

Oddelek za živinorejo

Čebelarstvo

Hacquetova ulica 17

SI-1001 Ljubljana

Slovenija

T: 01 280 51 74

F: 01 280 52 55

**PROJEKTNA NALOGA št. 430-87/2023**  
**KAKOVOST MATIC ZA OBDOBJE 2023 – 2025**

Poročilo o izvedenih nalogah v letu 2023

Vodja naloge:  
dr. Ajda Moškrič

Poročilo pripravili:  
dr. Ajda Moškrič  
doc. dr. Janez Prešern  
doc. dr. Maja Ivana Smodiš Škerl  
Katarina Mole  
Andraž Marinč  
Peter Podgoršek



31. julij 2023

---

Poročilo je v skladu z Uredbo o izvajanju intervencij v sektorju čebelarških proizvodov iz strateškega načrta skupne kmetijske politike 2023 – 2027 (Uradni list RS, št.17/23; v nadaljnjem besedilu: Uredba) in Programom podintervencije Kakovost matic, ki je objavljen na spletni strani Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.

Poročilo je oblikovano na osnovi javnega naročila z oznako JN002790/2023-W01 z dne 11. 5. 2023, Odločitve o oddaji javnega naročila, št. 430-87/2023/13 z dne 20. 6. 2023 in dvostranske pogodbe med Ministrstvom za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in Kmetijskim inštitutom Slovenije s številko 2330-23-111051.

Raziskava, skladno z javnim naročilom, zajema spremljanje kakovosti matic kranjske čebele in vzreje trotov ter proučevanje možnosti ohranjanja matic čez zimo. V okviru raziskave smo spremljali morfološke lastnosti matic kranjske čebele ter ugotavljali tehnološke rešitve za izboljšanje kakovosti vzrejenih matic.

Doseženi rezultati so nastali v okviru intervencij v sektorju čebelarških proizvodov v letih 2023–2027, ki je financiran iz sredstev proračuna RS na proračunski postavki 221643 Strateški načrt SKP 2023-2027 – sektor čebelarških proizvodov – slovenska udeležba (50%) in 221642 Strateški načrt SKP 2023-2027 – sektor čebelarških proizvodov – EU (50%), ukrepu Skupni strateški načrt 2023-2027, NRP 2330-23-0036.

<b>POVZETEK</b> .....	<b>1</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>2</b>
<b>2 METODE DELA</b> .....	<b>3</b>
2.1 SPREMLJANJE ČEBELJIH MATIC S FIZIOLOŠKIMI IN MORFOLOŠKIMI MERITVAMI.....	3
2.1.1 <i>Tehtanje ovarijev in štetje ovariol</i> .....	4
2.1.2 <i>Merjenje premera spermateke in računanje volumna</i> .....	4
2.1.3 <i>Štetje spermatozoidov v spermateki čebelje matice z uporabo hemocitometra</i> .....	4
2.2 DIAGNOSTIKA - PRISOTNOST SPOR <i>NOSEMA</i> SPP.....	5
2.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA .....	6
2.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV .....	6
2.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE .....	7
2.6 PROUČEVANJE MOŽNOSTI OHRANJANJA MATIC ČEZ ZIMO .....	8
2.6.1 <i>Proučitev vpliva prezimovanja na čebelje matice</i> .....	8
2.6.2 <i>Preverba kakovosti teh čebeljih matic</i> .....	9
2.6.3 <i>Proučitev ekonomske zanimivosti prezimovanja čebeljih matic za vzrejevalce</i> .....	9
<b>3 REZULTATI</b> .....	<b>10</b>
3.1 SPREMLJANJE MORFOLOŠKIH IN FIZIOLOŠKIH PARAMETROV ČEBELJIH MATIC .....	10
3.2 DIAGNOSTIKA – PRISOTNOST SPOR <i>NOSEMA</i> SPP.....	12
3.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA .....	12
3.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV .....	13
3.4.1 <i>Rasne karakteristike – obarvanost obročkov zadka</i> .....	14
3.4.2 <i>Mirnost ali obnašanje</i> .....	15
3.4.3 <i>Rojivost</i> .....	16
3.4.4 <i>Živalnost</i> .....	16
3.4.5 <i>Donos medu</i> .....	17
3.4.6 <i>Odpad varoj in čistilna sposobnost</i> .....	18
3.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE .....	20
3.6 PROUČEVANJE MOŽNOSTI OHRANJANJA MATIC ČEZ ZIMO .....	21
3.6.1 <i>Proučitev vpliva prezimovanja na čebelje matice</i> .....	21
3.6.2 <i>Preverba kakovosti uspešno prezimljenih čebeljih matic</i> .....	21
3.6.3 <i>Ekonomska zanimivost prezimovanja čebeljih matic za vzrejevalce</i> .....	21
<b>4 INTERPRETACIJA REZULTATOV</b> .....	<b>22</b>
<b>5 SPLOŠNE UGOTOVITVE</b> .....	<b>24</b>
<b>6 VIRI</b> .....	<b>25</b>
<b>PRILOGA 1: DIREKTNO TESTIRANJE ČEBELJIH DRUŽIN</b> .....	<b>1</b>

## POVZETEK

V raziskavi smo v obdobju od podpisa pogodbe do 31. 7. 2023 spremljali kakovost vzreje matic kranjske čebele v Sloveniji. Matice izhajajo iz selekcioniranih matičarjev. Skupno smo vzorčili in analizirali 155 matic iz 30 vzrejališč. Izvedli smo morfološko analizo, pregledali iztrebke matic na prisotnost spor *Nosema* spp., pri deležu vzorčene populacije (30 matic) pa smo z disekcijo določili tudi maso ovarijev, število ovariol, izmerili premer in izračunali povprečen volumen spermateke ter določili število spermatozoidov v spermateki. Pri pregledovanju spermatozoidov pod mikroskopom smo ovrednotili delež živih spermatozoidov.

Pri kandidatnih matičarjih smo z molekularnimi tehnikami preverili ali pripadajo ustrezni mitohondrijski liniji (to je linija C) ter ovrednotili variabilnost odbranih vzorcev na podlagi dveh mitohondrijskih lokusov (tRNA-Leu in COI).

Trotovsko seme potomcev matic vzrejališča Kmetijski inštitut Slovenije smo shranili z uporabo postopkov za dolgoročno shranjevanje genetskega materiala.

Zbrali in obdelali smo podatke v okviru direktnega testiranja vzrejevalcev, ki so oddali podatke do 25. 7. 2023.

V okviru proučevanja možnosti ohranjanja matic čez zimo smo pripravili družine, v katerih bodo prezimljale matice, v Kielerjevih plemenilnikih. Opravili smo pregled aktualnega tržišča v letu 2023, ter naredili osnovno kalkulacijo cene prezimovanja za leto 2023 ter ocenili ekonomičnosti prezimovanja.

## 1 UVOD

Vzreja matic je v sodobnem čebelarstvu pomembna dejavnost. Uspešna vzreja temelji na upoštevanju naravnih zakonitosti, zato se pri vzreji poskuša ustvariti podobne razmere, kot so v naravni vzreji matic. Vzreja kvalitetnih, reproduktivnih matic je cilj slehernega čebelarja vzrejevalca. Ker v Sloveniji čebelarimo z avtohtono čebeljo podvrsto, katere lastnosti želimo ohraniti oz. izboljšati, je vzreja kakovostnih matic zelo pomembna. Na ta način tudi prispevamo k razvoju, ohranjanju zdravih čebeljih družin in pridelavi potrebnih količin varnih in kakovostnih pridelkov, posredno pa vplivamo na ohranjanje genetskega sklada čiste kranjske čebele.

Osnovna funkcija matice je intenzivno zaleganje jajčec in izločanje feromonov, kar skupaj z delavkami omogoča optimalen razvoj čebelje družine. Matica prenese na svoje potomce genetsko pogojene etološke, gospodarske in druge lastnosti.

Vzrejevalci z vzrejenimi maticami »opremljajo« tudi lastne družine v selekcijskem čebelnjaku, kar je nujno za linijsko vzrejo preko več let. Direktno testiranje družin znotraj selekcijskega čebelnjaka predstavlja »kvalifikacije« za naslednjo vzrejno sezono. Delavke odbranih matičarjev morajo ustrezati morfološkemu in molekularnemu opisu podvrste *Apis mellifera carnica*. S sodobnimi molekularnimi tehnikami kot enega od pogojev za ustreznost spremljamo tudi mitohondrijsko linijo kandidatnih matičarjev.

Vzrejevalci čebeljih matic nas pogosto seznanjajo s povpraševanjem po prezimljenih maticah, zlasti v poznih zimskih in zgodnjih spomladanskih mesecih, torej v obdobju, ko so čebelje družine že aktivne, vzreja matic pa se še ni začela. Najpogostejši način prezimovanja matic je v rezervnih družinah, vendar tak način za vzrejevalca lahko predstavlja znaten strošek. V porastu so znanstvene raziskave, ki proučujejo uspešno vzpostavitev zimske banke matic in kakovost teh matic po prezimitvi (Rousseau in Giovenazzo, 2021). Ocenjujemo, da bi bil tak način prezimovanja ekonomsko ugodnejši, saj bi v eni družini lahko prezimovalo več matic naenkrat. Žal smo se v letih 2020 – 2022 pri preizkušanju tovrstnega prezimovanja matic srečali s številnimi težavami. Zato bomo v letih 2023 in 2024 preučili način prezimovanja matic v nizkovolumskih Kielerjevih plemenilnikih in ovrednotili uspešnost.

## 2 METODE DELA

### 2.1 SPREMLJANJE ČEBELJIH MATIC S FIZIOLOŠKIMI IN MORFOLOŠKIMI MERITVAMI

V letu 2023 smo pregledali 155 matic iz tridesetih odobrenih vzrejališč gospodarskih matic. Matice so izvirale iz vzrejališč iz vseh 11 statističnih regij v Sloveniji: gorenjske, goriške, JV Slovenije, koroške, osrednjeslovenske, podravske, primorsko-notranjske, pomurske, posavske, savinjske in zasavske regije. Zabeležili smo podatke na matičnicah (rodovniška številka, številka matice), vrsto matičnice in število čebel spremljevalk. Zabeležili smo tudi morebitne poškodbe matic. Po pet matic iz vsakega vzrejališča smo uspavali z ogljikovim dioksidom (CO<sub>2</sub>) skupaj s spremljevalkami; vsako matico smo stekali z analitsko tehtnico (Mettler Toledo). Po tehtanju smo matico preložili v sterilno plastično petrijevko in počakali, da se iztrebi. Iztrebek smo redčili v 200 µL sterilne destilirane vode in shranili na –20 °C do nadaljnje obdelave. Iztrebek smo kasneje pregledali na prisotnost spor mikrosporidija *Nosema* spp.



**Slika 1. Tehtanje matic (levo) in vzorčenje iztrebka (desno)**

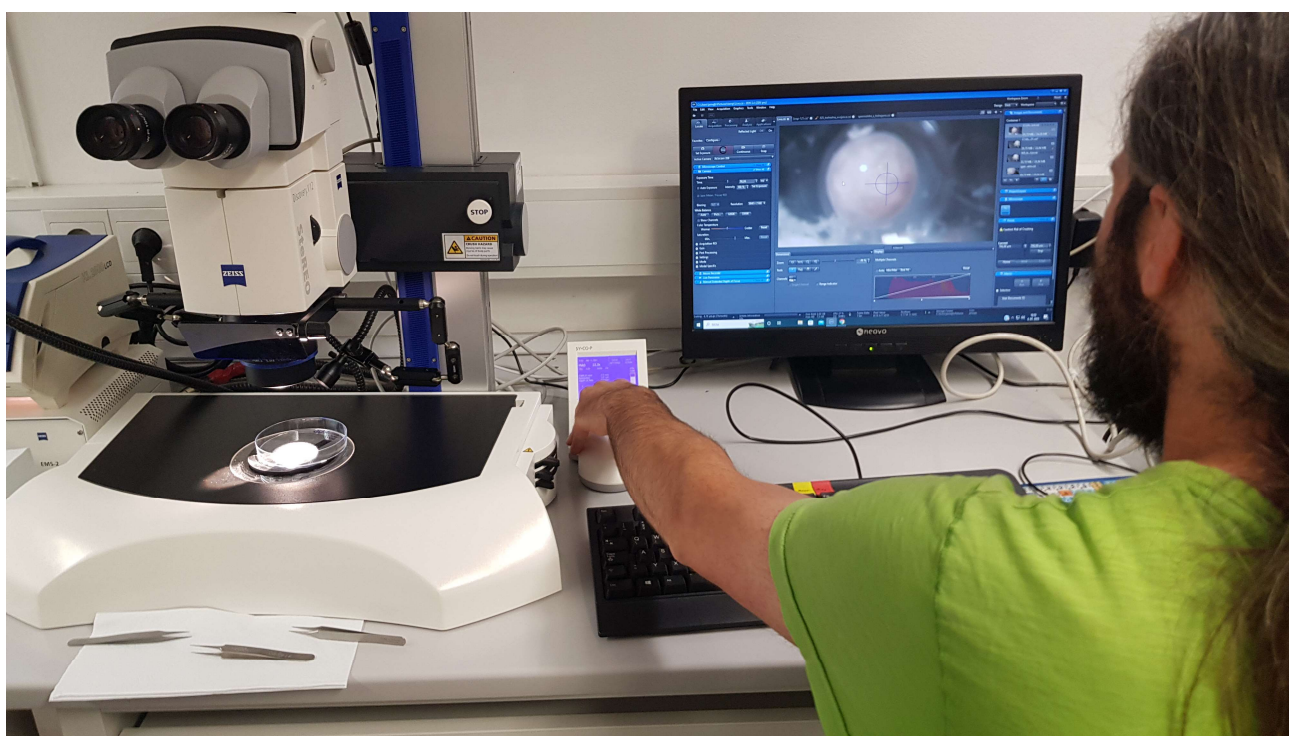
Dodatno smo na vzorcu tridesetih matic iz petih vzrejališč opravili še disekcijo. Matice smo pred sekcijo najprej uspavali s CO<sub>2</sub>, jih stekali ter vzorčili iztrebek (Slika 1) kot opisano zgoraj. Nato smo jih ponovno uspavali s CO<sub>2</sub> in izvedli sekcijo. Odstranili in stekali smo ovarije ter prešteli število ovariol v obeh ovarijih. Odstranili smo spermateko, s pomočjo stereomikroskopa odstranili ovoj iz trahej ter izvedli po 4 meritve premera vsake spermateke. Na podlagi teh meritev smo izračunali volumen spermateke. Po merjenju smo ocenili število spermatozoidov, ki so bili prisotni v spermateki. Ocenili smo tudi delež živih spermatozoidov v vzorcu. Za kasnejše analize smo shranili tudi preparat črevesa vsake od matic v disekciji. Po eno nogo vsake matice smo shranili za ekstrakcijo DNA in določanje mitohondrijske linije z molekularno metodo PCR.

### 2.1.1 Tehtanje ovarijev in štetje ovariol

Odstranjena ovarija smo skupaj stekali z analitsko tehtnico (Mettler Toledo). Po tehtanju smo ovarije fiksirali v 1 ml 10 % raztopini formalina in shranili na 4 °C do štetja. Število ovariol smo določili s štetjem posameznih ovariol pod lupo ter izračunali povprečno število ovariol pri vsaki matici.

### 2.1.2 Merjenje premera spermateke in računanje volumna

Pod svetlobnim mikroskopom smo pri vsaki spermateki na objektnem stekelcu najprej s pomočjo pincete odstranili ovojnico iz trahej.



Slika 2. Merjenje premera spermateke.

Nato smo spermateko slikali in izmerili po 4 premera ( $d$ ), ki smo jih potem izpovprečili ( $\bar{d}$ ). Na podlagi povprečnega premera smo izračunali volumen spermateke (Enačba 1).

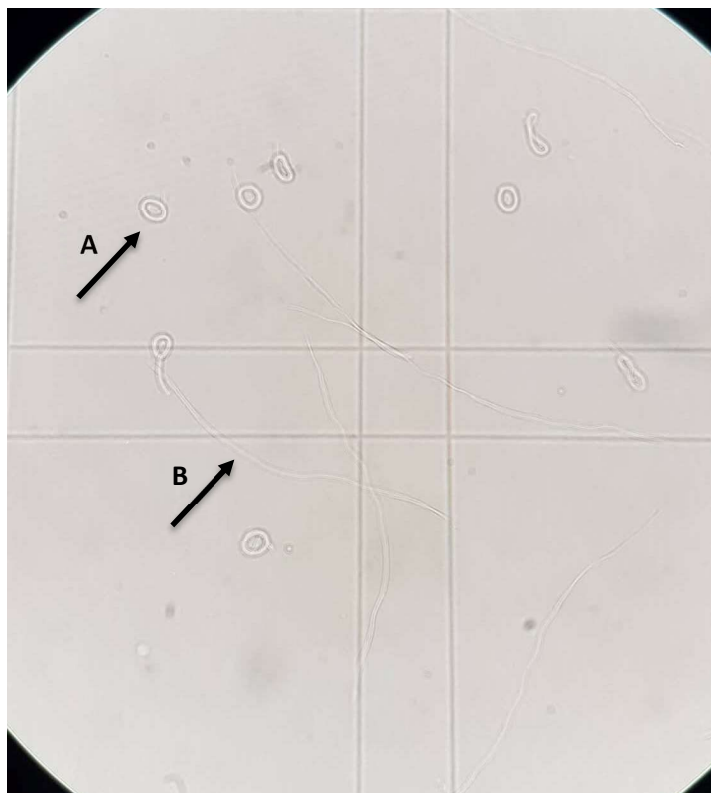
Enačba 1. Izračun volumna

$$V = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{\bar{d}}{2}\right)^3$$

### 2.1.3 Štetje spermatozoidov v spermateki čebelje matice z uporabo hemocitometra

Posamezno spermateko smo s pinceto odprli v 50  $\mu$ L fiziološke raztopine. Po 5 minutni inkubaciji, ko so se semenčice enakomerno razporedile v raztopini, smo dodali 950  $\mu$ L destilirane vode. Semenčice, ki so žive, se v prisotnosti destilirane vode zvijejo zaradi nabrekanja repkov (Nur in sod., 2011). Inkubacija je trajala 10

minut pri sobni temperaturi, nato smo dodali 4 ml fiksirnega sredstva (sestava: 0,6 g NaHCO<sub>3</sub>, 2 ml formaldehida, destilirana voda do 200 ml). Do štetja spermatozoidov smo fiksirane vzorce shranili na 4 °C. Vzorec smo pred nanosom na Bürker – Türkov hemocitometer rahlo pretresli, da so se spermatozoidi enakomerno razporedili. Nato smo s pipeto nanесли kapljico suspenzije v »V« utor hemocitometra ob robu krovnega stekelca in napolnili površino kamrice brez preplavljanja. Pred štetjem smo nekaj minut počakali, da so se spermatozoidi umirili na dnu. Spermatozoide smo prešteli pod svetlobnim mikroskopom v 80 kvadratkih na mreži hemocitometra pri 400 x povečavi. Da bi ocenili delež živih spermatozoidov, smo naknadno pri vsakem vzorcu prešteli po 200 spermatozoidov in na podlagi oblike sklepali, ali so bili spermatozoidi pred fiksacijo živi ali mrtvi. Živi spermatozoidi se po dodatku destilirane vode zvijejo, mrtvi pa ostanejo iztegnjeni (Harizanis, 1983; Nur in sod., 2011; Fuse in sod., 1993). Iz števila prešteti spermatozoidov smo izračunali delež živih spermatozoidov v spermateki.



**Slika 3. Prikaz spermatozoidov pod mikroskopom, štetje spermatozoidov in ocena deleža živih spermatozoidov v spermateki. A – zviti spermatozoid, B – iztegnjen spermatozoid. 400x povečava.**

## 2.2 DIAGNOSTIKA - PRISOTNOST SPOR NOSEMA SPP.

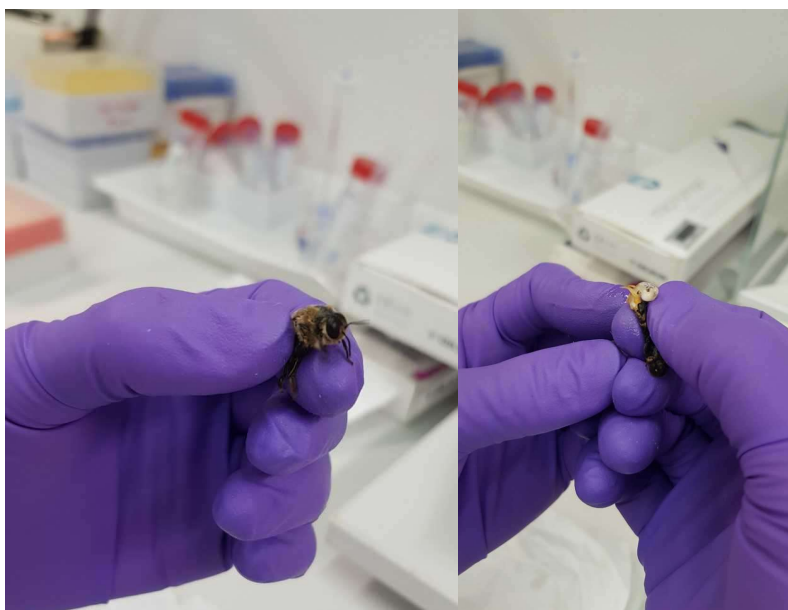
Število spor *Nosema* spp. smo določali z mikroskopsko preiskavo vzorcev iztrebkov matic. Za prisotnost spor *Nosema* spp. smo pregledali skupno 182 vzorcev iztrebkov. Pri maticah, ki smo jih uporabili v disekciji, smo na prisotnost spor pregledali poleg vzorcev iztrebkov tudi 30 vzorcev homogeniziranih zadkov čebel spremljevalk



ter 30 preparatov črevesa teh matic. Vse vzorce smo v suspenziji pregledali pod svetlobnim mikroskopom na hemocitometru Bürker – Türk. Pri pojavu spor v vzorcu smo upoštevali vse spore v 400 poljih hemocitometra.

### 2.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENskega MATERIALA

Dolgoročno shranjevanje genskega materiala kakovostnih matic smo izvedli sodelavci Kmetijskega inštituta Slovenije. S sterilno tehniko smo odvzeli seme trotom, potomcem odbranih matic po standardnem postopku (Cobey in sod., 2015).



**Slika 4. . Odvzem trotovskega semena za dolgoročno shranjevanje.**

Seme smo shranili na  $-80^{\circ}\text{C}$ , skladno s priporočili o dobri praksi shranjevanja tovrstnega genskega materiala za kasnejšo uporabo.

### 2.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV

Analizirali smo rezultate direktnega testa, ki so ga v letu 2023 opravljali vzrejevalci čebeljih matic v svojih selekcijskih čebelnjakih. Vsako vzrejališče gospodarskih matic testira dvajset družin iz svojega selekcijskega čebelnjaka. Vzrejališča rodovniških matic pa testira štirideset družin. Vzrejevalci tekom testiranja ocenijo rasne karakteristike (obarvanost obročkov zadka), rojivost, živalnost, donos in mirnost ter test napadenosti z varojami in test čistilne sposobnosti. V letu 2023 je rezultate testiranja do vključno 25. 07. 2023 oddalo 21 vzrejevalcev s 412 čebeljimi družinami. Navodila za izvajanje direktnega testa so v prilogi 1.

Rezultate, ki so jih poslali posamezni vzrejevalci, smo analizirali in pripravili priporočila za odbiro. Priporočila bomo v začetku septembra vzrejevalcem poslali po pošti, skupaj s potrdilom o številu matic, ki so bile v letu

2022 vpisane v rodovniško knjigo. Na podlagi pravilno izvedenega direktnega testa bomo pridali tudi potrdilo o pravilni izvedbi direktnega testa. Splošne rezultate direktnega testiranja podajamo v poglavju 3.4 tega poročila.

## 2.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE

Mitohondrijska DNA se deduje izključno po materini liniji, torej imajo vse delavke, ki so potomke iste matice, enak genetski zapis mitohondrijske DNA. Fragment intergenske regije **t-RNA<sub>Leu</sub> – Cox2** (v nadaljevanju tRNA-Leu) je najbolj široko uporabljen mitohondrijski označevalec za razlikovanje med linijami in nekaterimi podvrstami medonosne čebele (pregledni članek Meixner in sod., 2013). Za podvrste, ki pripadajo mitohondrijski liniji C, kamor spada tudi kranjska čebela, je značilno kratko zaporedje in odsotnost variabilnosti v dolžini fragmenta tRNA-Leu. Mitohondrijsko linijo smo določili genetsko z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) s pomnoževanjem tega specifičnega mitohondrijskega fragmenta, ki je uporaben kot napovedovalec pripadnosti linijam C, M, A ali O.

Za celosten vpogled v variabilnost populacije slovenske kranjske čebele v vzrejališčih matic smo dodatno izbrali še en mitohondrijski označevalec na genu **COI** (citokrom oksidaza 1).

Skupno smo v letu 2023 vzorčili in analizirali 70 vzorcev kandidatnih matičarjev. Celokupno DNA smo ekstrahirali iz nog bub ali delov ličink čebel delavk. Dodatno smo analizirali še odvzeto tkivo matic v sekciji (1 noga/matico). Skupno smo tako analizirali 100 vzorcev.

Za ekstrakcijo DNA smo uporabili komercialni komplet NucleoMag Tissue kit (Macharey-Nagel, Nemčija) in napravo MagMAX Express Magnetic Particle Processor (ThermoFisherScientific). Sledili smo prilagojenemu protokolu proizvajalca. DNA smo eluirali v 50 µL elucijskega pufra. Ekstrakte DNA smo shranili na 5 °C do sledečih postopkov.

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo uspešno pomnožili mitohondrijska fragmenta tRNA-Leu ter COI. Osnovni volumen reakcije je bil 15 µl. Reakcijska mešanica je vsebovala 7,5 µL 2x mešanice DreamTaq MasterMix polimeraze (ThermoFischer Scientific, ZDA), po 0.2 µL 20 uM vsakega začetnega oligonukleotida, 2 µL izolirane DNA in 5,1 µL destilirane H<sub>2</sub>O (Sigma, ZDA). Informacije o markerjih, nukleotidnih zaporedjih oligonukleotidnih začetnikov in nastavitve programa PCR smo povzeli po literaturi (Garnerey in sod., 1998 (tRNA-Leu), 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). Specifični začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili, ter vir so navedeni v Preglednici št. 1.

**Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri pomnoževanju specifičnih mitohondrijskih regij**

OZNAČEVALEC	OLIGONUKLEOTIDNI ZAČETNIK	zaporedje od 5' proti 3' koncu	Vir
tRNA-Leu	COI_3363F	GGCAGAATAAGTGATTG	Gernerey in sod., 1993
	COI_3934R	CAATATCATTGATGACC	
COI	LCO 1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTG	Folmer in sod., 1994
	HCO 2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAT	

Specifične fragmente smo pomnožili v cikličnem termostatu pri naslednjih pogojih:

OZNAČEVALEC	tRNA-Leu	COI
Začetna denaturacija	3 min 95°C	4 min 95°C
3-stopenjsko pomnoževanje fragmentov (35 ciklov):		
Denaturacija	1 min 95°C	1 min 95°C
Prileganje	1 min 50°C	1 min 45°C
Podaljševanje	1min 72°C	2 min 30 s 72°C
Zaključno podaljševanje	5 min 72°C	7 min 72°C

Za negativno kontrolo smo uporabili reakcijsko mešanico brez DNA, za pozitivno kontrolo pa smo uporabili predhodno uporabljen ekstrakt DNA, pri katerem smo predhodno uspešno pomnožili in prebrali specifična nukleotidna zaporedja.

Po 5 µl pomnoženega produkta smo nanesti v jamice v 1 % agaroznem gelu z dodatkom EtBr (etidijevega bromida) v 0,5 x pufri TBE na horizontalni elektroforezi. Za oceno dolžine fragmenta smo uporabili standardno lestvico GeneRuler™ 100 bp DNA (ThermoScientific, ZDA), ki smo jo sočasno z vzorci nanesti v eno od jamic na gelu. Produkta PCR smo po končani elektroforezi vizualizirali s pomočjo UV transiluminatorja pri valovni dolžini 280 nm. Uspešno pomnožene produkte PCR smo encimsko očistili z reagentom ExoSAP-IT (ThermoFischer Scientific, ZDA) po navodilih proizvajalca. Določanje nukleotidnega zaporedja očiščenih produktov PCR je bilo izvedeno po Sangerjevi metodi z obema začetnima oligonukleotidoma.

Kromatograme zaporedij DNA smo uredili v programu Geneious 2023.0.1. (<https://www.geneious.com>). Urejena homologna zaporedja smo poravnali bodisi z dodatkom ClustalW (Thompson in sod. 1994) ali z dodatkom MAFFT v.7 (Katoh, 2013) z uporabo algoritma E-ins-i. Odrezali smo ostanek zaporedij začetnih oligonukleotidov. Kodirajoča zaporedja označevalca COI smo prevedli v aminokislinska zaporedja in preverili, da ne vsebujejo stop-kodonov.

## 2.6 PROUČEVANJE MOŽNOSTI OHRANJANJA MATIC ČEZ ZIMO

### 2.6.1 Proučitev vpliva prezimovanja na čebelje matice

Priprave na proučitev vpliva prezimovanja čebeljih matic v letu 2023 obsegajo vzpostavitev in vzdrževanje nizkovolumskih Kielerjevih plemenilnikov. Družine, vzpostavljene na eni nakladi, smo pregledali, odstranili

obstoječe matice in v vsako vstavili pravkar poležene deviške matice v transportnih matičnicah. V poskusu smo uporabili matice istega matičarja. Družine smo izdatno dokrmili s pogačami s cvetnim prahom in dodali po eno naklado, kjer je bilo to potrebno.



**Slika 5. . Priprava nizkovolumskih plemenilnikov za prezimljanje matic.**

Po nekaj dneh smo preverili sprejetost novih matic. Družine bomo redno preverjali in po potrebi oskrbovali. Plemenilnike z vsaj dvema nakladama in močno družino bomo v novembru bomo prestavili na zunanjo stran ob stavbo in jih dodatno zaščitili z izolativnimi materiali. Med prezimljanjem bomo izvajali monitoring temperature in vlage v plemenilnikih.

#### **2.6.2 Preverba kakovosti teh čebeljih matic**

V spomladanskih mesecih 2024 bomo uspešno prezimljene matice dodali v čebelje družine ter spremljali njihove gospodarske lastnosti. Na podlagi literature smo se odločili, da bomo pozornost namenili zlasti količini in kakovosti zalege ter jakosti čebeljih družin. Razvoj družin s testnimi maticami bomo primerjali z družinami, ki so bile prezimljene kot običajno.

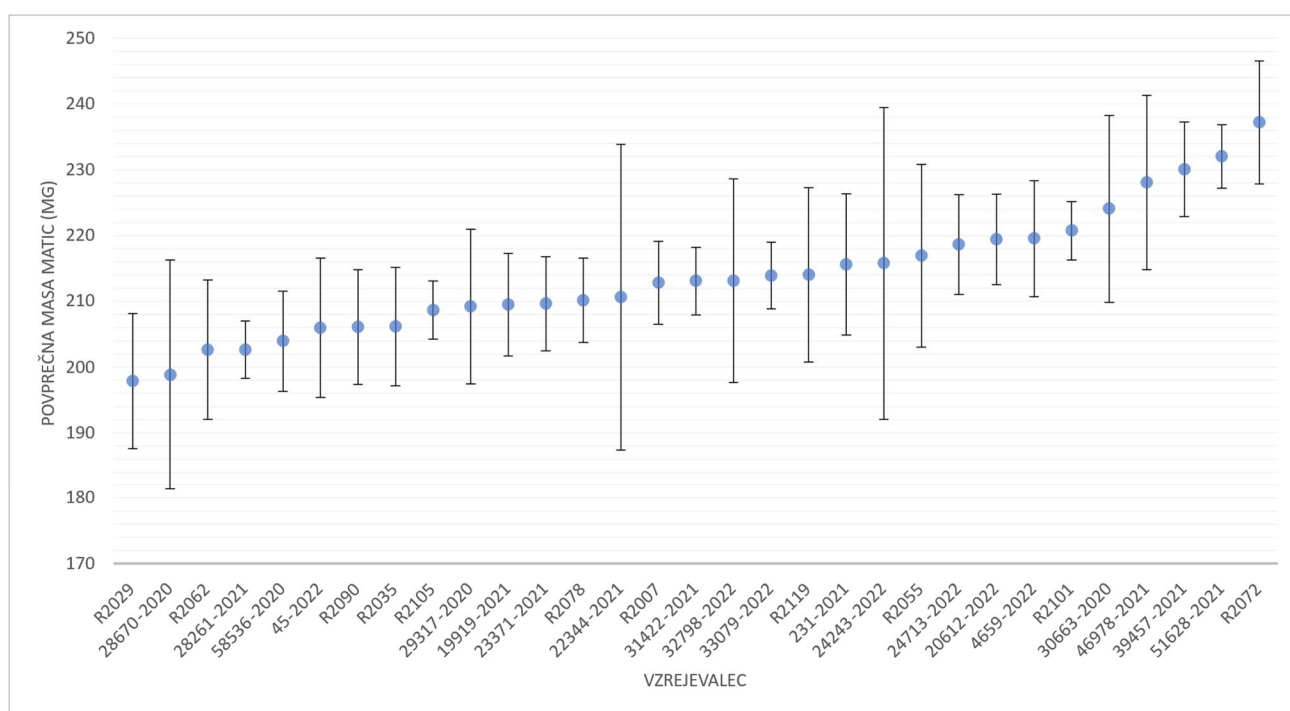
#### **2.6.3 Proučitev ekonomske zanimivosti prezimovanja čebeljih matic za vzrejevalce**

Opravili smo pregled načinov prezimovanja matic v različnih čebelarstvih. Nadalje smo pregledali ponudbo gospodarskih ter rodovniških matic ter prezimljenih gospodarskih matic na slovenskem in nekaterih tujih trgih. Cene smo primerjali s cenami prezimljenih čebeljih družin. V letu 2023 smo pregledali cene čebeljih matic, kot jih ponujajo različni vzrejevalci in preprodajalci. Cene, ki smo jih zbrali, so vezane na Evropsko tržišče.

### 3 REZULTATI

#### 3.1 SPREMLJANJE MORFOLOŠKIH IN FIZIOLOŠKIH PARAMETROV ČEBELJIH MATIC

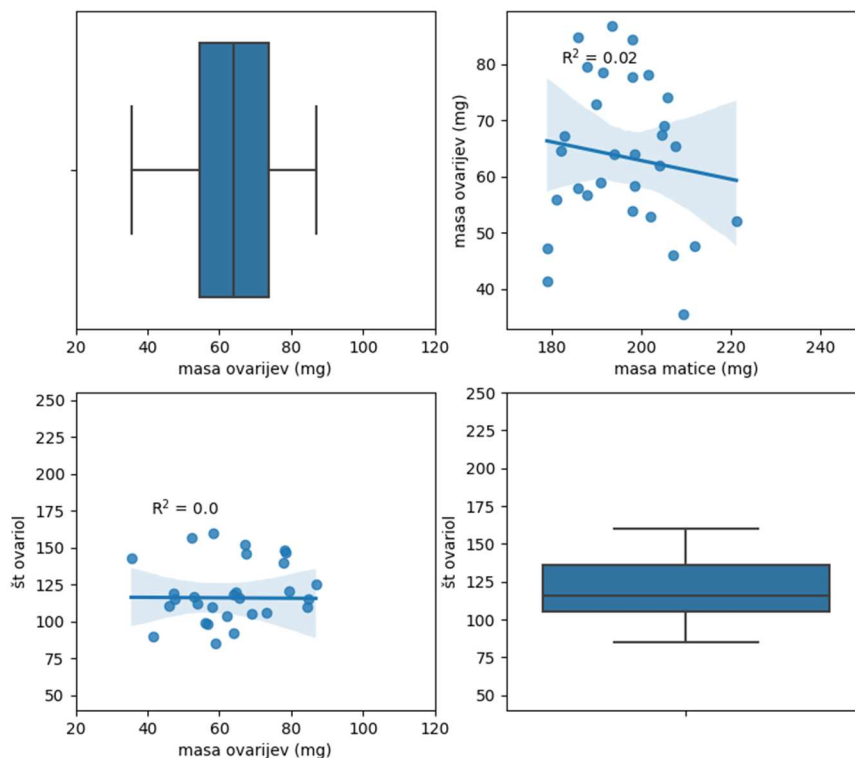
V letu 2023 je bilo vključenih v testiranje 155 matic. Po posameznem vzrejališču smo tehtali po pet matic in izračunali povprečne vrednosti mase matic po vzrejališču (Slika 6). Največja povprečna masa v letu 2023 je bila 249.2 mg, in najmanjša 174.3 mg; skupno povprečje je bilo pri **213.7 ± 13.7 mg**. 24 matic je imelo maso nižjo od 200 mg, na petnajstih vzrejališčih je imelo vseh pet merjenih matic maso, višjo od 200 mg.



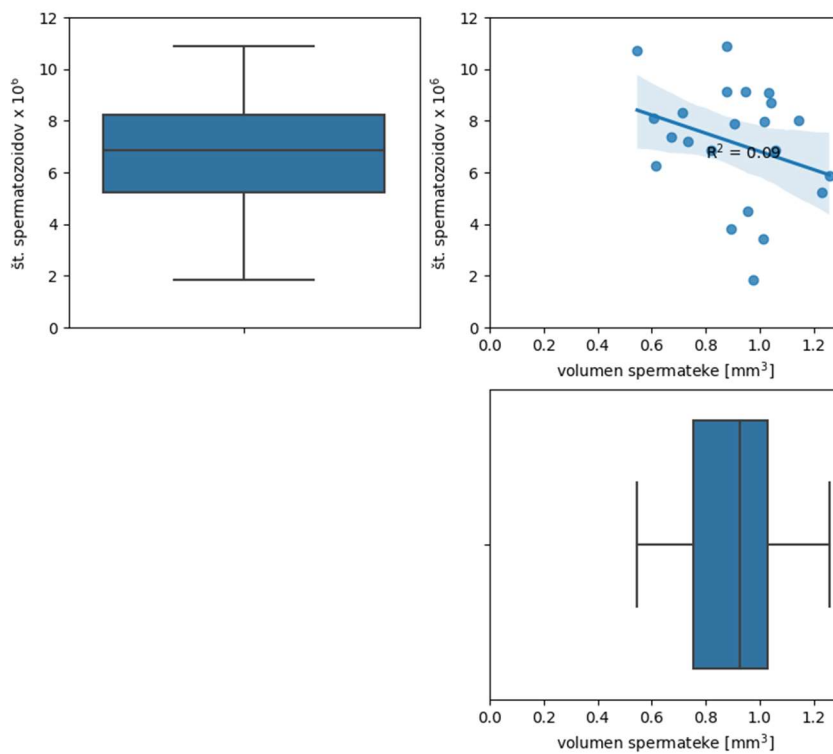
Slika 6. Povprečna masa posameznih linij matic iz vzrejališč. Zadnjih osem je v prvem kvartilu.

Na deležu vzorčne populacije (30 matic iz 5 vzrejališč) smo z disekcijo abdomna odstranili ovarije, jih stekali ter prešteli število ovariol. Povprečna masa ovarijev je **64 ± 13 mg**, povprečno število ovariol pa **116 ± 30**. Korelacija med eno in drugo spremenljivko je bila  $R^2 = 0.0$ , korelacija med maso matic in maso ovarijev pa  $R^2 = 0.02$  (Slika 7).

Vsaki matici smo odstranili spermateko, pod lupo odstranili trahealno ovojnico, štirikrat izmerili njen premer s programom ZenPro ter izračunali povprečni volumen: **0.91 ± 0.20 mm<sup>3</sup>**. Prešteli smo tudi spermatozoide v posamezni spermateki, povprečno število je **6.64 ± 2.31 x 10<sup>6</sup>**. Korelacija med eno in drugo količino je šibka -  $R^2 = 0.09$  (Slika 8). Pri sedmih maticah ni bilo mogoče oceniti velikosti spermateke, ker je ta med odstranjevanjem trahealne ovojnice počila. Število spermatozoidov smo kljub temu lahko določili pri vseh vzorcih v disekciji (30).



Slika 7. Masa ovarijev (zgoraj levo) in število ovariol (spodaj desno). Odnos med maso matice in maso ovarijev (desno zgoraj) ter med maso ovarijev in številom ovariol (spodaj levo).



Slika 8. Število spermatozoidov (zgoraj levo), volumen spermateke (spodaj desno) in odnos med volumenom spermateke ter številom spermatozoidov (zgoraj desno).

Ocenili smo delež živih spermatozoidov v vzorcih: v povprečju je bil delež živih spermatozoidov v vzorcu **0.86 ± 0.05**; minimalni delež je bil **0.76**, maksimalni delež živih spermatozoidov pa **0.97**.

### 3.2 DIAGNOSTIKA – PRISOTNOST SPOR *NOSEMA* SPP.

Rezultati pregleda iztrebkov na prisotnost spor *Nosema* spp. so predstavljeni v Preglednici 2, na podlagi katere je razvidna stopnja okuženosti čebeljih matic. Nosemo smo zaznali v iztrebkih devetih matic z 31 vzrejališč. V letu 2023 je bilo s sporami okuženih 4.5 % pregledanih matic. V primerjavi z leti od 2016 dalje je delež okuženih matic nižji, z izjemo deleža v letih 2018 in 2019.

**Preglednica 2. Število pregledanih matic in delež pozitivnih na prisotnost spor *Nosema* spp. v letu 2023 v primerjavi s prejšnjimi leti testiranja.**

Leto	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023
Št. pregledanih matic	n = 149	n = 140	n = 150	N = 160	N = 180	N=150	N=186	N=183
Št. vzrejališč	N = 30	N = 28	N = 28	N = 30	N = 30	N=30	N=32	N=31
Št. pozitivnih matic na spore <i>Nosema</i> spp.	23 (15,4 %)	9 (6,4 %)	1 (0,7 %)	0 (0 %)	9 (5 %)	31 (21 %)	17 (9,1 %)	9 (4,5 %)

V letu 2023 smo v vseh vzorcih spremljevalk matic, ki smo jih uporabili za disekcijo – z izjemo treh – zaznali prisotnost spor *Nosema* spp. (27/30). Pri pregledu preparatov iz črevesa pri 30 maticah v sekciji smo zaznali prisotnost spor *Nosema* spp. pri zgolj 1 matici (0.03 %).

### 3.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA

V letu 2023 smo za krioprezervacijo trotovskega semena izbrali matice z rodovniškimi številkami 59539-2021 in 60258-2021. Trote, potomce teh matic, so smo nabrali v kletke in njihovo seme zbrali v laboratoriju s pomočjo pipete za pipetiranje viskoznih tekočin. Zbrali smo približno dvakrat po 30 µL semena, ki smo ga shranili v zamrzovalni skrinji na – 80°C (Slika 9).



**Slika 9. Seme trotov po končanem zbiranju.**

### 3.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV

V letu 2023 je rezultate direktnega testiranja do 25.07.2023 oddalo 21 vzrejevalcev s 412 čebeljimi družinami (Preglednica 3).

**Preglednica 3. Seznam vzrejevalcev, ki so v letu 2023 opravljali direktni test in so oddali rezultate do 25.07.2023.**

Vzrejevalec	Čebeljak	Število testiranih družin	Vse ocene	Del ocen	Čistilna sposobnost
1	SI328698	20	20	-	da
2	SI101871	20	20	-	da
3	SI194204	20	20	-	da
4	SI119841	20	20	-	da
5	SI324751	20	20	-	da
6	SI159559	20		20	da
7	SI320784	20		20	da
8	SI266129	20	20	-	da
9	SI154730	20	-	20	da
10	SI206172	20	20	-	da
11	SI368640	22	22	-	da
12	SI114355	20	20	-	da
13	SI354361	20	20	-	da
14	SI314028	9	9	-	da
15	SI104201	20	19	1	da
16	SI351494	20	20	-	da
17	SI347084	20	20	-	da
18	SI338158	21	21	-	da
19	SI154075	20	20	-	da
20	SI291402	20	20	-	da
21	SI334080	20	20	-	da

Družine v testu so čebelarji ocenjevali trikrat: v maju, juniju in juliju, v obdobju najpogostejših paš in hitrega razvoja čebeljih družin. V tem obdobju so ocenili tudi naravni odpad varoj in opravili standardni pin test za določanje čistilne sposobnosti. Ob koncu pašne sezone so stehali ali ocenili pridelek medu. V prvi fazi analize smo izračunali povprečne vrednosti posameznih ocen in meritev, ki jih prikazujemo v preglednici 4.

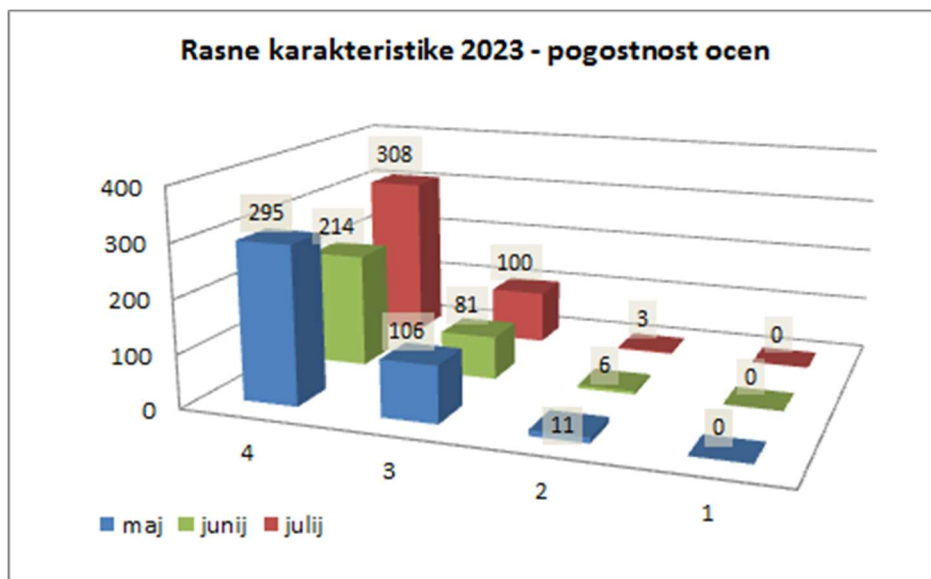
**Preglednica 4. Povprečne ocene posameznih ocen in meritev.**

Lastnost	maj	junij	julij	N meritev
Obarvanost	3,73	3,74	3,77	412
Mirnost	3,41	3,41	3,42	412
Rojivost	3,65	3,63		412
Živalnost	3,27	3,28	3,36	412
Odpad varoj			2,93	412
Pridelek medu			7,2	352
Čistilna sposobnost			71,6	412

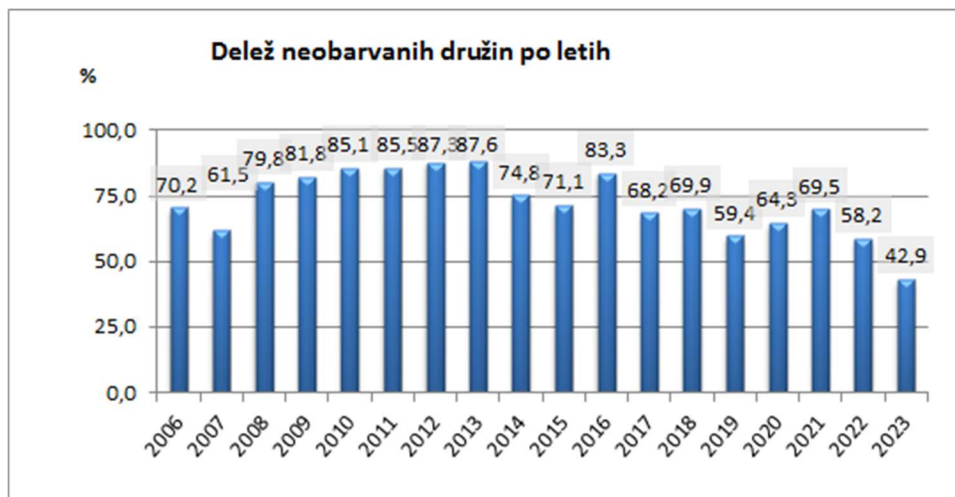


### 3.4.1 Rasne karakteristike – obarvanost obročkov zadka

Obarvanost zadkov, s katero poskušamo oceniti pasemsko čistost čebeljih družin je bila ocenjena v vseh treh ocenjevanjih, v maju, juniju in juliju. Povprečna obarvanost se je malenkost zvišala in je bila okoli 3,75. Delež obarvanih družin skozi sezono narašča (Slika 10). Delež neobarvanih družin v letu 2023 je bil le 42,9 % (Slika 11). 12 družin (2,9 %) je vsaj enkrat dobilo oceno 2, kar pomeni, da bi matice teh družin morali zamenjati z bolj ustreznimi. Obarvanosti 1 letos nismo zasledili.



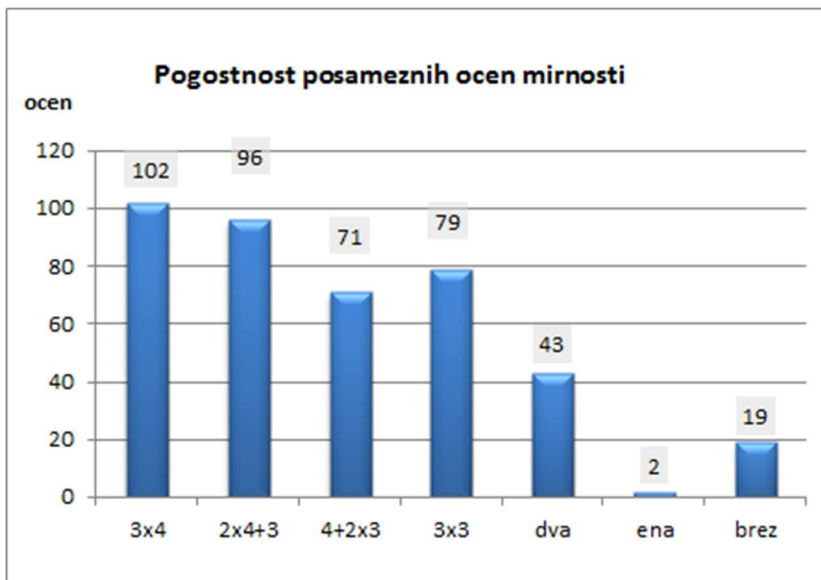
Slika 10. Pogostnost posameznih ocen obarvanosti v letu 2023.



Slika 11. Delež družin brez obarvanih čebel po letih direktnega testiranja.

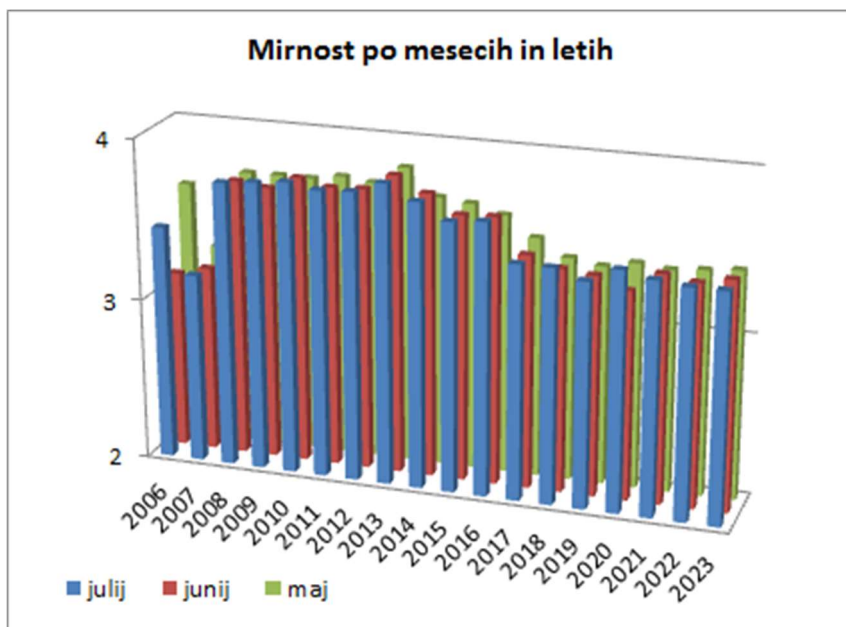
### 3.4.2 Mirnost ali obnašanje

Vsaka družina je bila trikrat ocenjena na mirnost: v maju 412, ter v juniju 393 in juliju 412 družin. Povprečna ocena mirnosti v posameznih mesecih je prikazana v Preglednica 4. Le okoli 24,6 % družin je vedno dobilo oceno 4. Oceno 2 ali manj je dobilo 45 družin ali 10,9 % (Slika 12).



Slika 12. Pogostost posameznih ocen mirnosti. Prvi trije stolpci prikazujejo, kolikokrat je bila ista družina ocenjena z najvišjo oceno 4.

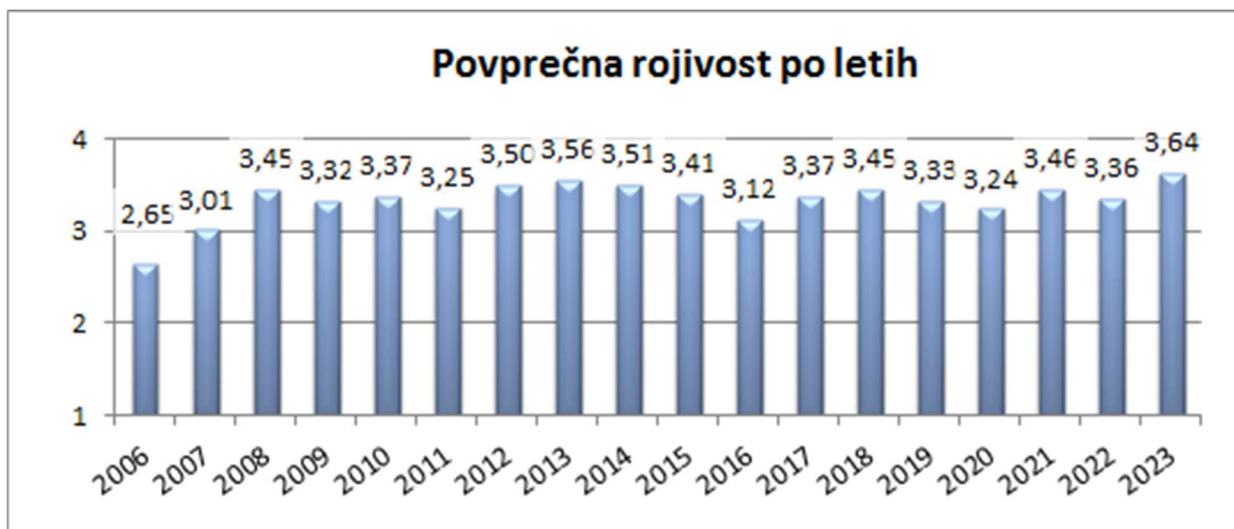
Testiranja zadnjih let prikazujejo trend zmanjševanja mirnosti in tudi obarvanosti čebeljih družin zaradi strožjega ocenjevanja. Strožje ocenjevanje poenostavi izbor najboljših družin. Na sliki so prikazane ocene mirnosti po preteklih letih (Slika 13).



Slika 13. Mirnost po letih in mesecih.

### 3.4.3 Rojivost

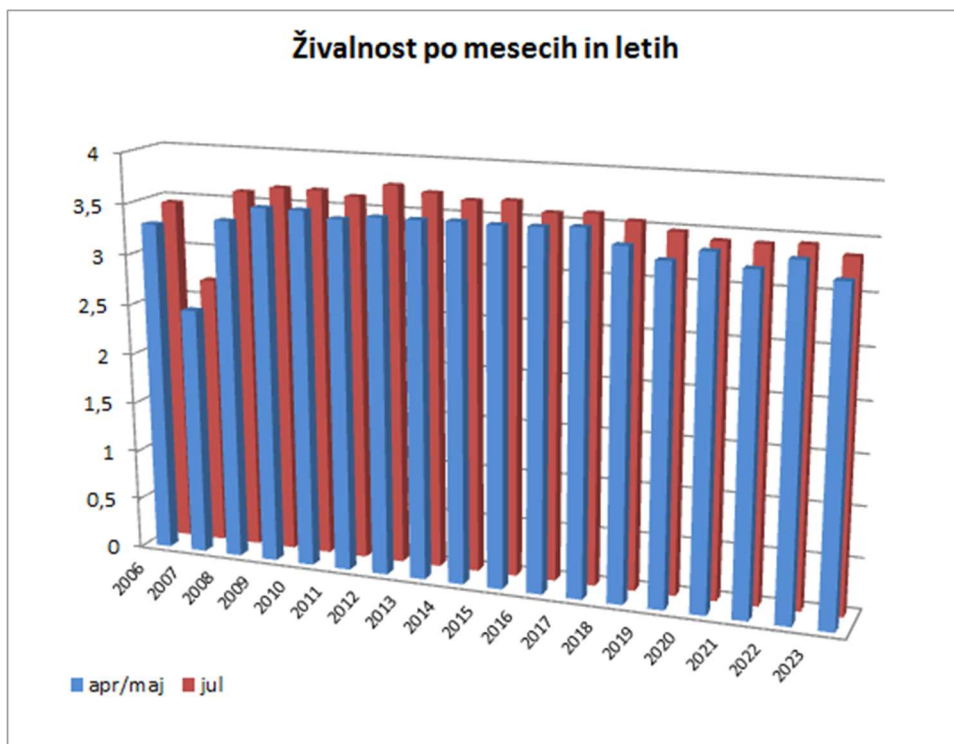
Ocenjevanje rojivosti se izvaja v maju in juniju, v času najintenzivnejšega razvoja čebeljih družin. Ocenjenih je bilo 412 družin. Kar 55,8 % družin ni poskusilo rojiti, pri 36,6 % so čebele same podrle matičnjake. V 4,3 % družin je čebelar s trudom preprečil rojenje in 3,1 % družin je izrojilo. Presenetljivo je leto 2023 eno najmanj rojivih let, čeprav je hladno vreme pozno v pomlad in pomanjkanje paše pogosto privedlo družine do stradeža (Slika 14).



Slika 14. Prikaz povprečne rojivosti po letih.

### 3.4.4 Živalnost

V letošnjem letu je prišlo do spremembe v izvajanju direktnega testiranja pri ocenjevanju živalnosti in sicer se le-ta od letos dalje ocenjuje trikrat na leto (prejšnja leta dvakrat – april in julij), v maju, juniju in juliju. V maju in v juliju je bilo ocenjenih 412 čebeljih družin, v juniju pa 392. Povprečna ocena v maju je bila 3,22 in v juniju 3,28 in v juliju 3,36 (Preglednica 4). Grafično smo zaradi lažje primerjave ocene glede na pretekla leta za leto 2023 prikazali zgolj majsko in julijsko povprečno oceno. Majska ocena je zaradi hladnega vremena pričakovano najnižja izmed vseh izmerjenih let (Slika 15).



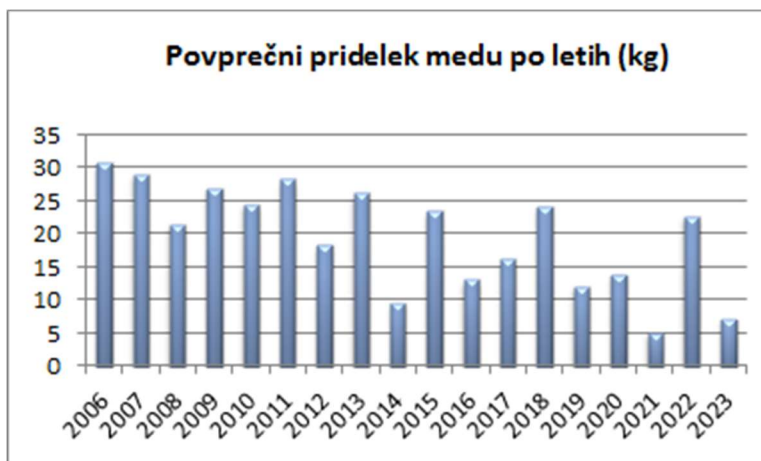
Slika 15. Živalnost po mesecih in letih.

### 3.4.5 Donos medu

Skupni donosi medu v letu 2023 so bili med 0 in 25 kilogrami na panj. Skupno je bil donos medu izmerjen pri 352 družinah (Slika 16). Povprečni pridelek medu v letu 2023 je 7,2 kg na panj. Zaradi izredno hladne pomladi in zmrzali je sezono rešila precej obilna poletna paša, seveda pa rekordnih donosov nismo zabeležili (Slika 17).



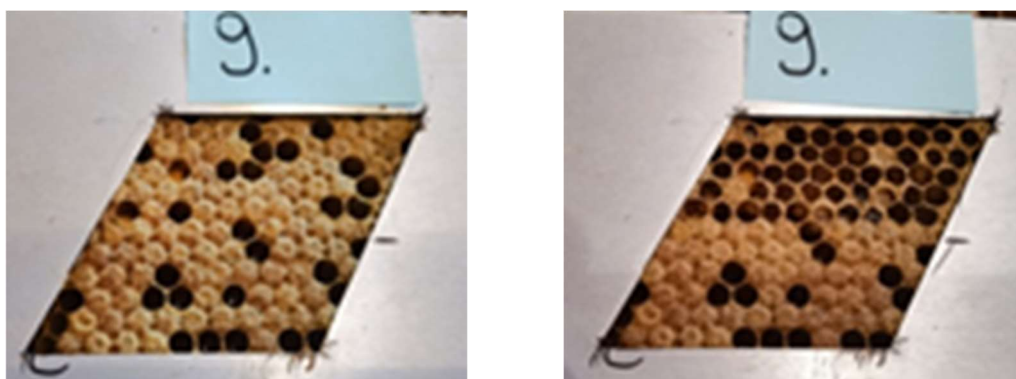
Slika 16. Delež posameznih kategorij pridelka medu v letu 2023.



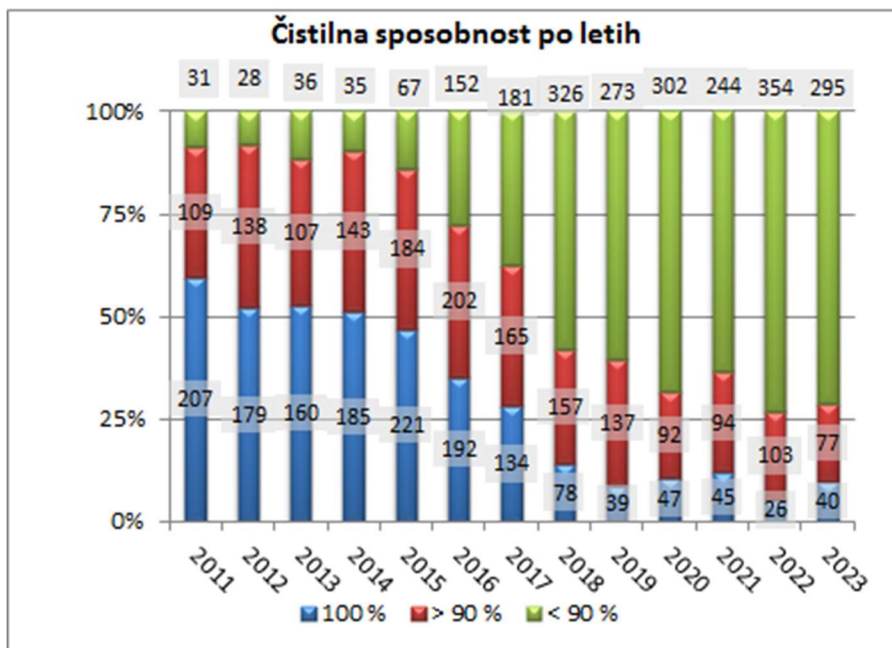
Slika 17. Povprečni pridelek medu po letih.

### 3.4.6 Odpad varoj in čistilna sposobnost

Naravni odpad varoj je bil izmerjen pri vseh 412 družinah in se je gibal med 0 in 29 varojami povprečno na dan, v povprečju pa 2,93 pršice na družino na dan. Vzrejevalci pri 7,7 % družin niso zabeležili naravnega odpada varoj. V letu 2023 je bila čistilna sposobnost izmerjena pri vseh 412 družinah. Vse družine so bile pred in po testu tudi fotografirane (Slika 18). Spremenjena navodila za testiranje so bistveno spremenila razporeditev ocen čistilne sposobnosti. Zaradi krajšega časa testiranja so razlike med družinami bistveno večje. Izmerjene vrednosti so bile med 2 in 100 % (10,7 % družin, Slika 19). Za vzrejo priporočamo družine, ki imajo čistilno sposobnost vsaj 90 % ali pa družine izmed najboljše tretjine v čebelnjaku.



Slika 18. Ocenjevanje čistilne sposobnosti. Levo sat s petdeset prebodenimi celicami in desno sat po 8 urah.



Slika 19. Razporeditev družin po oceni čistilne sposobnosti in po letih.

### 3.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE

Z molekularno metodo pomnoževanja specifičnih nukleotidnih zaporedij s polimerazo (PCR) smo uspešno pomnožili in prebrali nukleotidna zaporedja za 2 mitohondrijska odseka pri vzorcih delavk kandidatnih matičarjev. Od 100 izoliranih vzorcev smo nukleotidna zaporedja za mitohondrijski odsek tRNA-Leu uspešno prebrali pri 96 vzorcih, za mitohondrijski odsek COI pa pri 94 vzorcih.

Označevalec tRNA-Leu se uporablja za določanje mitohondrijske linije pri medonosni čebeli. Vsi analizirani vzorci **pripadajo mitohondrijski liniji C**, kar je v skladu s standardnimi metodami uvrstitve kranjske čebele ter ne odstopajo od te temeljne genetske značilnosti. Mitohondrijska genetska osnova kandidatnih matičarjev je ustrezna. Med vzorci smo določili devet različnih haplotipov za označevalec tRNA-Leu. Poravnava zaporedij tRNA-Leu vsebuje 11 variabilnih mest, na pozicijah 25, 49, 63, 91, 117, 187, 208, 253, 382, 388 in 493 (pozicije so oštevilčene od prvega nukleotida, ki ni del oligonukleotidnega začetnika dalje).

**Preglednica 5. Zastopanost haplotipov med analiziranimi vzorci.**

haplotip	število vzorcev
C2e	30
C1a	29
C2c	24
C2d	5
C2	3
nov	2
nov	1
C3a	1
nov	1

Označevalec COI se uporablja v sistematiki kot »barcode« za določanje vrst, pri medonosni čebeli pa manj pogosto uporabljen (Syromyatnikov in sod., 2018; Bubnič in sod., 2020). Raziskave so pokazale, da je ta odsek variabilen znotraj in med populacijami in tako primeren za monitoring variabilnosti na določenem geografskem območju. Za označevalec COI smo določili sedem haplotipov. Poravnava zaporedij COI vsebuje sedem variabilnih mest na pozicijah 100, 275, 318, 422, 449, 491, 572 (pozicije so oštevilčene od prvega nukleotida, ki ni del oligonukleotidnega začetnika dalje).

## 3.6 PROUČEVANJE MOŽNOSTI OHRANJANJA MATIC ČEZ ZIMO

### 3.6.1 Proučitev vpliva prezimovanja na čebelje matice

V letu 2023 priprave na proučitev vpliva prezimovanja čebeljih matic obsegajo vzpostavitev in vzdrževanje nizkovolumskih Kielerjevih plemenilnikov. Neoprašene, pravkar poležene, matice istega matičarja (sestre), smo vstavili v že formirane družine v nizkovolumskih plemenilnikih, iz katerih smo poprej odvzeli matice. Družine smo izdatno dokrmili s pogačami s cvetnim prahom in dodali po eno naklado, kjer je bilo to potrebno. Poizkus prezimljanja v nizkovolumskih plemenilnikih bomo izvedli na vsaj 10 družinah, ki jih bomo redno dohranjevali in vzpostavili na vsaj 3 nakladah.

### 3.6.2 Preverba kakovosti uspešno prezimljenih čebeljih matic

V sezoni 2023-2024 bomo matice prezimili na prostem v nizkovolumskih plemenilnikih.

V letu 2024 bomo spremljali kakovost teh prezimljenih matic preko klasičnih parametrov: sprejetost v družine, površina in tip zalege, mirnost ter donos. Pri deležu teh matic bomo opravili fiziološke ter morfološke meritve.

### 3.6.3 Ekonomska zanimivost prezimovanja čebeljih matic za vzrejevalce

Prve matice, vzrejene v tekočem letu, se na slovenskem tržišču pojavijo običajno v prvi polovici maja. Za zgodnejše povpraševanje je torej potrebno odvzeti matico gospodarski/rezervni družini, ki se jo potem razstavi in porabi za okrepitev drugih družin. Tak poseg je potrebno ekonomsko nadomestiti, cena gospodarske družine v letu 2023 pa lahko tudi presega 150 €; rezervne družine dosegajo cene med 8.5 € do 14 € na sat; v ceno izgube gospodarske družine pa je potrebno všteti tudi izgubo pridelka. Prezimljene matice v RS imajo cene med 40 in 90 €, v tujini pa cena presega 100 € (VB). Ti podatki kažejo, da je verjetno ekonomsko upravičeno odzemanje in zgodnje spomladanska prodaja matic iz manjših rezervnih družin (5 - 7 satov), vsekakor pa ni upravičljiva prodaja matic iz gospodarskih družin.

Druga opcija je prezimovanje v namenskih zimskih bankah. Rosseau in Giovenazzo (2021) poročata o uspešnem prezimljanju matic v namenski banki pri 16 °C z 72 % preživetjem in 88 % sprejetostjo le-teh, ter 68 % preživetjem preko sezone (niso bile preležene). Taka kalkulacija je ekonomsko ugodnejša in preferenčna v primerjavi s prvo opcijo, vendar ni vsakemu vzrejevalcu dostopna tehnologija v smislu klimatizirane in zračene komore.



## 4 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Matice so ključna komponenta čebelje družine; družine z maticami slabše kvalitete so šibkejše in zato (tudi) z ekonomskega stališča problematične. Značilnosti visoko kakovostne matice so: (1) visoka živa masa in masa ovarijev, (2) visoko število ovariol, (3) zadovoljivo visoko število spermatozoidov v spermateki, (4) zgođen začetek zaleganja, (5) visoko število poleženih jajčec na dan, (6) kvalitetna, nepresledkasta zalega, (7) odsotnost bolezni in škodljivcev (Hatjina in sod., 2014).

V letu 2023 je bila povprečna masa matic ( $213.7 \pm 13.7$  mg) primerljiva s prejšnjimi leti ( $210,1 \pm 15,0$  v letu 2020;  $212.8 \pm 9,3$  mg v letu 2021;  $211.8 \pm 17.3$  mg v letu 2022). V letu 2023 je imelo zgolj 24 matic od 155 maso nižjo od 200 mg, na petnajstih vzrejališčih je imelo vseh pet merjenih matic maso, višjo od 200 mg.

Na deležu matic, ki je bil podvržen disekciji, je bil odnos med št. ovariol in maso ovarijev ter med maso matic in maso ovarijev šibek. Povprečna masa ovarijev v letu 2023 je  $64 \pm 13$  mg, povprečno število ovariol pa  $116 \pm 30$ . Za primerjavo s prejšnjimi leti so bile te vrednosti: (1) leto 2020 - povprečna masa ovarijev  $59 \pm 15$  mg, povprečno število ovariol  $150.1 \pm 13.5$ , (2) leto 2021 - povprečna masa ovarijev  $78 \pm 23$  mg, povprečno število ovariol  $138 \pm 37$  in (3) leto 2022 - povprečno maso ovarijev  $54,8 \pm 9,1$  mg in povprečno število ovariol  $155,5 \pm 18,7$ .

Razlika glede na pretekla leta se kaže v vrednostih volumna spermateke ter predvsem ocenjenega števila spermatozoidov v spermateki. Obe povprečni vrednosti sta bili izjemno visoki. Povprečni volumen spermateke v letu 2023 je ocenjen na  $0.91 \pm 0.20$  mm<sup>3</sup>. Povprečno število spermatozoidov pa je bilo kar  $6.64 \pm 2.31 \times 10^6$ . Za primerjavo s prejšnjimi leti so bile te vrednosti: (1) leto 2020 - povprečni volumen spermateke:  $0.61 \pm 0.19$  mm<sup>3</sup>, povprečno število spermatozoidov  $5.23 \times 10^6 \pm 1.46 \times 10^6$ , (2) leto 2021 povprečni volumen spermateke:  $1.02 \pm 0.13$  mm<sup>3</sup>, povprečno število spermatozoidov  $2.98 \pm 1.85 \times 10^6$  in (3) leto 2022 - povprečni volumen spermatek  $0,97 \pm 0,17$  mm<sup>3</sup>, povprečni število spermatozoidov v spermateki pa je bilo  $3,76 \pm 1,2 \times 10^6$ . Znanstvene študije poročajo, da je večji volumen spermateke eden od znakov za višjo kakovost matice (Hatjina in sod., 2014). Pričakovano je tudi, da je v večji spermateki število spermatozoidov večje.

Nosema pri maticah (in spremljevalkah) je lahko naznanitelj dolgoročnih problemov. Okužene matice imajo slabši razvoj ovarijev, kar se odrazi kot slabljenje čebelje družine, saj okužene matice niso sposobne vzdrževati populacije odraslih delavk v družini, lahko pa pride tudi do neplodnosti matic (Fyg, 1964; Liu, 1992). Tako okužba matic kot tudi spremljevalk kažeta na težavo z nosemozo v plemenilčkih, saj se s sporami *Nosema Spp.* okužijo le odrasle čebele (White, 1919; Bailey, 1955). Tako je spremljanje prisotnosti spor mikrosporidija *Nosema spp.* pri maticah in v družinah pomembno. V letu 2023 je diagnostika pokazala prisotnost spor *Nosema Spp.* v iztrebkih devetih matic z 31 vzrejališč (4.5 % pregledanih matic). V primerjavi z leti od 2016 dalje je delež okuženih matic nižji, z izjemo deleža v letih 2018 in 2019. Upada nose mavosti žal ni zaznati pri čebelah delavkah spremljevalkah matic.

V letu 2023 so, tako kot prejšnja leta, vzrejevalci izvedli direktni test, v katerem so testirali kandidatne matičarje. Rezultati testiranja so orientacija za odbiro za leto 2024. Do datuma je v analizo oddalo rezultate 21 vzrejevalcev s 412 čebeljimi družinami. Vsako leto vzrejevalcem na podlagi prejetih ocen izdamo priporočilo za vzrejo za naslednjo plemenilno sezono. Odsvetujemo vse matice z obarvanimi družinami, nemirne matice ter matice z slabim čistilnim nagonom. Delež družin brez obarvanih čebel v letu 2023 je nižji kot pretekla leta. Povprečna ocena mirnosti se je v letošnjem letu nekoliko dvignila, značilen padec pa je imela okoli leta 2017, ko smo začeli s priporočili vzrejevalcem, da so pri svojem ocenjevanju strogi. Testiranja zadnjih let prikazujejo trend zmanjševanja mirnosti in tudi obarvanosti čebeljih družin zaradi strožjega ocenjevanja. Strožje ocenjevanje poenostavi izbor najboljših družin. Rojivost v letu je soodvisna od vremenskih razmer. Leto 2023 je eno najmanj rojivih let, čeprav je hladno vreme pozno v pomlad in pomanjkanje paše pogosto privedlo družine do stradeža. Majska povprečna ocena živalnosti je zaradi hladnega vremena pričakovano najnižja izmed vseh izmerjenih let. Upadanje donosa medu je v direktnem testiranju opazno od leta 2006 naprej, kar je zaskrbljujoče; interpretacija tega rezultata zahteva tudi preučitev drugih parametrov, kot so okolje, gostota čebeljih družin in morebitna sprememba obravnave družin v testiranem čebelnjaku. Povprečni pridelek medu v letu 2023 je 7,2 kg na panj. Zaradi izredno hladne pomladi in zmrzali je sezono rešila precej obilna poletna paša, seveda pa rekordnih donosov nismo zabeležili. Spremenjena navodila za testiranje so bistveno spremenila razporeditev ocen čistilne sposobnosti. Zaradi krajšega časa testiranja so razlike med družinami bistveno večje, poleg tega manj družin ocenjenih s 100% kaže, da več vzrejevalcev test izvaja pravilno. Izmerjene vrednosti so bile med 2 in 100 % (10,7 % družin). Za vzrejo priporočamo družine, ki imajo čistilno sposobnost vsaj 90 % ali pa družine izmed najboljše tretjine v čebelnjaku.

Spremljanje mitohondrijske linije je smiselno iz vidika ohranjanja čistosti kranjske čebele v Sloveniji kot tudi za spremljanje pestrosti znotraj genskega sklada. Vsi testirani vzorci pripadajo ustrezni mitohondrijski liniji – to je linija C. Vzorčenje vseh kandidatnih matičarjev je prikazalo 9 haplotipov mitohondrijskega fragmenta tRNA-Leu. Mitohondrijska DNA se deduje neposredno po materini liniji in zato ima zalega praviloma enako mitohondrijsko zaporedje kot matica.

Prezimovanje čebeljih matic je ekonomsko zanimivo predvsem v spomladanskem času, preden so na voljo prve v istem letu vzrejene matice. Prezimovanje matic v specializiranih bankah bi bila ustrezna rešitev v primeru, da uspešno prezimi velik delež matic v banki. Za to je potrebna serija poizkusov s prilagajanjem različnih parametrov in primerjanje uspeha med posameznimi pogoji. Uspešna prezimitev matic v banki je verjetno finančno nedosegljivo za povprečnega vzrejevalca zaradi potrebe po temni komori z uravnavanjem temperature in zračenjem. Kot bolj dostopno alternativo preizkušamo, kako se obnese prezimljanje matic v nizkovolumskih Kielerjevih plemenilnikih, a ker smo v tem letu šele vzpostavili družine in vanje dodali matice, da prezimijo, bodo prvi rezultati na voljo v pomladanskem času prihodnjega leta (2024).

## 5 SPLOŠNE UGOTOVITVE

Vsakoletno spremljanje populacije čebeljih družin, katerih matice so kandidati za nadaljnjo odbiro, je izrednega pomena.

S spremljanjem lastnosti kandidatnih matičarjev in zbiranjem podatkov o kakovosti matic, ki jih vzrejevalci postavijo na tržišče, neposredno spremljamo lastnosti v populaciji kranjske sivke v Sloveniji.

V letu 2023 je opaziti izrazit padec v prisotnosti spor *Nosema* Spp. v vzorcih iztrebkov matic, ne pa tudi pri čebelah delavkah. Ta informacija je pomembna z vidika spremljanja zdravstvenega stanja družin.

Pri deležu matic, pri katerih smo naredili disekcijo, je v letošnjem letu ocenjena visoka povprečna koncentracija spermatozoidov v spermateki ter visok odstotek živih spermatozoidov v spermateki, kar je pomembno za nadaljnji razvoj družine in za njeno uspešnost. Bolj kakovostne matice imajo tudi višjo telesno maso, večjo maso ovarijev in večje število ovariol, večji volumen spermateke in več živih spermatozoidov v spermateki. Prav tako v vzorcih iztrebkov in črevesa teh matic ni prisotnih spor *Noseme* Spp.

Zbrani in obdelani podatki ter ugotovitve so lahko v pomoč vzrejevalcem čebeljih matic pri odločitvah glede nadaljnje vzreje.

## 6 VIRI

**Bailey L. 1955.** The infection of the ventriculus of the adult honey-bee by *Nosema apis* Zander, *Parasitology* 45, 86–94.

**Büchler R, Andonov S, Bienefeld K, Costa C, Hatjina F, Kezić N, Kryger P, Spivak M, Uzunov A, Wilde J. 2013.** Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. V: Dietemann V, Ellis JD, Neumann P. (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. *J Apic Res* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.07>

**Bubnič, J.; Mole, K.; Prešern, J.; Moškrič, A.** Non-Destructive Genotyping of Honeybee Queens to Support Selection and Breeding. *Insects* 2020, 11, 896. <https://doi.org/10.3390/insects11120896>

**Susan W Cobey**, David R Tarpy & Jerzy Woyke (2013) Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens, *Journal of Apicultural Research*, 52:4, 1-18, DOI: 10.3896/IBRA.1.52.4.09 Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1994**, 3, 294–299.

**Fyg W. 1964.** Anomalies and diseases of the queen honey bee. *Ann. Rev. Entomol.* 9, 207–224.

**Fuse H, S. Ohta, M. Sakamoto, T. Kazama & T. Katayama (1993)** Hypoosmotic Swelling Test with a Medium of Distilled Water, *Archives of Andrology*, 30:2, 111-116, DOI: 10.3109/01485019308987743

Garnery, L.; Franck, P.; Baudry, E.; Vautrin, D.; Cornuet, J.-M.; Solignac, M. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA. *Genet. Sel. Evol.* **1998**, 30

**Hatjina, F., Bieńkowska, M., Charistos, L., Chlebo, R., Costa, C., Dražić, M. M., ... Wilde, J. (2014).** A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *Journal of Apicultural Research*, 53(3), 337–363. doi:10.3896/ibra.1.53.3.02

**Harizanis P.C.** 1983. Biology and activity of honey bee sperm: migration, concentration and ATP analysis: A hemacytometer method for counting honey bee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa. University of California, Davis.

Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, 30, 772–780

**Liu, T.P.** 1992. Oocytes degeneration in the queen honey bee after infection by *Nosema apis*. *Tissue Cell* 24: 131-136.

Meixner, M.D.; Pinto, M.A.; Bouga, M.; Kryger, P.; Ivanova, E.; Fuchs, S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* **2013**, 52, 1–28.

**Nur Z, Seven-Cakmak S, Ustuner B, Cakmak I, Erturk M. 2011.** The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. *Apidologie*, 43 (1), pp.31-38. [ff10.1007/s13592-011-0073-1ff](https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1ff).

**Rousseau A, Giovenazzo P.** 2021. Successful Indoor Mass Storage of Honeybee Queens (*Apis mellifera*) during Winter. *Agriculture*. 11(5):402. <https://doi.org/10.3390/agriculture11050402>

**Syromyatnikov, Mikhail Y., Anatoly V. Borodachev, Anastasia V. Kokina, and Vasily N. Popov** 2018. "A Molecular Method for the Identification of Honey Bee Subspecies Used by Beekeepers in Russia" *Insects* 9, no. 1: 10. <https://doi.org/10.3390/insects9010010>

**Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673–4680.

**White GF. 1919.** Nosema-disease, USDA Bull. 780.

## Priloga 1: DIREKTNO TESTIRANJE ČEBELJIH DRUŽIN

### Navodila za ocenjevanje testnih družin

V testiranje je vključenih vsaj **20** (v vzrejališču rodovniških matic **40**) izenačenih družin iz istega selekcijskega čebelnjaka.

Matice v testiranju **so kandidatke za matičarje v letu 2021. Idealno, naj imajo že znano poreklo** ter dodeljeno **rodovniško številko**. Delavke teh matic pošljete v zimskem obdobju na Kmetijski inštitut Slovenije na **meritev kubitalnega indeksa in določanje števila spor noseme**.

S takim postopkom omogočamo ustvarjanje linij in sledenje prejšnjim generacijam.

### Kriteriji ocenjevanja testnih družin

Lastnosti kot so mirnost (neagresivnost) čebelje družine, sedenje na satju ter rojenje se ocenjuje z ocenami 1 (najslabša) do 4 (najboljša), na pol točke natančno. To možnost smo uvedli, ker je cilj ocenjevanja, da družine **razvrstite od najslabše do najboljše** pri določeni lastnosti.

**PRIDELEK MEDU:** Ocenjevanje iztočene količine medu je mogoče na dva načina:

medeno satje, izločeno iz družine, označimo in stehtamo. Po končanem točenju prazno satje ponovno stehtamo in neto količino medu zabeležimo na evidenčni list.

Sprejemljiva je tudi druga metoda, pri kateri izločeno medeno satje iz družine preštejemo in stehtamo. Po končanem točenju stehtamo 50 do 100 iztočenih satov in povprečno težo sata upoštevamo pri izračunu neto količine iztočenega medu iz posamezne testne družine.

**MIRNOST ALI OBNAŠANJE:** Po mednarodno sprejetih kriterijih se lastnost ocenjuje v stopnjah od 1 do 4, pri čemer je zaželeno uporabljati tudi vmesne številke :

- 4 – Za delo z družino nista potrebna niti dim niti zaščitna oblačila.
- 3 – Za delo z družino niso potrebna zaščitna oblačila, če se uporablja dim,
- 2 – Posamezne čebele napadejo in pičijo, kljub uporabi dima
- 1 – Čebele napadajo kljub uporabi dima.

**ROJENJE** testnih družin se prav tako ocenjuje v štirih stopnjah, dovoljene pa so vmesne ocene. V evidenčni list vnesemo izračunano povprečno vrednost:

4 – V družini ni opaziti rojilne aktivnosti, matični nastavki niso zaleženi, niti ni opaznih matičnikov.

3 – Občasno se v družini opazi zaležen matičnik oz. matični nastavek, vendar ni opaznih drugih znakov rojenja. Rojenje se z lahkoto prepreči z dodajanjem praznih satov v panj.

2 – Družina aktivno gradi matičnike, opazno je zmanjšanje obsega nepokrite zalege, gradnje satja in zadka matice.

1– Družina je rojila, oz. je bilo rojenje preprečeno z največjim naporom

**RASNE KARAKTERISTIKE:** Obarvanost obročkov zadka. Ocenjuje se obarvanost prvega in drugega obročka na zadku ter število posameznih čebel z obarvanimi obročki (zapisuje se zastopanost obarvanih čebel v odstotkih). Obseg obarvanosti se oceni z ocenami od 1 do 4, pri čemer ocene pomenijo:

4 - vsi obročki so temni ali so prisotne usnjeno rjave pege

3 - pri večini obarvanih čebel je prvi obroček delno obarvan

2 - pri večini obarvanih čebel je prvi obroček obarvan oranžno (prvi obroček je povsem obarvan)

1 - pri večini obarvanih čebel (do 2% čebel) sta dva obročka na zadku obarvana rumeno (rumen, usnjeno rjavi, oranžni)

Dovoljene so vmesne ocene.

**ŽIVALNOST ČEBELJE DRUŽINE:** Ocenjuje se trikrat na leto, v maju, juniju in juliju. Vpisuje se **odstopanje od povprečnega** števila zasedenih ulic v čebeljih družinah na stojšču. Ocenjuje se z ocenami od 1 do 4 (ocene 1, 1.5, 2 in 2.5 pod povprečjem, ocene 3, 3.5 in 4 nad povprečjem).

**ODPORNOST NA VAROJE:** Spremljanje napadenosti testnih družin z varojami je zelo pomemben kriterij pri odbiri matičarjev in tudi splošno v čebelarstvu. V poznem spomladanskem obdobju je potrebno spremljati naravni odpad varoj v vseh testiranih družinah v obdobju 30 dni.

**ČISTILNA SPOSOBNOST (ČISTILNI NAGON)** je dedna lastnost, ki jo je mogoče izboljšati s selekcijo. Ta lastnost pa je recesivna, zato mora biti selekcija na to lastnost stalno, rutinsko opravilo v vzrejališču. Je del t. i. socialne imunosti čebeljih družin.

Pri testiranju čistilnega nagona z entomološko iglo prebodete (skozi sredino poklopca do dna celice) določeno število celic pokrite zalege. Zaradi lažjega preračuna prebodite 50 ali 100 celic. Pomagajte si z romboidno šablono, v kateri si označite robove testne površine in fotografirajte stanje (glej slike na str. 4). V kolikor šablone nimate, nas kontaktirajte.

Zalega na testni površini mora biti ravno prav stara, idealne so bube z rdečimi očmi. **Primerno starost bub** določimo na dva načina:

- 1) 8 dni pred načrtovanim testiranjem označite nepokrito zalego z debelimi ličinkami ali
- 2) neposredno pred testom odkrijte posamezno pokrito celico in najde primerno starost bube.

Entomološko iglo se dezinficira z vžigalnikom in počaka nekaj trenutkov, da se igla ohladi. Celice se prebada od leve proti desni.

Znotraj površine šablone prebodete 50 ali 100 celic, sat fotografirate in ga vrnete nazaj v panj. S pisalom označite 51. oz. 101. celico. Pri prebadanju preskočite in preštejte tudi celice, ki niso zaležene oz. so v postpoku čiščenja, da ne bo zmede pri končnem štetju (**PCO**).

Pri odčitavanju rezultatov je pomembno, da med družinami opazimo razlike v čistilni sposobnosti. Za metodo 50tih ali 100tih celic se odločite glede na to, koliko časa imate med prvim in drugim pregledom. Pri 50 prebodenih celicah opravimo »štihprobo« po 6-8 urah in če ne opazimo bistvenega napredka, ponovno preverimo čez dve uri. Pri 100 prebodenih celicah panje prvič pregledamo po približno 12 urah.

Rezultate odčitavamo po istem vrstnem redu kot smo prebadali. Pri odčitavanju ponovno poslikajte označeno površino (najpreprosteje je, da ponovno namestite šablono na isto mesto). Sliki, nastali pred in po testu, primerjajte in preštejte celice, pri katerih so čebele začele delo. Čistilna sposobnost je razmerje med številom načetimi celic in skupnim številom prebodenih celic, pretvorjeno v odstotke.

<p><u>Izračun ČS za 50 celic:</u></p> $\text{ČS} = ((\text{NC} - \text{PCO}) / 50) * 100 \%$ <p>ČS = čistilna sposobnost (%)</p> <p>NC = število načetih celic pri pregledu</p> <p>PCO = število praznih celic pred prebadanjem</p>	<p><u>Izračun ČS za 100 celic:</u></p> $\text{ČS} = ((\text{NC} - \text{PCO}) / 100) * 100 \%$ <p>ČS = čistilna sposobnost (%)</p> <p>NC = število načetih celic pri pregledu</p> <p>PCO = število praznih celic pred prebadanjem</p>
---	---



**Zakaj 100% očiščenost ni zelen rezultat?** Pri vsakem ocenjevanju družin v čebelnjaku čebelar družine primerja med seboj. Družine, ki so vse dosegle enak rezultat, ne moremo razdeliti na boljše in slabše. Zato moramo napredek družine spremljati in rezultat odčitati, še preden družine očistijo vse celice. Statistično ima ta test največjo moč, če so družine v čebelnjaku v povprečju načele polovico prebodenih celic.

Pin-test je priporočljivo izvajati od junija do septembra dvakrat, saj na koncu lahko izračunamo povprečno vrednost čistilne sposobnosti. Poskus se opravi v dneh, ko je donos nektarja manjši, ker v takih razmerah družine kažejo slabši čistilni nagon in se na ta način izognemo vplivu okolja na izraženo **Bubnič** t te lastnosti.

Vir: **Büchler in sod. (2013)**. Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens, Journal of Apicultural Research, 52(1).

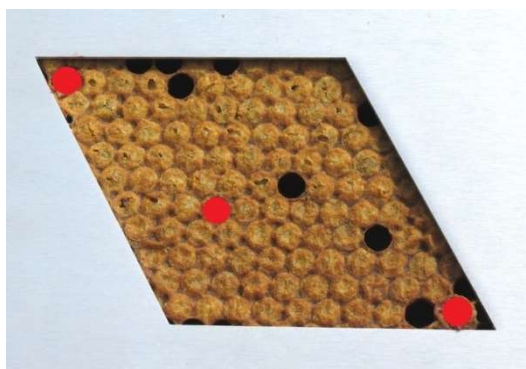
**V evidenčni list se vpiše rezultate vsaj enega opravljenega PIN-testa in datum izvedbe testa. Priložiti je potrebno označene fotografije s šablono pred in po prebadanju. Pripisite podatek, po koliko urah ste opravili drugi pregled.**



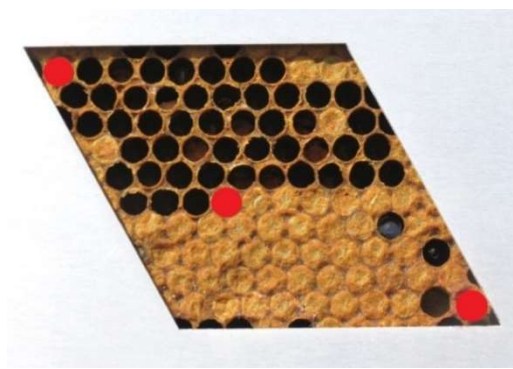
**Slika 1.** Primerna starost zalege je okrog 17 dni, to je stadij bube z rožnatimi do rdečimi očmi.



**Slika 2.** Prikaz prebadanja 50 celic s pomočjo šablone



**Slika 3.** Označevanje 50 celic znotraj šablone.



**Slika 4.** Očiščene in neočiščene celice zalege z oznakami.

**PRILOGA: DIREKTNO TESTIRANJE ČEBELJIH DRUŽIN ZA LETO 2023**

Vzrejališče (čebelar): .....

Stojišče: .....

Registrska oznaka čebelnjaka: .....

Št. panja	Št. matice	Rod. št. matice					~ 15. junij				~ 10. julij				Odpad varoj Datum: _____	Med (kg)	ČS (%) Datum: _____
			O	M	R	Ž	O	M	R	Ž	O	M	Ž				

O – obarvanost obročkov zadka, M – mirnost, R – rojivost, Ž – živalnost, ČS – čistilna sposobnost