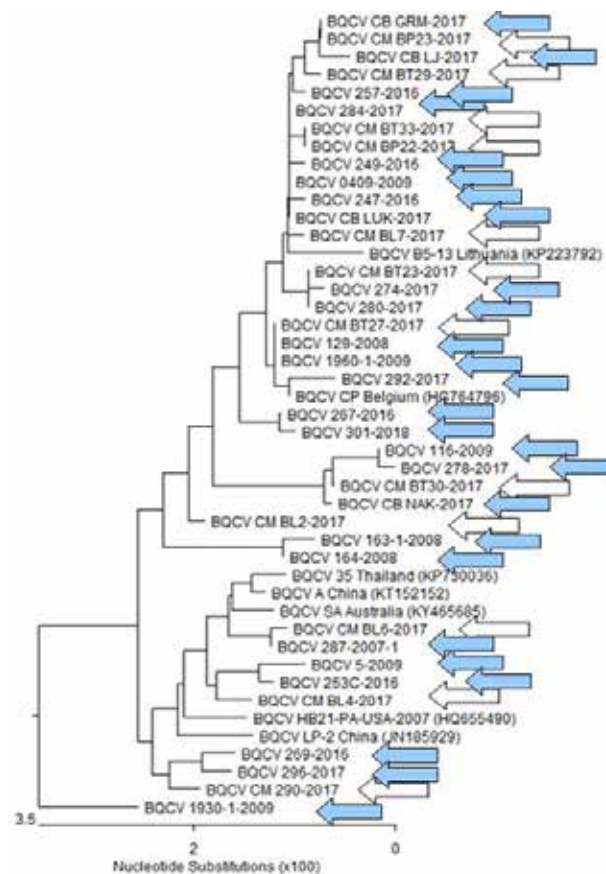
REZULTATI

V filogenetsko primerjavo virusnih sevov ABPV smo vključili 33 pozitivnih vzorcev čebel in 8 pozitivnih vzorcev čmrljev. Primerjava zaporedja 408 nukleotidov regije ORF1 virusnega genoma je pokazala, da so pri čmrljih prisotni genetsko isti sevi ABPV, z 99,3-100% identičnostjo zaporedja nukleotidov najbližjim sevom ABPV, ki smo jih ugotovili pri čebelah (Slika 1). Pri čmrljih vrste *B. lapidarius*, *B. pascuorum*, *B. terrestris/lucorum*, smo ugotovili najmanj tri različne seve ABPV, ki se med seboj na nukleotidnem nivoju razlikujejo v primerjani regiji ORF1 za največ v 3,9%.



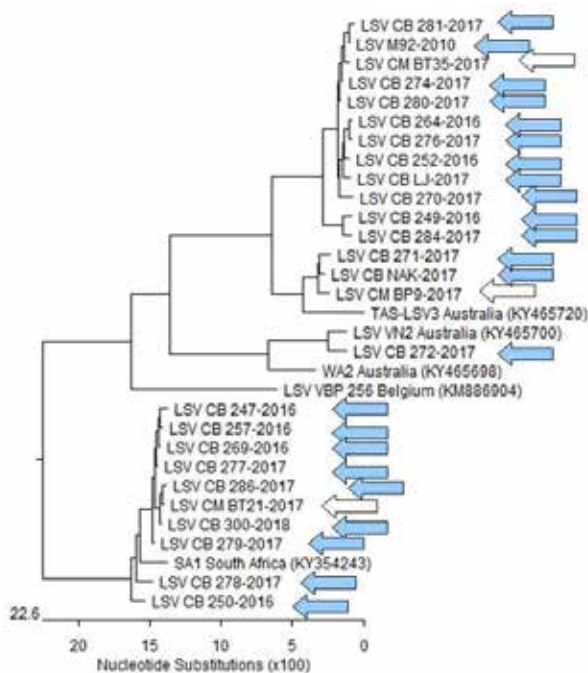
Slika 1. Filogenetska primerjava sevov ABPV ugotovljenih v pozitivnih vzorcih čebel (obarvane puščice) in čmrljev (ne obarvane puščice) v Sloveniji. Primerjava je izvedena na podlagi zaporedja 408 nukleotidov regije ORF1 virusnega genoma skupaj z genetsko najbližjimi sevi iz genske banke.

Filogenetsko primerjavo virusnih sevov BQCV smo izvedli z vključitvijo 26 pozitivnih vzorcev čebel in 12 pozitivnih vzorcev čmrljev, skupaj z genetsko najbližjimi sevi iz genske banke. Primerjava zaporedja 653 nukleotidov regije virusnega genoma, ki kodira protein kapside, je pokazala, da so pri čebelah in čmrljih prisotni genetsko isti sevi BQCV, z 98,5-100% identičnostjo zaporedja nukleotidov (Slika 2). Na istih lokacijah smo pri čmrljih ugotovili genetsko iste seve BQCV, ki so prisotni tudi pri vzorcih čebel.



Slika 2. Filogenetska primerjava sevov BQCV ugotovljenih v pozitivnih vzorcih čebel (obarvane puščice) in čmrljev (ne obarvane puščice) v Sloveniji. Primerjava je izvedena na podlagi zaporedja 653 nukleotidov regije virusnega genoma, ki kodira protein kapside, skupaj z genetsko najbližjimi sevi iz genske banke.

Primerjava 557 nukleotidov dolgih odsekov regije genoma, ki kodira gen za polimerazo RNA virusa Lake Sinai, je pri vključenih 23 pozitivnih vzorcih čebel in 3 pozitivnih vzorcih čmrljev pokazala 98,7-99,6% identičnost zaporedja nukleotidov med genetsko najbolj sorodnimi pozitivnimi vzorci virusa Lake Sinai čebel in čmrljev (Slika 3). Pri čebelah in čmrljih smo ugotovili seve iz dveh genetsko različnih skupin virusov Lake Sinai (poimenovani LSV2 in LSV3), ki se med seboj razlikujejo največ v 24,6%.

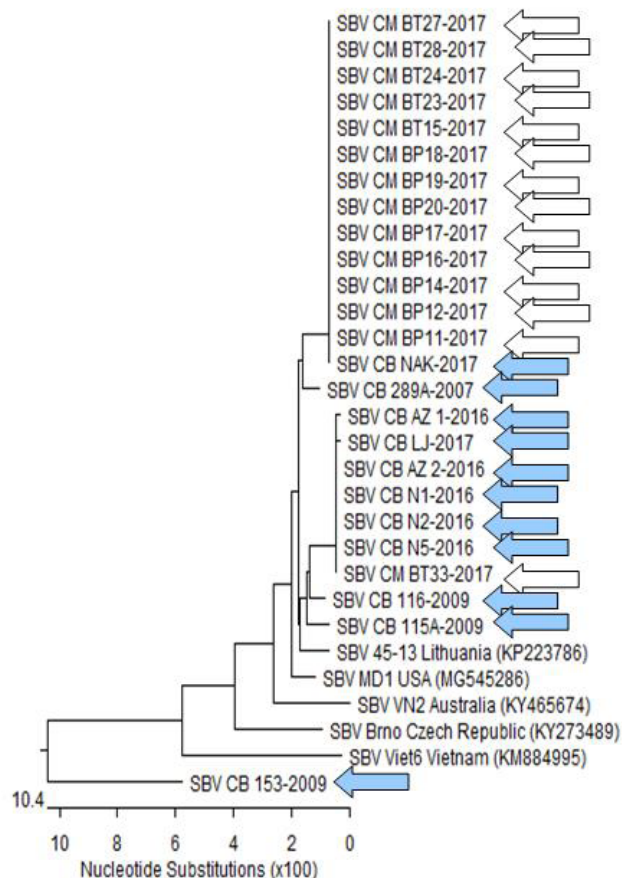


Slika 3. Filogenetska primerjava sevov virusa Lake Sinai ugotovljenih v pozitivnih vzorcih čebel (obarvane puščice) in čmrljev (ne obarvane puščice) v Sloveniji. Primerjava je izvedena na podlagi zaporedja 557 nukleotidov regije virusnega genoma, ki kodira polimerazo RNA, skupaj z genetsko najbližjimi sevi iz genske banke.

V filogenetski primerjavi SBV smo primerjali 783 nukleotidov dolgo zaporedje 11 pozitivnih vzorcev čebel in 14 pozitivnih vzorcev čmrljev. Primerjava regije virusnega genoma, ki kodira poliprotein je pokazala 100% identičnost zaporedja nukleotidov med pozitivnimi vzorci SBV čebel in čmrljev (Slika 4). V vzorcih čebel in čmrljev, ki so bili vzorčeni na isti lokaciji (Naklo in Ljubljana) smo ugotovili 100% identičnost nukleotidnega zaporedja, kar je dokaz, da je pri čebelah in čmrljih bil v času vzorčenja prisoten isti sev SBV.

RAZPRAVA

Večina prenosov čebeljih virusov poteka znotraj čebelje družine in med čebeljimi družinami horizontalno (preko neposrednih ali posrednih stikov med pašnimi čebelami), manj pogost pa je vertikalni način, ko je vir okužbe matica (Chen in sod., 2006). Čebele bi se lahko z novim virusom okužile ob stiku z okuženo čebelo, na kontaminiranih cvetovih, z okuženo varojo, od čmrljev ali ostalih vrst divjih čebel (McMahon in sod., 2015). V predhodno izvedeni študiji smo v istih čebeljih družinah ugotovili, da so z virusi ABPV, BQCV, CBPV in DWV najpogosteje okužene pašne čebele, v nekoliko nižjem odstotku hišne



Slika 4. Filogenetska primerjava sevov SBV ugotovljenih v pozitivnih vzorcih čebel (obarvane puščice) in čmrljev (ne obarvane puščice) v Sloveniji. Primerjava je izvedena na podlagi zaporedja 783 nukleotidov regije virusnega genoma, ki kodira poliprotein, skupaj z genetsko najbližjimi sevi iz genske banke.

čebele, najmanjši odstotek pa smo ugotavljali pri zalegi (Jamnikar Ciglenečki in sod., 2014). To potrjuje, da so za prenos virusov najverjetneje v večini primerov odgovorne pašne čebele in zato obstaja velika verjetnost prenosa čebeljih virusov na paši.

Iz rezultatov izvedene študije v Sloveniji prvič ugotavljamo, da se tako pri čebelah, kot pri čmrljih pojavljajo genetsko isti sevi ABPV, BQCV, SBV in Lake Sinai virusa. Pri čmrljih smo pogosto ugotovili genetsko različne seve iste vrste virusa in v večini primerov smo te genetske različice našli tudi pri čebelah, ki smo jih že v prejšnjih letih ugotovili v Sloveniji ali istočasno vzorčili. Najverjetneje se čebele in čmrlji medsebojno okužujejo na kontaminiranih cvetovih ali ob neposrednih stikih. Iz študije pa ne moremo zaključiti, kako poteka okužba, ali s čebel na čmrlje, ali obratno, najbolj verjetno pa je, da okužbe potekajo v obe smeri.

V izvedeno študijo smo zajeli genetsko tipizirane pozitiv-

ne vzorce čebel (ABPV, BQCV, SBV), ki smo jih vzorčili med leti 2007 in 2018 iz prizadetih čebeljih družin, zdrave čmrlje pa smo vzorčili na štirih lokacijah na travnikih v letu 2017. Iz študije tudi lahko zaključimo, da se patogeni sevi čebeljih virusov pojavljajo tudi pri čmrljih, ne vemo pa, ali pri čmrljih povzročijo klinično sliko, kot jo opisujejo pri čebelah. Virusov CBPV in DWV v pregledanih vzorcih čmrljev še nismo ugotovili, kar je lahko posledica načina vzorčenja, saj smo vzorčili in pregledali le čmrlje brez kliničnih znakov bolezni. Za CBPV in DWV je značilno, da lahko v obolelih čebeljih družinah povzročata hujšo prizadetost posameznih ali večjega števila čebel (deformirana krila in paraliza), ki bi se lahko pojavlja tudi pri klinično prizadetih čmrljih, teh pa nismo vključili v to raziskavo. Vzorčenje tako prizadetih čmrljev bi bilo namreč zelo zahtevno, saj prostoživeče vrste čmrljev odmrejo v naravi (Grad in Toplak, 2018). Klinično prizadete čmrlje bi bilo morda mogoče ob daljšem in natančnem opazovanju zdravja čmrlje družine vzorčiti v lastnem čmrljaku.

S filogenetsko analizo nukleotidnih zaporedij kratkih od-

sekov virusnega genoma smo nedvoumno dokazali genetsko identične seve ABPV, BQCV, SBV in Lake Sinai virusa pri čmrljih in čebelah. To nam odpira nov pogled na vlogo virusov v patologiji opravevalcev in njihovi sposobnosti preživetja. Iste virusne seve smo ugotovili pri različnih vrstah čmrljev, čeprav zaradi majhnega števila pregledanih in primerjanih pozitivnih vzorcev virusov ne moremo sklepati, da so vse vrste čmrljev enako dovzetne za okužbe s posameznim čebeljim virusom.

Naša filogenetska študija daje veliko natančnejši vpogled v razširjenost čebeljih virusov pri čmrljih in natančno dokazuje prenos med vrstami, kakor so to izvedli v predhodni študiji pri čmrljih v Veliki Britaniji, kjer so štiri vrste virusov le dokazovali (McMahon in sod., 2015).

Vsekakor bi bilo za uspešnejši nadzor virusnih okužb pri čebelah potrebno tovrstne študije razširiti tudi na druge vrste opravevalcev. Na ta način bomo dobili popolnejšo sliko o dejanski razširjenosti in ogroženosti različnih vrst opravevalcev zaradi čebeljih virusov.

ZAHVALA

Zahvaljujemo se Alenki Jurič, mag. Miri Jenko Rogelj, Suzani Skerbiš, mag. Vidi Lešnik, mag. Ivo Planincu, Martini Škof, Mateji Ratiznojnik in Aniti Vraničar Novak za pomoč pri zbiranju in posredovanju vzorcev prizadetih čebel. Prav tako gre iskrena zahvala prof. dr. Janezu Gradu, ki je prinesel 4 vzorce odmrlih čmrljev, zbranih iz njegovega čmrljaka, da smo jih lahko uporabili v tej raziskavi. Dr. Danijeli Rihtarič, Poloni Žagar in Nataliji

Novak se zahvaljujemo za pomoč pri dokazovanju virusov z metodo RT-PCR. Opravljene raziskave so financirane iz sredstev Programske skupine P4-0092 in projekta CRP V4-1622 (Pomen divjih opravevalcev pri opravevanju kmetijskih rastlin in trajnostno upravljanje v kmetijstvu za zagotovitev zanesljivega opravevanja), ki ju financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije iz državnega proračuna.



LITERATURA

- Chen Y, Evans JD, Feldlaufer MF. Horizontal and vertical transmission of viruses in honey bee *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 2006; 92: 152-159.
- Evans JD, Schwarz RS. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiol* 2011; 19: 614-620.
- Fürst MA, McMahon DP, Osborne JL, Paxton RJ, Brown MJF. Disease associations between honeybees and bumblebees as a threat to wild pollinators. *Nature* 2014; 506: 364-366.
- Grad J, Toplak I. Žuželke, muha *Hermetia illucens* in virusi kot možni škodljivci čmrljem. *Acta Entom Slov* 2018; 26: 29-40.
- Jamnikar Ciglencečki U, Pislak Ocepek M, Jenčič V, Toplak I. Seasonal variations of four honey bee viruses in pupae, hive and forager bees of Carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slov Vet Res* 2014; 51: 131-40.
- McMahon DP, Furst MA, Caspar J, Theodorou P, Brown MJ, Paxton RJ. A sting in the split: widespread cross-infection of multiple RNA viruses across wild and managed bees. *J Anim Eco* 2015; 84, 615-624.
- Ravoet J, De Smet L, Wenseleers T, De Graaf DC. Genome sequence of Lake Sinai Virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphism in a single host. *Virus Res* 2015; 201: 67-72.
- Runckel C, Flenniken ML, Engel JC, Ruby JG, Gannem D, Andino R, DeRisi JL. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema and Crithidia. *PLoS ONE* 2011; 6, e20656.
- Toplak I, Zabavnik Piano J, Pislak Ocepek M. Ugotavljanje prisotnosti petih čebeljih virusov v vzorcih obolelih čebeljih družin v letu 2010. Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Nacionalni veterinarski inštitut, končno poročilo 2010; 1-48.
- Toplak I, Rihtarič D, Jamnikar Ciglencečki U, Hostnik P, Jenčič V, Barlič-Maganja D. Detection of six honeybee viruses in clinically affected colonies of Carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slov Vet Res* 2012; 49: 83-91.
- Woolhouse MEJ, Haydon DT, Anita R. Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trend in Ecology and Evolution* 2005; 20: 238-244.

PRISOTNOST PRAŽIVALI IZ DRUŽINE TRYPANOSOMATIDAE PRI MEDONOSNI ČEBELI V OSREDNJESLOVENSKI REGIJI

Lucija ŽVOKELJ¹, Jerica VREČEK ŠULGAJ¹, Urška ZAJC¹, Metka PISLAK OCEPEK²

Izvleček

Praživali iz družine Trypanosomatidae so med bolj razširjenimi zajedavskimi mikroorganizmi v črevesju gostiteljev. Znano je, da so pogosto prisotne kot eden od patogenov pri večjih izgubah čebeljih družin. Njihova stopnja škodljivosti za medonosno čebelo še ni znana. Vendar pa se predvideva, da kadar je čebelja družina prizadeta zaradi drugih povzročiteljev bolezni, lahko prisotnost mikrobov kot so tripanosomatide, tudi če ti sami zase niso posebej škodljivi, povzroči dodatne bolezenske spremembe. Zadnje čase se povečuje število raziskav, ki izboljšujejo diagnostične metode za določanje dveh, do sedaj znanih predstavnikov družine Trypanosomatidae pri medonosni čebeli, to sta *Crithidia mellificae* in *Lotmaria passim*. Na Veterinarski fakulteti smo v preliminarni raziskavi preverili pojavnost obeh vrst iz družine Trypanosomatidae pri čebeljih družinah v Osrednjeslovenski regiji. Prisotnost *C. mellificae* in *L. passim* v vzorcih čebel smo določali s polimerazno verižno reakcijo (PCR). Poleg Trypanosomatid smo v vzorcih ugotovljali tudi prisotnost še dveh enoceličnih parazitov pri čebelah, *Apicystis bombi* in *Nosemo ceranae*. S štetjem števila spor smo določili tudi stopnjo okužbe z *Nosemo* spp.. Vsi vzorci medonosnih čebel so bili pozitivni na *N. ceranae*, v 85% vzorcev smo ugotovili *L. passim*, *Crithidia* spp. je bila ugotovljena v 75% vzorcev. 40% vzorcev je bilo pozitivnih na *A. bombi*. Rezultati omogočajo nadaljnje korake pri proučevanju vpliva predstavnikov družine Trypanosomatidae na zdravje in preživitveno sposobnost čebel. Izpostavljamo tudi vprašanje prenosa enega povzročitelja bolezni med različnimi vrstami čebel.

Ključne besede: *Crithidia*, *Lotmaria*, *Apicystis*, molekularna diagnostika, *Nosema*

THE PRESENCE OF TRYPANOSOMATIDAE IN HONEY BEES IN THE CENTRAL SLOVENIAN REGION

Abstract

Trypanosomatids are being recognized as common gut parasites of a wide range of insect species. They are often encountered pathogens in the cases of honey bee colony losses. Little is known about how trypanosomatids affect honey bee health. However, it is assumed the infection of honey bees with one parasite e.g. trypanosomatids may affect their susceptibility to infection by another parasite. Recently, increasing number of studies have improved diagnostic methods for identifying two well-known representatives of the family Trypanosomatidae in honey bees, *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim*. A preliminary study at the Veterinary faculty about the incidence of both species of the Trypanosomatidae family in the Central Slovenian region was carried out. The presence of *C. mellificae* and *L. passim* in bee samples was determined by polymerase chain reaction (PCR). We also screened bee samples for another two eukariotic unicellular parasites, *Apicystis bombi* and *Nosema ceranae*. *Nosema* spp. spores per bee were determined. All samples were found to be positive for *N. ceranae*, in 85% samples *L. passim* was present, while *Crithidia* spp. was present in 75% of samples. *A. bombi* was detected in 40% of samples. The study allows further investigation with the emphasis on the pathological impacts of the gut parasites on the health of honey bees and also expose trypanosomatids and *A. bombi* as multihost invasive parasites.

Key words: *Crithidia*, *Lotmaria*, *Apicystis*, Molecular diagnostics, *Nosema*

¹ Dr. vet. med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele

² Dr., dr. vet. med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele



UVOD

Bičkarje v črevesju medonosnih čebelah omenjajo že leta 1912 (Morse in Flottum, 1997). *C. mellifica*e so prvič opisali leta 1967 v Avstraliji (Langridge in McGhee, 1967). S prvimi biološkimi poskusi so ugotovili, da ta povzročitelj nima vpliva na zdravstveno stanje čebel in to je bil tudi razlog, da se *C. mellifica*e skoraj 40 let ni omenjalo. Strokovnjaki so postali nanjo pozorni v zadnjih letih, saj so z raziskavami potrdili, da je pogosto prisotna kot eden od patogenov pri večjih izgubah čebeljih družin, kar so lahko ugotavljali šele s sodobnimi diagnostičnimi metodami (Runckel in sod., 2011). Kar nekaj študij je v zadnjih petih letih izpostavilo, da bi lahko *C. mellifica*e, predvsem skupaj z *N. ceranae* precej pripomogla k izgubam čebeljih družin. V Belgiji so skušali povezati izgube čebel v zimskem času s prisotnostjo povzročiteljev bolezni poleti. Ugotovili so, da je v poletnem času poleg *Varroa destructor*, ravno prisotnost *C. mellifica*e, še posebej v kombinaciji z *N. ceranae*, pomemben pokazatelj kasnejših zimskih izgub čebel (Ravoet in sod., 2013).

Ugotovitev, da vrsta *C. bombi* povzroča resne težave družinam čmrljev (Brown in sod. 2000), je dodatno okrepila dvom o neškodljivosti predstavnikov rodu *Crithidia* za medonosne čebele. Leta 2015 (Schwarz in sod.) so z novimi metodami ugotovili, da pravzaprav izolati iz družine Trypanosomatidae ne pripadajo *Crithidii*, temveč novo definirani vrsti t.i. *L. passim*. Danes tako velja, da je, najmanj od leta 2010, prevladujoč predstavnik iz družine Trypanosomatidae pri čebelah, *L. passim*.

Obsežno raziskava o pojavljanju *L. passim* in *N. ceranae* v čebeljih družinah (Vejanovic in sod., 2017) je pokazala, da sta bila povzročitelja skupaj prisotna v 60% preiskanih družin. Večkrat je bilo že potrjeno, da obstaja povezava v stopnji infekcije pri obeh parazitih in tudi v Srbiji so to potrdili. Oba povzročitelja sta črevesna parazita, vendar sta v črevesju prostorsko ločena, *Nosema spp.* parazitira v srednjem črevesju, *L. passim* pa v blatniku (rectumu). Značilno je bila v tej raziskavi stopnja infekcije tako pri *L. passim* kot *N. ceranae* najnižja v poletnih mesecih in najvišja pred in takoj po zimi. To povezujejo z številom mladih čebel; v obdobju, ko se intenzivno povečuje število mladih čebel, se stopnja infekcije s črevesnimi paraziti zmanjšuje.

Nasprotno, pa je tudi precej raziskav, ki nakazujejo, da tako *C. mellifica*e, kot *L. passim* nimata škodljivega vpliva na čebele (Higes in sod., 2016; Maclnnis in sod., 2018). Podobno kot pri *Crithidii spp.*, ki ima dokazan negativen učinek na razvoj družin pri čmrljih, ne pa tudi pri čebelah, velja še za enega predstavnika praživali, *Apicystis bombi* (Schmid-Hempel, 2001). Le ta spada med gregarine. O visoki prevalenci le tega pri medonosni čebeli poročajo

iz področij, kjer je povečana uporaba komercialnih družin čmrljev, predvsem vrste *Bombus terrestris* (Plischuk in sod. 2011).

V Sloveniji še nismo dokazali predstavnikov Trypanosomatid pri medonosni čebeli, zato smo najprej preverili, kakšno je stanje štirih črevesnih parazitov v naključno izbranih čebeljih družinah.

MATERIAL IN METODE DE LA

V Osrednjeslovenski regiji smo določili 20 lokacij v katerih smo vzorčili pašne čebele. Mesta vzorčenja smo izbrali tako, da so bile lokacije vzorcev enakomerno porazdeljene po celotni regiji. Posamezna lokacija je predstavljala stojišče ali čebelnjak z najmanj petnajstimi čebeljimi družinami. Pred žreli smo vzorčili 60 pašnih čebel in še žive zamrznili ter jih shranili na -20°C. Vzorcili smo družine brez kliničnih znakov bolezni.

Za dokazovanje prisotnosti *A. bombi*, *Crithidia spp.*, *L. passim* in *N. ceranae* v vzorcih čebel, smo izolirali DNA s pomočjo steklenih kroglic (Glass beads, velikost $\leq 106\mu\text{m}$ in $1\mu\text{m}$, Sigma), MagnaLyser-ja (Roche Diagnostics, Nemčija) in komercialnega kompleta za izolacijo DNA »DNA isolation from complex samples« (IMMT, Slovenija).

Za dokazovanje *Crithidia spp.* in *A. bombi* smo uporabili postopek PCR opisan v Meeus in sod. (2010), za dokazovanje *L. passim* pa postopek po Xu in sod. (2018). *Nosema spp.* smo dokazovali po postopku, opisanem v Fries in sod. (2013). Za določanje števila spor *Nosema spp.* smo zadkom 30-ih čebel dodali 30 ml vode in jih zmacerirali v terilnici. Spore smo prešteli s pomočjo hemocitometra (Neubauer) v petih kvadratkih s površino 1mm^2 . Število spor na čebelo smo izračunali po formuli:

Št. spor = povprečno št. spor / (4 x 1000000)

REZULTATI Z RAZPRAVO

V tabeli št.1 so prikazani rezultati prisotnosti štirih enoceličnih črevesnih parazitov pri medonosni čebeli v Osrednjeslovenski regiji. Pri vseh 20-ih čebeljih družinah smo dokazali prisotnost spor *N. ceranae*. Število spor/čebelo je znašalo od $1,75 \times 10^6$ pri vzorcu št. 4 do $28,9 \times 10^6$ pri vzorcu št. 18. Največ vzorcev je bilo pozitivnih na *L. passim* (85%), predstavniki rodu *Crithidia* so bili prisotni v 75% vzorcev. *A. bombi* smo dokazali v 40 % vzorcev. Samo 2 vzorca (Ivančna Gorica in Ljubljana Bežigrad) sta bila negativna na oba predstavnika Trypanosomatid, kot tudi vrsto gregarin, *A. bombi*.

Ti rezultati nas ne presenečajo, saj o prisotnosti Trypanosomatidae pri čebelah poročajo raziskovalci iz vseh kon-

Tabela 1: Prisotnost *Crithidia* spp., *L. passim*, *A. bombi* ter števila spor *Nosema* spp./čebelo v vzorcih klinično zdravih čebeljih družin na 20 lokacijah Osrednjeslovenske regije;

Št. vz.	Vrsta parazita	<i>Nosema</i> spp. *106	<i>Crithidia</i> spp.	<i>Lotmaria passim</i>	<i>Apicystis bombi</i>
	Občina				
1.	Lukovica	11,95	+	+	-
2.	Dol pri LJ	14,00	+	+	-
3.	Dol pri LJ2	2,90	+	+	+
4.	Litija	1,75	+	+	-
5.	Šmartno pri Litiji	22,15	+	+	-
6.	Iv. Gorica	6,15	-	-	-
7.	Grosuplje	2,70	+	+	+
8.	Kočevje	10,30	-	+	+
9.	Ribnica	26,40	+	+	+
10.	Velike Lašče	9,00	+	+	-
11.	Iv. Gorica 2	3,95	+	+	+
12.	Vrhnika	20,95	-	-	+
13.	Horjul	15,60	+	+	-
14.	Dobrova-Polhov Gradec	8,25	-	+	-
15.	Domžale	11,75	+	+	-
16.	Kamnik1	13,80	+	+	+
17.	Kamnik2	9,80	+	+	-
18.	Komenda	28,90	+	+	+
19.	Ljubljana Vič	3,60	+	+	-
20.	Ljubljana Bežigrad	7,00	-	-	-

Legenda: povzročitelj dokazan znak +, povzročitelj ni dokazan v vzorcu znak -

tinentov (VanEngelsdorp in sod., 2009; Runckel in sod., 2011; Cornman in sod., 2012; Morimoto in sod., 2013; Ravoet in sod., 2013; Hartmann in sod., 2015; Schwarz in sod., 2015; Stevanovic in sod., 2016).

Število spor *Nosema* spp. je bilo v naših vzorcih večje od 20 x 106 tako pri vzorcih, ki so bili pozitivni na vse

preostale 3 črevesne parazite (npr. vzorec 18), kot tudi pri vzorcu št.12, kjer Trypanosomatid nismo dokazali. Več avtorjev opozarja, da število spor/čebelo od začetka do konca bolezni zelo niha in zato ni bistven, niti zanesljiv, podatek o resnosti okužbe z *N. ceranae* (Higes in sod., 2010; Zheng in sod., 2014; Flemming in sod., 2015).

ZAKLJUČKI

O črevesni mikroflori (mikrobioti), kot o škodljivosti črevesnih parazitov pri čebelah je na razpolago zelo malo raziskav, le te pa so si velikokrat nasprotujoče. Pa vendar moramo poznati zdravo črevesno mikrofloro, da bi lahko govorili o vzrokih za porušenje obrambnega sistema črevesja. Slednje nas zanima, saj je ključno pri pojavu številnih trdovratnih bolezni čebelje družine, kot sta npr. huda in pohlevna gniloba čebelje zalege. Z raziskavo smo usvojili diagnostične metode in preverili pojavljanje črevesnih

parazitov v naključno izbranih čebeljih družinah, ki ne kažejo kliničnih znakov bolezni. V nadaljnjih korakih bomo preverili vlogo različnih prebivalcev črevesja na zdravje čebel in zunanje vplive, predvsem vlogo različnih pašnih virov na mikrobioto pri čebelah.

Pojavljanje istih vrst parazitov, tako pri medonosni čebeli, kot čmrljih nakazuje na pogost prenos povzročiteljev med različnimi vrstami gostiteljev.

ZAHVALA

Avtorice se zahvaljujemo vsem čebelarjem, ki so si vzeli čas, da smo lahko pri njih vzorčili čebele in izkazali pripravljenost za sodelovanje pri raziskovanju čebel in is-

kanju rešitev za izboljšanje zdravstvenega stanja čebeljih družin.

LITERATURA

- Brown M. J. F., Loosli R., Schmid-Hempel P. (2000) Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos*, 91.3: 421-427.
- Cornman R. S., Tarpay D. R., Chen Y., Jeffreys L., Lopez D., Pettis J. S., Evans J. D. (2012) Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE*, 7(8): e43562.
- Evans J. D., Saegerman C., Mullin C., Haubruge E., Nguyen B. K., Frazier M., ... & Tarpay D. R. (2009) Colony collapse disorder: a descriptive study. *PLoS ONE*, 4(8), e6481.
- Fleming J. C., Schmehl D. R., & Ellis J. D. (2015) Characterizing the impact of commercial pollen substitute diets on the level of *Nosema spp.* in honey bees (*Apis mellifera L.*). *PLoS ONE*, 10(7): e0132014.
- Fries I., Chauzat M. P., Chen Y. P., Doublet V., Gensch E., Gisder S., ... & Paxton R. J. (2013) Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1): 1-28.
- Hartmann U., Forsgren E., Charrière J. D., Neumann P., & Gauthier L. (2015) Dynamics of *Apis mellifera* Filamentous Virus (AmFV) infections in honey bees and relationships with other parasites. *Viruses*, 7(5): 2654-2667.
- Higes M., Rodríguez-García C., Gómez-Moracho T., Meana A., Bartolomé C., Maside X., ... & Martín-Hernández R. (2016) Survival of honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Crithidia mellificae* (Langridge and McGhee: ATCC® 30254™) in the presence of *Nosema ceranae*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14(3): 05-02.
- Higes M., Martín-Hernández R., & Meana A. (2010) *Nosema ceranae* in Europe: an emergent type C nosmosis. *Apidologie*, 41(3): 375-392.
- Langridge D. F., & McGHEE R. B. (1967) *Crithidia mellificae* n. sp. an acidophilic trypanosomatid of the honey bee *Apis mellifera*. *The Journal of protozoology*, 14(3): 485-487.
- MacInnis C.L., Loung L. T., Schwarz R. S., Guarna M. M., & Pernal S. F. (2018) *Nosema ceranae* and *Lotmaria passim*: partners in crime? Program & abstract book, European Conference of Apidology, Ghent, Belgium: 105-106.
- Meeus I., De Graaf D. C., Jans K., & Smagghe G. (2010) Multiplex PCR detection of slowly-evolving trypanosomatids and neogregarines in bumblebees using broad-range primers. *Journal of applied microbiology*, 109(1): 107-115.
- Morimoto T., Kojima Y., Yoshiyama M., Kimura K., Yang B., Peng G., & Kadowaki T. (2013) Molecular detection of protozoan parasites infecting *Apis mellifera* colonies in Japan. *Environmental microbiology reports*, 5(1): 74-77.
- Morse R. A., & Nowogrodzki, R. (1990) Honey bee pests, predators, and diseases (No. Ed. 2). Cornell University Press, p. 718.
- Plischuk S., Meeus I., Smagghe G., & Lange C. E. (2011) *Apicystis bombi* (apicomplexa: neogregarinorida) parasitizing *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (hymenoptera: apidae) in Argentina. *Environmental microbiology reports*, 3(5): 565-568.
- Ravoet J., Maharramov J., Meeus I., De Smet L., Wenseleers T., Smagghe G., & De Graaf D. C. (2013) Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE*, 8(8), e72443.
- Runckel C., Flenniken M. L., Engel J. C., Ruby J. G., Ganem D., Andino R., & DeRisi J. L. (2011) Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE*, 6(6), e20656.
- Schmid-Hempel, P. (2001) On the evolutionary ecology of host-parasite interactions: addressing the question with regard to bumblebees and their parasites. *Naturwissenschaften*, 88(4): 147-158.
- Schwarz R. S., Bauchan G. R., Murphy C. A., Ravoet J., de Graaf D. C., & Evans J. D. (2015) Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5): 567-583.
- Stevanovic J., Schwarz R. S., Vejnovic B., Evans

- J. D., Irwin R. E., Glavinic U., & Stanimirovic, Z. (2016) Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: a nine-year survey (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. *Journal of invertebrate pathology*, 139: 6-11.
- Vejnovic B., Stevanovic J., Schwarz R. S., Aleksic N., Mirilovic M., Jovanovic N. M., & Stanimirovic Z. (2018) Quantitative PCR assessment of *Lotmaria passim* in *Apis mellifera* colonies co-infected naturally with *Nosema ceranae*. *Journal of invertebrate pathology*, 151: 76-81.
 - Xu G., Palmer-Young E., Skyrms K., Daly T., Sylvia M., Averill A., & Rich S. (2018) Triplex real-time PCR for detection of *Crithidia mellificae* and *Lotmaria passim* in honey bees. *Parasitology research*, 117(2): 623-628.
 - Zheng H. Q., Lin Z. G., Huang S. K., Sohr A., Wu L., & Chen Y. P. (2014) Spore loads may not be used alone as a direct indicator of the severity of *Nosema ceranae* infection in honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology*, 107(6): 2037-2044.



HUDA GNILOBA ČEBELJE ZALEGE – IZZIVI NA TERENU

Jerica VREČEK ŠULGAJ¹, Lucija ŽVOKELJ¹, dr. Metka PISLAK OCEPEK²

Izvleček

Huda gniloba čebelje zalege, ki jo povzroča bakterija *Paenibacillus larvae* je najbolj nevarna bolezen čebelje družine, saj povzroči smrt čebeljih ličink in čebelja družina propade ali izroji. Zaradi hitrega širjenja in velike gospodarske škode, ki jo povzroča, je huda gniloba čebelje zalege v državah Evropske skupnosti in tudi drugod po svetu obvezno prijavljiva bolezen. Klub doslednemu izvajanju ukrepov za izkoreninjenje bolezni v Sloveniji, ugotavljamo vedno nova žarišča. Ob veliki gostoti čebelnjakov je namreč prenos okužb hitrejši, saj so čebele iz čebelnjakov v preletni razdalji v stalnem medsebojnem stiku. Poleg velike gostote čebelnjakov so v Sloveniji problem tudi čebelnjaki s propadajočimi in odmrlimi čebeljimi družinami ter neregistrirani čebelnjaki, kjer ni mogoča sledljivost. Ob izbruhu hude gnilobe čebelje zalege se v polmeru 3 km okrog žarišča prepovejo premiki čebel in opreme, dokler niso opravljeni vsi pregledi stojišč znotraj zapore in je kontrolni pregled žarišča, ki se lahko opravi najmanj 30 dni po opravljeni sanaciji, rezultati morajo biti negativni. Čebelarji se pogosto pritožujejo, da zapore trajajo predolgo. Do podaljševanja prihaja predvsem zaradi na novo odkritih primerov bolezni in pozitivnih kontrolnih pregledov, ker sanacija žarišča ni bila opravljena po navodilih veterinarske službe, ponekod tudi zaradi nesodelovanja pri pregledih. Pri vsem skupaj sta tako najbolj pomembni komunikacija in konstruktivno sodelovanje veterinarjev VF NVI in čebelarjev, v smislu odzivanja na poziv o pregledu čebeljih družin, upoštevanja prepovedi premika čebeljih družin/matic, pomoči pri pregledih družin, kjer čebelar ne zmore sam, podajanja informacij o lokaciji stojišč, upoštevanja in doslednega izvajanja strokovnih navodil veterinarja VF NVI ob morebitnem pozitivnem kliničnem pregledu, registracije stojišč in sporočanja staleža družin ter morebitne spremembe osebnih podatkov čebelarja pri pristojnih organih.

Ključne besede: huda gniloba čebelje zalege, prepoznavanje kliničnih znakov, sanacija

AMERICAN FOULBROOD – CHALLENGES IN THE FIELD

Abstract

Severe decay American foulbrood is one of the most dangerous diseases causing the death of bee colonies and the collapse of honeybee larvae, leading to the collapse of entire families. As a result of the massive economic damage caused by severe decay causes American foulbrood in beekeeping is a notifiable disease across the EU, so oppressed by the law. In Slovenia each year are discovering new foci of the disease. At high density of apiaries disadvantaged is to transfer the disease faster, because the bees from different apiaries disadvantaged in such an area in constant mutual contact. In addition to large density of apiaries disadvantaged in some areas, a major problem in Slovenia in the transfer of severe decay and animal decadent with hives too bee families, but the problem also unregistered apiaries. At the outbreak of American foulbrood are within a radius of 3 km around the hot spots, to prohibit the movement of bees and equipment until all the checks carried out in the stands inside the prisons and the control of hot spots, which can be carried out at least 30 days after the completion of the rehabilitation, negative. Beekeepers often complain that the roadblocks. To the extension comes mainly due to newly discovered cases of the disease and as a result of the positive checks because remediation is not carried out under the direction of the foci of the veterinary services, in some cases because of the lack of cooperation with the inspections. All are the most important communication and constructive cooperation between veterinarians VF NVI and beekeepers, in terms of responding to the call on the review of compliance with the prohibition of families moving colonies/queen bee, assist families, reviews where the beekeeper cannot do alone, passing information about the location of the stands, to take account of and consistent implementation of the professional guidance of a veterinarian at any positive NVI VF clinical examination, registration and communication stocks, families standing and the potential change of personal data to the competent authorities a beekeeper.

Key words: American foulbrood, identifying clinical signs, remediation

¹ Dr. vet. med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele

² Dr., dr. vet. med., Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, Inštitut za patologijo, divjad, ribe in čebele

SPLOŠNO O HUDI GNILOBI ČEBELJE ZALEGE

Povzročitelj bolezni

Na čebelje družine vplivajo različni dejavniki ekosistema, od mikroklimatskih vplivov do patogenih organizmov. Med patogenimi povzročitelji bolezni sta najnevarnejša zajedavska pršica *Varroa destructor*, ki povzroča varozo in bakterija *Paenibacillus larvae*, povzročitelj hude gnilobe čebelje zalege. Huda gniloba čebelje zalege (ang. American foulbrood, AFB) je nalezljiva bolezen čebelje družine, ki je razširjena po celem svetu. Povzročitelj je sporogena bakterija *P. larvae*, ki prizadene zelo mlade čebelje ličinke, v starosti 12 do 36 ur po izvalitvi iz jajčeca. Ličinke se okužijo s spori peroralno preko okužene hrane (med) (Genersch in sod., 2005). Spore se v srednjem črevesju ličinke aktivirajo, bakterije se nato močno namnožijo, vdrejo v hemolimfo in posledično v vsa tkiva ličinke ter povzročijo njeno smrt. Mrtva ličinka se razgradi v vlecljivo maso, ki se v nadaljevanju procesa posuši v suho lusko z milijoni spor. Le-te so zelo odporne proti številnim okoljskim dejavnikom in lahko ostanejo infektivne več desetletij (Genersch, 2010). Odmiranje ličink vodi v primanjkljaj dotoka mladih vitalnih čebel, zato čebelje družine slabijo in v nadaljevanju procesa sledi dokončen propad čebelje družine.

Potek in klinični znaki bolezni

Okužba s *P. larvae* lahko v močni čebelji družini dalj časa poteka prikrito, brez klinične slike, v tem času pa se povzročitelj neovirano širi. Odrasle čebele za povzročitelja niso občutljive, predstavljajo pa pomemben člen - vektor pri prenosu povzročitelja na mlado zalego. S svojimi odlakanimi telesci zelo uspešno prenašajo spore med ličinkami in medom, po okuženem panju, čebelnjaku in njegovi okolici.

Sum na bolezen se postavi na podlagi značilnih kliničnih znakov, ki se odražajo na pokriti zalegi. V začetni fazi se pojavi nestrjena zaležena površina s posameznimi spremembami na pokrovcih, ki so vdrti ali naluknjani. Pri čebelji družini ni zaznani zmanjšanja številčnosti odraslih čebel. V nadaljevanju procesa je zalega vse bolj presledkasta, z vdrtimi in naluknjanimi pokrovcami. Čebelja družina je šibka in izletavanje slabše. Izpod tako spremenjenih pokrovcev lahko s pomočjo zobotrebca ali vžigalice povlečemo vlecljivo gmoto, v kar se spremeni odmrta ličinka, ki ima lahko neprijeten vonj po kleju. V končni fazi čebelja družina dokončno oslabi, postane plen roparic in velikokrat del čebel odleti kot roj v sili. Klinično sliko v panju predstavlja zapuščeno satje z odmrli ličinkami in posameznimi čebelami (Skerbiš in Lešnik, 2018). Vlecljiva rjava gmota pod pokrovcami se v nekaj tednih posuši v

tanko suho lusko, prilepljeno na dno celice (Poppinga in Genersch, 2015).

Diagnostika

Bakterijo *P. larvae* lahko dokazujemo v ostankih spremenjene zalege, v drobirju, medu in tudi v ostalih čebeljih proizvodih. Diagnostika bolezni temelji na klasični mikrobiološki metodi z izolacijo povzročitelja na gojiščih, ki spodbujajo kalitev spor in rast *P. larvae*. Kolonije *P. larvae* se najpogosteje pojavljajo v dveh različnih morfotipih, v odvisnosti od genotipa ERIC (Genersch in sod., 2006). Determinacija *P. larvae* se izvaja na podlagi značilnih morfoloških in biokemijskih lastnosti povzročitelja ali z metodo določanja bakterijskih povzročiteljev na osnovi masne spektrometrije z aparaturo MALDI-TOF. Slednje močno skrajša čas zanesljive identifikacije izolatov, ker lahko povzročitelja potrdimo takoj, ko zraste na hranilnem agarju.

Zatiranje bolezni in preventiva

Huda gniloba čebelje zalege lahko povzroča ob izbruhu ogromno gospodarsko škodo, zato jo je obvezno potrebno prijaviti ustreznemu organu, kar je še posebej pomembno zaradi notranjega in mednarodnega prometa s čebeljimi družinami. V Sloveniji je bolezen stalno prisotna v večjem ali manjšem obsegu, v primeru potrditve bolezni pa se izvajajo strogi veterinarsko-sanitarni ukrepi, kar je v skladu s Pravilnikom o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje hude gnilobe čebelje zalege (Pravilnik, 2006). Zatiranje bolezni vključuje neškodljivo uničenje okuženih čebeljih družin in satja ter panjev in opreme, ki je ni mogoče prekuhati v 3 % natrijevi ali kalijevi lužini. Redko se pri družinah v prizadetem čebelnjaku, ki ne kažejo znakov bolezni ali pri močnih družinah, kjer je bolezen še v začetnem stadiju, dovoljuje pretresanje čebel. Eden izmed ukrepov zatiranja hude gnilobe je uvedba tri-kilometerskega pasu okrog žarišča bolezni (t.i. kužni krog), ki je določen na podlagi preletne razdalje čebel, znotraj katerega velja prepoved premikov čebeljih družin, matic, čebelarškega orodja in opreme ter satja, dokler se žarišče ne sanira in se pregledajo vse čebelje družine znotraj zapore. V kolikor se znotraj zapore ugotovi novo žarišče, se zapora ustrezno razširi. Vse to lahko traja več mesecev in povzroča dodatno ekonomsko škodo čebelarjem zaradi onemogočenega prevoza čebel na pašo ter prepovedi trgovine z maticami in čebeljimi družinami (Jurić, 2018).

Za uspešno zatiranje hude gnilobe je najučinkovitejši ukrep uspešno preprečevanje okužbe z dobro čebelarško prakso in preventivo. Posebno pozornost je treba nameniti nakupu čebeljih družin, ki morajo izhajati iz čebelarstev s

preverjenim zdravstvenim stanjem. Za širjenje okužbe so nevarni roji neznanega porekla, čebelji pridelki in nerazkužena čebelarstva oprema. Čebelje družine je treba redno pregledovati ter menjavati satje v plodišču in preprečevati ropanje.

IZZIVI NA TERENU

Veterinarji za zdravstveno varstvo čebel se na terenu srečujemo s pestro paleto izzivov. Poglavitni problem je čebelarjevo neznanje oziroma nesposobnost za prepoznavanje bolezenskih sprememb pri čebelji družini. Že osnovnega kliničnega znaka, nestrjene zalege z neenotno starostjo zalege na istem satu, čebelarji običajno ne zaznajo kot možni alarm, da je s čebeljo družino lahko nekaj narobe in temeljito ne pregleda vseh plodiščnih satov. Tudi ostali značilni klinični znaki hude gnilobe so pri glavnini čebelarjev neprepoznani. S tem ko čebelarji znakov bolezni ne zaznajo, nevede širijo okužbo znotraj svojega čebelnjaka, ko izenačujejo družine z dodajanjem okuženih satov z zalego in medom. Vir okužbe je tak čebelnjak tudi za okolico, saj šibke, bolne družine dokaj hitro postanejo plen roparic, ki v svoje družine занesejo s spori kontaminiran med in bolezen se nekontrolirano širi naprej. Zato je zelo pomembno, da čebelar ob rednih natančnih pregledih svojih družin prepozna klinične znake in takoj obvesti veterinarja specialista za zdravstveno varstvo čebel na VF NVI o morebitnem sumu na bolezen v svojem čebelnjaku. Ob izbruhu bolezni in postavitvi kužnega kroga je ključno, da se opravi klinični pregled vseh čebeljih družin v zapori, tudi v tistih čebelnjakih, ki (še) niso registrirani. Saj le s tem, ko je celotno območje pregledano in vsa žarišča ustrezno sanirana, se bolezen lahko učinkovito zatira in preprečuje nadaljnje širjenje. Žal se prepogosto dogaja, da čebelar iz strahu pred zaporo bolezni ne prijavi, ampak poskuša okužbo sanirati sam. V takem primeru sanacija pogosto ni opravljena dovolj temeljito, da bi bila okužba zaustavljena, ampak se še naprej pojavlja iz leta v leto. Poleg tega ob takem ravnanju območje okrog čebelnjaka ni pregledano, žarišča bolezni v okolici niso odkrita in odstranjena, zato še naprej predstavljajo vir okužbe. Posledica takega ravnanja so številna žarišča na nekaterih območjih v Sloveniji. Vsi čebelarji bi se morali zavedati, da je za uspešno zatiranje hude gnilobe nujno, da bolezen prijavijo veterinarski službi.

Odzivnost in sodelovanje čebelarjev ter predstavnikov čebelarskih društev pri kliničnih pregledih stojišč, ki jih mora po uradni dolžnosti opraviti veterinar VF NVI na območju okrog žarišča bolezni, je zelo zaželen. Omenjeni lahko sodelujejo z veterinarjem pri organizaciji in poteku klinič-

nih pregledov, saj običajno razpolagajo s podatki, kot je telefonska številka, na katero je čebelar dosegljiv, ali lokacija čebelnjaka. Pomagajo lahko tudi čebelarjem, ki sami fizično ne zmorejo pri pregledu veterinarju pokazati vseh satov z zalego. Predvsem pa je njihova pomoč dobrodošla ob sanacijah čebelnjakov, predvsem tistim čebelarjem, ki sami tega ne bi zmogli dobro opraviti. Merilo uspešnosti in doslednosti sanacije je zagotovo velik pokazatelj zavezitve širjenja bolezni. Žal se v praksi ničkolikokrat zgodi, da je rezultat kontrolnega pregleda, ki ga opravimo 30 dni po opravljeni sanaciji žarišča, ponovno pozitiven, kar se ponekod celo ponovi še po naslednjem pregledu. Do tega prihaja najpogosteje zaradi neupoštevanja navodil glede sanacije žarišča.

Pogoste so tudi napake pri oskrbi rojev, ki ne izvirajo iz lastnega čebelarstva. Vsak neznan roj sodi v karanteno, saj čebele s seboj lahko prinesejo kužni med. Roj ogreemo in damo v škatlo na hladno za toliko časa, da opazimo prve mrtvice na dnu škatle, to nam je znak, da so čebele porabile s seboj prineseno hrano. Nato jih pretresemo v razkužen panj, v katerega damo nove satne osnove in hrano.

Težava na terenu so še vedno neregistrirani čebelnjaki. Tudi če gre za eno samo čebeljo družino, mora biti čebelnjak registriran, saj lahko sicer ob izbruhu bolezni ostane nepregledan in tako morebiten vir okužbe za ostale družine v okolici. Opozoriti pa moramo tudi na problematiko v zvezi s prevozi čebel na pašo in ob prodaji. Po veljavni zakonodaji mora čebelar pred vsakim premikom čebel opraviti pregled svojih čebeljih družin in podpisati izjavo, s katero odgovarja, da pri družinah ni opazil bolezenskih sprememb. Veterinar VF NVI nato na tej izjavi potrdi, da čebele ne izvirajo s področja, ki je pod zaporo zaradi izbruha ali suma hude gnilobe čebelje zalege. Dogaja pa se, da čebelarji družin ne pregledajo in samo podpišejo izjavo, ali družine sicer pregledajo, vendar imajo premalo znanja, da bi prepoznali spremembe. S selitvijo okuženih družin se tako bolezen širi na večje razdalje.

ZAKLJUČEK

Huda gniloba čebelje zalege predstavlja na nekaterih območjih v Sloveniji velik problem, saj odkrivamo vedno nova žarišča. Zato je nujno, da se čebelarji zavedajo svoje odgovornosti kot imetniki živali, da se naučijo prepoznati bolezenske znake, da o sumu na bolezen obvestijo veterinarja VF NVI in natančno upoštevajo navodila v

zvezi s sanacijo bolezni. Samo s skupnim sodelovanjem nam lahko uspe ustaviti širjenje bolezni, zmanjšati število žarišč, s tem pa tudi zmanjšati število zapor, ki povzročajo čebelarjem ekonomsko škodo zaradi prepovedi prodaje in selitve na pašo.

LITERATURA

- Genersch E. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. J Invertebr Pathol 2010; 103 (suppl. 1): S10–S19.
- Genersch E, Ashiralieva A, Fries I. Strain- and genotype-specific differences in virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 7551–7555.
- Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int J Syst Evol Microbiol 2006; 56: 501–511.
- Jurić A. Sanacija žarišča pri hudi gnilobi čebelje zalege – sodelovanje med veterinarji in čebelarji. Slov. čebelar 2018, 120: 74-75.
- Poppinga L, Genersch E. Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honey bee larvae. Current Opinion in Insect Science 2015; 10: 29–36.
- Pravilnik o ukrepih za ugotavljanje, zatiranje, obveščanje in preprečevanje hude gnilobe čebelje zalege (*Pestis apium*) (Uradni list RS, št. 119/06 in 38/07).
- Skerbiš S, Lešnik V. Splošno o hudi gnilobi – klinični znaki in prepoznavanje bolezni. Slov. čebelar 2018; 120: 68-69.



SLADKOR V PRAHU KOT NOV MEDIJ ZA DIAGNOSTIKO VIRUSOV MEDONOSNE ČEBELE (*Apis mellifera*) V SKLOPU DOBRE ČEBELARSKE PRAKSE PO SLADKORNEM TESTU ZA DETEKCIJO VAROJE

Antonella CERSINI¹, Jorge RIVERA GOMIS, Marco PIETROPAOLI, Jernej BUBNIČ, Giovanni FORMATO

Izvleček

Med patogeni medonosne čebele igrajo virusi pomembno vlogo. Do sedaj jih je bilo opisanih že veliko vrst. Številne vrste virusov so lahko prisotne v čebelnjaku v subklinični obliki, spet druge vrste pa lahko povzročajo resna obolenja čebel ali celo propad cele družine. Za spremljanje prisotnosti in količine virusov v čebeljih družinah se običajno vzorči odrasle čebele ali zalego iz satja. V sklopu projekta BPRACTICES smo razvili in testirali novo metodo vzorčenja s sladkorjem v prahu. Metoda vzorčenja je enaka kot metoda za določanje stopnje napadenosti s pršico varoja. Vzorec odraslih čebel vzamemo iz satja in jih damo v kozarec zaprt z mrežastim pokrovom, dodamo sladkor v prahu in stremo kozarec nad čisto površino, da zberemo sladkor v prahu, ki ga uporabimo kot matriks za laboratorijske analize. Izolacijo virusov lahko opravimo iz sladkorja ali pa odraslih čebel, ki smo jih uporabili za testiranje stopnje napadenosti z varoja. Za določanje količine virusa akutne čebelje paralize (ABPV), kronične čebelje paralize (CBPV) in virusa deformiranih kril (DWV) je bila uporabljena metoda RT-PCR v realnem času. RT-PCR v realnem času narejen iz sladkorja v prahu se kaže kot zanimiva tehnika za detekcijo virusov. Ta tehnika vzorčenja se lahko uporabi tudi za ostale povzročitelje čebeljih bolezni kot sta *Paenibacillus larvae* ali *Melissococcus plutonius*. Nadaljnje raziskave so potrebne za določanje občutljivosti in specifičnosti metode.

Ključne besede: čebelji virusi, sladkorni test, varoja, RT-PCR

POWDER SUGAR AS NEW MATRIX FOR DIAGNOSIS OF HONEYBEE (*Apis mellifera*) VIRUSES IN THE CONTEXT OF GOOD BEEKEEPING PRACTICE OF THE VARROA INFESTATION LEVEL ASSESSMENT

Abstract

Among all honeybee pathogens, viruses play an important role in honeybee health. So far, many different viruses of honeybees have been characterized. Many species of viruses can be present in the apiary in a subclinic phase and some of them can cause significant damage or even collapse of honeybee colonies. To monitor the presence and the quantity of viruses in honeybee colonies, usually samples of adult bees or brood are taken from the combs. In the context of the BPRACTICES project, we tested and developed a new sampling method using powder sugar. The sampling technique is the same as the one in use to assess the Varroa infestation level. The sample of adult bees is taken from the comb and placed in a jar closed with a mesh cap. Powdered sugar is added and the jar is shaken above a clear surface to collect the powdered sugar that will be used as a matrix for laboratory analyses. The investigation of the viruses can be carried out both from powdered sugar and/or from adult bees tested for the varroa infestation level assessment. The amount of Acute Bee Paralysis Virus (ABPV), Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) and Deformed Wing Virus (DWV) in the samples was determined by Real Time RT-PCR. The Real Time RT-PCR carried out from powdered sugar may represent a new, valuable technique to detect viruses. This method, using powder sugar, could also be used for early detection of other honeybee pathogens, like *Paenibacillus larvae* or *Melissococcus plutonius*. Further research should be carried out to set up sensitivity and specificity of this new diagnostic method..

Key words: bee viruses, powder sugar test, varroa, RT-PCR

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri, giovanni.formato@izslt.it

POVIJESNI PRIKAZ NASTAVNIH, ZNANSTVENIH I STRUČNIH AKTIVNOSTI SURADNIČKIH HRVATSKO-SLOVENSКИH INSTITUCIJA NA PODRUČJU PČELARSTVA

Ivana TLAK GAJGER¹, Vlasta JENČIČ², Maja SMODIŠ ŠKERL³, Metka PISLAK OCEPEK⁴

Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu osnovan je odlukom Senata Sveučilišta u Zagrebu 14. prosinca 1936. godine kao zasebna znanstvena i nastavna jedinica pod nazivom Institut za biologiju i patologiju pčela, svilaca, riba, rakova, školjki i drugih mekušaca. Iste godine odlukom Fakulteta je naziv Institut promijenjen u Zavod. Osnivanje Zavoda proizašlo je iz potrebe za razvojem i unaprjeđenjem nastave, znanosti i praktičnog rada iz veterinarstva, a na područjima pčelarstva i ribarstva. Osnivač Zavoda bio je tadašnji docent, a kasnije profesor i akademik Ivo Tomašec. Naziv Zavoda je nekoliko puta mijenjan, a Statutom iz 1966. godine je ustaljen njegov današnji naziv, jer se većina djelatnosti ostvarivala na područjima biologije i patologije riba i pčela.

Predmet Biologija i patologija pčela i svilaca bio je 1919. godine sastavni dio prvog nastavnog plana Veterinarske visoke škole, a od 1924. godine i Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Nastava iz predmeta Biologija i patologija pčela i svilaca prvi put je održana 1933. godine, a predmet je bio pozicioniran u VIII. semestru. U početku rada Fakulteta nije bilo stalnog nastavnika za predmete iz područja pčelarstva, pa je nastavnik iz Biologije i patologije pčela i svilaca bio prof. dr. sc. Z. Lorković (1933.-1935.). Kao prvi stalni nastavnik za kolegije iz područja biologije i patologije pčela (1935./1936.) bio je izabran dr. sc. I. Tomašec. Od akademske godine 1970./1971. godine izmijenjen mu je naslov u Biologija i patologija pčela. Više slovenskih nastavnika i znanstvenika su dijelove svojeg obrazovanja na području pčelarstva i ribarstva stekli na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu (Tablica 1.).

Akademik I. Tomašec jedan je od osnivača Pčelarskog saveza Hrvatske, njegov prvi predsjednik (12. prosinca 1954. – 1956.; 1964. – 1974.), kao i dugogodišnji član

uređivačkog odbora službenog glasila Saveza. Godine 1968. izabran je i za predsjednika Saveza pčelarskih organizacija Jugoslavije. Pod mentorstvom akademika I. Tomašeca usavršavao se veći broj stručnjaka za bolesti pčela, poput prof. dr. sc. N. Snoj koja je nakon doktorata o noze-mozi osnovala na Veterinarskom odjelu Fakulteta za agromiju, šumarstvo i veterinarstvo u Ljubljani zavod sličan našem u Zagrebu. Time je akademik I. Tomašec značajno pridonio razvoju pčelarstva kao gospodarske grane. Akademik I. Tomašec prvi je izvan Slovenije kojem je Zveza čebelarskih društava Slovenije dodijelila Red Antona Janše prvoga stupnja kako bi mu se „odužila za njegov sveopći požrtvovan rad na napretku pčelarstva“ (1965.). Prof. Đ. Sulimanović izvodio je nastavu za studente veterinarske medicine iz predmeta Bolesti in higijena gojitve rib in čebel od 1992. do 2003. godine na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Ljubljani.

Prof. dr. sc. V. Jenčić je tijekom travnja 2011. godine boravila na razmjeni nastavnika na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta u Zagrebu (CEEPUS stipendija). Profesori Veterinarskog fakulteta u Zagrebu (prof. Đ. Sulimanović i prof. Z. Petrinec) često su sudjelovali u povjerenstvima za ocjenu i obranu znanstvenih magistarskih i doktorskih radova na području bolesti pčela i riba na Veterinarskom fakultetu u Ljubljani. Izv. prof. I. Tlak Gajger aktivno je sudjelovala u radu povjerenstva za ocjenu i obranu doktorskog rada na području bolesti pčelinjih zajednica pri Fakultetu za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru (2016.).

U okviru Programa za cjeloživotno učenje Erasmus stručna praksa na Kmetijskom inštitutu Slovenije je boravila studentica zagrebačkog veterinarskog fakulteta Martina Sakač (5. svibanj do 5. kolovoz 2014.) pod mentorstvom doc. dr. sc. I. Tlak Gajger i prof. dr. sc. A. Gregorca.

¹ Izv. prof. dr. sc., Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Hrvatska

² Prof. dr., Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

³ Dr., Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana

⁴ Dr., Nacionalni veterinarski inštitut, Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana

U novije vrijeme suradnička znanstvena aktivnost Veterinarskog fakulteta u Zagrebu i Kmetijskog inštituta u Sloveniji vidljiva je kroz realizaciju međunarodnog bilateralnog hrvatsko-slovenskog projekta: Biokemijski i histokemijski pokazatelji u srednjem crijevu medonosne pčele (*Apis mellifera*) nakon tretiranja nozemoze primjenom dodataka hrani (2016. - 2017.).

Godine 2016. je uspješno završen postupak akreditacije Laboratorija za bolesti pčela – APISlab na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu, koji je osposobljen prema zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025:2007 za obavljanje laboratorijskih ispitivanja u području veterinarske medicine u opsegu: Postupak ispitivanja saća s pčelinjim leglom na prisutnost spora bakterija *Paenibacillus larvae* pomoću mikroskopske pretrage; te Postupak utvrđivanja prisutnosti i morfološka identifikacija nametnika *Aethina tumida*, *Varroa destructor* i *Tropilaelaps spp.* U okviru uspostavljanja i održavanja sustava kvalitete pri radu laboratorija je obavljeno međulaboratorijsko testiranje s referentnim laboratorijem za bolesti pčela u Sloveniji (Veterinarski fakultet Univerze u Ljubljani) pod nazivom Međulaboratorijsko pretraživanje na prisutnost *Paenibacillus larvae* metodom mikroskopske bakteriološke pretrage (2015.). APISlab je i Nacionalni referentni laboratorij (NRL).

Za vrijeme Jugoslavije, sve laboratorijske pretrage na prisutnost virusnih uzročnika bolesti riba iz uzoraka prikupljenih na području Slovenije obavljene su u laboratorijima Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.

Važnost pčela i zdravstvene problematike pčelinjih zajednica bili su prioritet od samog osnivanja Veterinarskog zavoda Slovenije. U početku, laboratorijsku dijagnostičku aktivnost su provodili stručnjaci Bakteriološkog instituta, a krajem pedesetih godina prošlog stoljeća je aktivnost na tom području preuzela dr. sc. Neža Snoj, koja je završila dodiplomski i poslijediplomski studij na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu. Po uzoru Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela u Zagrebu, osnovala je Institut za zdravstvenu zaštitu riba i pčela, gdje se provodila stručna, znanstvena i pedagoška djelatnost. Nakon 1993. godine Institut se udružio s Institutom za bolesti divljači i preimenovan je u Institut za zdravstvenu zaštitu divljih životinja, riba i pčela. Danas sve aktivnosti obavljaju se na Institutu za patologiju, divljač, ribu i pčele u Odjelu za zdravstvenu zaštitu i gojidbu divljači, pčela i akvakulturu. U okviru tog odjela djeluje Laboratorij za zdravstvenu zaštitu pčela i NRL za pčelinje bolesti, koji je uključen u mrežu europskih referentnih laboratorija. Pored zadataka za potrebe

Tablica 1. Prikaz završnih diplomskih, magistarskih i doktorskih radova slovenskih stručnjaka na području pčelarstva i ribarstva na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu.

Ime i prezime kandidata	Datum obrane	Naslov rada	Mentor
DIPLOMSKI RADOVI			
Danijel Gospić	17.09.2002.	Kontrolirano mriješćenje Koi šarana	Izv. prof. dr. sc. Zdravko Petrincec
MAGISTARSKI RADOVI			
Anton Jeromel	25.03.1975.	Zimovanje riba	Prof. dr. sc. Nikola Fijan Dr. sc. Ivo Balčer
Jože Ocvirk	23.06.1982.	Virusna hemoragična septikemija pastrva - prikaz slučaja bolesti i prve izolacije egtved virusa u Jugoslaviji	Prof. dr. sc. Nikola Fijan Prof. dr. sc. Neža Snoj
Aleš Gregorc	09.04.1991.	Utjecaj oplodnjaka i drugih vanjskih čimbenika na učestalost nozemoze u medonosnoj pčeli (<i>Apis mellifera carnica</i> Palm)	Prof. dr. sc. Nikola Fijan
Mira Jenko-Rogelj	17.07.1992.	Pripremanje primarnih kultura stanica kranjske pčele medarice (<i>Apis mellifera carnica</i> , Pallman, 1879)	Prof. dr. sc. Đuro Sulimanović
Barbara Strmole	23.07.1993.	Raširenost i učestalost nekih bolesti pčela na području slovenskog primorja	Prof. dr. sc. Đuro Sulimanović
DOKTORSKI RADOVI			
Neža Snoj	09.07.1958.	Otpornost spora <i>Nosema apis</i> prema nekim fizikalnim i kemijskim sredstvima	Prof. dr. sc. Ivo Tomašec

Na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu prije uvođenja obveze izrade diplomskih radova diplomirali su Kokot Božidara (27.06.1956.), Neža Snoj (04.07.1956.) i Franc Javornik (22.01.1960.).

Nacionalnog veterinarskog instituta, koji djeluje na Veterinarskom fakultetu, na Institutu provodi se dodiplomski i poslijediplomski studij iz područja bolesti i zdravstvene zaštite pčela te aktivnosti vezane uz istraživačke projekte. Kmetijski inštitut Slovenije je Druga priznata organizacija u pčelarstvu po suradnji s Čebelarskom zvezom Slovenije, a obavlja stručne zadatke na području selekcije kranjske pčele u okviru uzgojnog programa za kranjsku pčelu (Rejskega programa za kranjsko čebelo). Stručna djelatnost obuhvaća i nadzor nad uzgojem pčelinjih zajednica, kontroliranje varooze, proizvodnju i određivanje kakvoće pčelinjih proizvoda, te savjetovanja o primjeni akaricida i dezinficijensa u pčelarstvu.

U okviru zajedničkih stručnih aktivnosti, a po pozivu Slovenskog akademskog čebelarskog društva I. Tlak Gajger je u Ljubljani održala predavanje Vpliv prehranskih dodatkov na razvoj bolesti v čebelji družini (2016.). U organizaciji i po pozivu Čebelarske Zveze Slovenije I. Tlak Gajger održala je više javnih stručnih predavanja za pčelare vezano uz prepoznavanje, kontroliranje i suzbijanje bolesti pčela, ali i u vezi koordinacije s veterinarskim službama i dijagnostičkim laboratorijem, kako bi poboljšali proizvodnost i istodobno očuvali zdravlje pčelinjih zajednica (2011. - 2013.). U organizaciji i po pozivu Pčelarskog Saveza Hrvatske M. I. Smodiš Škerl održala je više stručnih predavanja za pčelare vezano uz hranidbu pčela i uzgajanje pčelinjih matica (2012., 2014., 2018.). Prof. dr. A. Gregorc održao je predavanja na simpozijumu u organizaciji Apimondia (1991., 1995.) vezano uz kvalitetu matica i nozemozu u oplodnjacima kao i predavanje na COLOSS konferenciji održanoj u Zagrebu (2009.) s temom gubitaka pčelinjih zajednica u Sloveniji.



DOBRA ČEBELARSKA PRAKSA: PRVI POSKUS DEFINICIJE, KLASIFIKACIJE IN OCENJEVANJA NA MEDNARODNEM NIVOJU

RIVERA-GOMIS, J.¹, BUBNIC, J.¹, CERSINI, A.¹, CHABERT, M.², CHAUZAT, M. P.²,
EGGENHOEFFNER, R.³, ERAT, S.⁴, HAEFEKER, W.⁵, HIGES, M.⁶, JANNONI-SEBASTIANINI, R.⁵,
LIETAER, C.⁷, LUBROTH, J.⁸, MCCABE, P.⁵, MOOSBECKHOFER, R.⁹, MUZ, D.⁴, MUZ, M. N.⁴,
OZDEMIR, N.⁴, PIETROPAOLI, M.¹, TIOZZO, B.¹⁰, RIBARITS, A.⁹, RIVIERE, M. P.²,
SMODIS SKERL, M. I.¹¹, GREGORC, A.¹¹, FORMATO, G.¹

Izvleček

Sodobno evropsko čebelarstvo se sooča s številnimi izzivi zaradi globalizacije in novih tržnih poti. Zdravstveno stanje čebeljih družin ogrožajo številni povzročitelji bolezni, kot so s pršico varjo povezani virusi, *Nosema ceranae*, *Aethina tumida* in *Vespa velutina*. Primeren način čebelarjenja, ki v prvi vrsti upošteva zdravstveno stanje v panju, je lahko najboljša rešitev za zaščito čebel, ljudi in okolja. V sodelovanju z OIE-FAO Smernicami Dobre Čebelarske Prakse (DČP) in ISO 22000 bo predstavljen prvi poskus definiranja in klasificiranja Dobrih Čebelarskih Praks (DČP).

Ključne besede: Dobra čebelarska praksa, povzročitelji bolezni čebel, smernice

GOOD BEEKEEPING PRACTICES: FIRST ATTEMPT OF DEFINITION, CLASSIFICATION AND EVALUATION AT THE INTERNATIONAL LEVEL

Abstract

Modern European beekeeping is facing numerous challenges due to globalization and new trade channels. Emerging pathogens, like varroa-associated viruses, *Nosema ceranae*, *Aethina tumida* and *Vespa velutina*, are affecting honey bee colonies health. In this context a proper management of the hives with "one health" vision could be the best solution to protect the honey bees, humans and environment. Starting from the OIE-FAO Good Farming Practices (GFPs) Guidelines and ISO 22000, a first attempt to define and classify the Good Beekeeping Practices (GBPs) will be presented.

Key words: Good beekeeping practices, bee pathogens, guidelines

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma, Italija

² ANSES, Honeybee pathology unit, European Union Reference Laboratory for bee health, Sophia Antipolis, Francija

³ University of Genova, Biophysic Section of Department of Surgery Sciences and Integrated Diagnostics (DISC), Genova, Italija

⁴ University of Namik Kemal, Tekirdag, Turčija

⁵ International Federation of Beekeepers' Associations, Roma, Italija

⁶ Centro de Investigacion Apicola y Agroambiental de Marchamalo, Marchamalo, Španija

⁷ Technologies and practices for small agricultural producers (TECA) platform of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Roma, Italija

⁸ Animal Health Service, Animal Production and Health Division, FAO, Roma, Italija

⁹ Austrian Agency for Health and Food Safety, Vienna, Avstrija

¹⁰ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova, Italija

¹¹ Agricultural Institute of Slovenia, Ljubljana, Slovenija

SPONZORJI



Bee's Hug



BOŽNAR
HIŠA MEDU



Mestna občina
Ljubljana



Slovenska
čebelarstva Akademija



Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije