

Oddelek za živinorejo

Čebelarstvo

Hacquetova ulica 17

SI-1001 Ljubljana

Slovenija

T: 01 280 51 74

F: 01 280 52 55

PROJEKтна NALOGA št. 430-87/2023
KAKOVOST MATIC ZA OBDOBJE 2023 – 2025
Poročilo o izvedenih nalogah v letu 2024

Vodja naloge:
dr. Ajda Moškrič

Poročilo pripravili:
dr. Ajda Moškrič
doc. dr. Janez Prešern
Katarina Mole
Peter Podgoršek



31. julij 2024

Poročilo je v skladu z Uredbo o izvajanju intervencij v sektorju čebelarskih 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.

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

POVZETEK	1
1 UVOD.....	2
2 METODE DELA	3
2.1 SPREMLJANJE ČEBELJIH MATIC S FIZIOLOŠKIMI IN MORFOLOŠKIMI MERITVAMI.....	3
2.1.1 Tehtanje ovarijev in štetje ovariol.....	4
2.1.2 Merjenje premera spermateke in računanje volumna.....	4
2.1.3 Štetje spermatozoidov v spermateki čebelje matice z uporabo hemocitometra	5
2.2 DIAGNOSTIKA - PRISOTNOST SPOR <i>NOSEMA</i> SPP.....	5
2.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA.....	5
2.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV	6
2.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE.....	6
2.6 PROUČEVANJE MOŽNOSTI OHRANJANJA MATIC ČEZ ZIMO	8
2.6.1 Proučitev vpliva prezimovanja na čebelje matice.....	8
2.6.2 Preverba kakovosti prezimljenih čebeljih matic.....	8
2.6.3 Proučitev ekonomske zanimivosti prezimovanja čebeljih matic za vzrejevalce.....	9
3 REZULTATI	10
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 Rasne karakteristike – obarvanost obročkov zadka.....	14
3.4.2 Mirnost ali obnašanje.....	15
3.4.3 Rojivost.....	16
3.4.4 Živalnost čebelje družine.....	17
3.4.5 Donos medu.....	17
3.4.6 Odpad varoj.....	18
3.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE.....	19
3.6 PROUČEVANJE MOŽNOSTI OHRANJANJA MATIC ČEZ ZIMO	20
3.6.1 Proučitev vpliva prezimovanja na čebelje matice.....	20
3.6.2 Preverba kakovosti uspešno prezimljenih čebeljih matic.....	20
3.6.3 Ekonomska zanimivost prezimovanja čebeljih matic za vzrejevalce.....	21
4 INTERPRETACIJA REZULTATOV	22
5 SPLOŠNE UGOTOVITVE.....	24
6 VIRI.....	25

PRILOGA 1: DIREKTNO TESTIRANJE ČEBELJIH DRUŽIN	1
---	----------

POVZETEK

V raziskavi smo v obdobju od 1. 8. 2023 do 31. 7. 2024 spremljali kakovost vzreje matic kranjske čebele v Sloveniji. Spremljali smo matice, ki izhajajo iz selekcioniranih matičarjev. Skupno smo vzorčili in analizirali 201 matico iz 34 vzrejališč. Izvedli smo morfološko analizo, pregledali iztrebke matic na prisotnost spor *Nosema* spp., pri deležu vzorčene populacije (31 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 tudi 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. 2024. Direktno testiranje čebeljih matic na vzrejališčih čebeljih matic je namenjeno zbiranju podatkov za kasnejšo kakovostno odbiro čebeljih družin za potencialne matičarje. Test opravljajo vzrejevalci sami na 20 družinah v svojih selekcijskih čebelnjakih. Vzrejevalci rodovniških matic test opravijo na 40 družinah. Rezultati testiranja predlagajo matičarje za vzrejo gospodarskih matic oz. matičarjev in trotarjev za vzrejo rodovniških matic na odobrenih vzrejališčih. Vzrejevalci v okviru testa zbirajo podatke o donosu medu, mirnosti, živalnosti rojivosti in o odpadu varoje.

V okviru proučevanja možnosti ohranjanja matic čez zimo smo ovrednotili kakovost matic, ki so uspešno prezimile zimo 2023 – 2024 v Kielerjevih plemenilnikih, tako da smo matice vstavili v družine, ocenili jakost sprejetih družin, določili maso teh matic, pregledali iztrebke na prisotnost spor *Nosema* spp., z disekcijo določili maso ovarijev, število ovariol, izmerili premer in izračunali povprečen volumen spermateke ter določili število spermatozoidov v spermateki. Pri pregledovanju spermatozoidov pod mikroskopom smo ovrednotili tudi delež živih spermatozoidov.

Pripravili smo družine, v katerih bodo prezimljale matice, za poskus prezimljanja pozimi 2024 v 20 plemenilnikih Lyson, ki so večja alternativa Kielerjevim plemenilniki, z možnostjo omejitve prostora v notranjosti naklade. Opravili smo pregled aktualnega tržišča v letu 2024, 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 čistega genetskega sklada 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.

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; Levesque et al., 2022). Tak način prezimovanja bi lahko bil 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 in omejitvami, zaradi česar vsaj zaenkrat prezimljanje matic v t.i. banki matic ni bilo uspešno. Zato smo v naši raziskavi preizkusili uspešnost prezimljanja matic v nizkovolumskih plemenilnikih, v katerih matice posamezno prezimijo v manjši družini. V letih 2023 in 2024 preizkusili prezimljanje v Kielerjevih plemenilnikih, v letu 2025 (zima, ki prihaja), pa bomo preučili način prezimljanja matic v nizkovolumskih plemenilnikih znamke Lyson, in ovrednotili uspešnost.

2 METODE DELA

2.1 SPREMLJANJE ČEBELJIH MATIC S FIZIOLOŠKIMI IN MORFOLOŠKIMI MERITVAMI

V letu 2024 smo pregledali 201 matico iz 34 odobrenih vzrejališč gospodarskih matic. Matice so izvirale iz vzrejališč iz 11 od 12 statističnih regij v Sloveniji. 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 (CO₂) skupaj s spremljevalkami; vsako matico smo stehali z analitsko tehtnico (XS105, Mettler Toledo) (Slika 1). Po tehtanju smo matico preložili v sterilno plastično petrijevko (Slika 2) 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. Uspavanje matic pred tehtanjem z ogljikovim dioksidom.



Slika 2. Matica po tehtanju v petrijevki.

Dodatno smo na vzorcu enaintridesetih matic iz petih vzrejališč opravili še disekcijo. Matice smo pred sekcijo najprej uspavali s CO₂, jih stehali ter vzorčili iztrebek kot opisano zgoraj. Nato smo jih ponovno uspavali s CO₂ in izvedli sekcijo. Odstranili in stehali smo ovarije ter prešteli število ovariol v enem od ovarijev. Izrezali smo spermateko, odstranili ovoj iz trahej ter izvedli po 4 meritve premera vsake spermateke. Med postopkom smo uporabljali stereo mikroskop (SteREO Discovery.V12, Zeiss). 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 preparat črevesa vsake od matic v disekciji. Preostanek matice smo shranili za ekstrakcijo DNA in določanje mitohondrijske linije z molekulsko metodo PCR.

2.1.1 Tehtanje ovarijev in štetje ovariol

Oba odstranjena ovarija smo skupaj stehali z analitsko tehtnico (XS105, 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 (Slika 3).



Slika 3: Ovarij pod lupo, pred pričetkom štetja ovariol.

2.1.2 Merjenje premera spermateke in računanje volumna

Pod svetlobnim mikroskopom smo pri vsaki spermateki najprej s pomočjo pincete odstranili ovoj iz trahej. Nato smo spermateko slikali in izmerili po 4 premere (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 prenesli v epico in jo s pinceto odprli v 50 µL fiziološke raztopine. Po 5 minutni inkubaciji, ko so se semenčice enakomerno razporedile v raztopini, smo dodali 950 µL destilirane vode. Žive semenčice se v destilirani vodi 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 NaHCO₃, 2 ml formaldehida, destilirana voda do 200 ml). Do štetja spermatozoidov smo fiksirane vzorce shranili na 4 °C. Vzorec smo pred nanosom na hemocitometer Bürker 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 kvadratih na mreži hemocitometra pri 400 x povečavi. Da bi ocenili delež živih spermatozoidov, smo naknadno pri vsakem vzorcu pregledali 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.

2.2 DIAGNOSTIKA - PRISOTNOST SPOR NOSEMA SPP.

Število spor *Nosema* spp. smo določali z mikroskopskim pregledom vzorcev iztrebkov matic. Za prisotnost spor *Nosema* spp. smo pregledali skupno 199 vzorcev iztrebkov (168 vzorcev živih matic, 31 matic v sekciji). Pri maticah, ki smo jih uporabili v disekciji, smo na prisotnost spor pregledali poleg vzorcev iztrebkov tudi 31 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 5 poljih (oz. 80 kvadratih) hemocitometra.

2.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENKEGA 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., 2013). Seme smo shranili na –80 °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 2024 opravljali vzrejevalci čebeljih matic v svojih selekcijskih čebelnjakih. Vsako vzrejališče gospodarskih matic testira dvajset družin iz svojega selekcijskega čebelnjaka. Vzrejališča rodovniških matic pa testirajo po štirideset družin. Vzrejevalci so v testu ocenili rasne karakteristike (obarvanost obročkov zadka), rojivost, živalnost, donos in mirnost ter test napadenosti družin z varojami. V letu 2024 je do 25. julija direktni test izvedlo 26 vzrejevalcev, ki so skupno testirali 529 družin ali povprečno 20,3 testirane družine na vzrejevalca. Temu primerno smo prilagodili navodila za izvajanje direktnega testiranja ter vpisni list. Navodila so v prilogi 1 tega dokumenta.

Rezultate, ki so jih poslali posamezni vzrejevalci, smo analizirali in pripravili priporočila za odbiro. 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_{Leu} – Cox2** (v nadaljevanju tRNA-Leu) je 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 jeseni 2023 vzorčili in analizirali 262 vzorcev kandidatnih matičarjev. Celokupno DNA smo ekstrahirali iz nog bub ali delov ličink čebel delavk. 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 H₂O (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	GGCAGAATAAGTGCATTG	Gernerey in sod., 1993
	COI_3934R	CAATATCATTGATGACC	
COI	LCO 1490	GGTCAACAATCATAAAGATATTG	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 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 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. Določili smo ustreznost mitohondrijske linije za vsak kandidatni matičar, število mitotipov v analiziranih vzorcih ter število variabilnih mest v zaporedjih za posamezni označevalec.

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 2024 obsegajo vzpostavitev in vzdrževanje nizkovolumskih polistirenskih plemenilnikov znamke Lyson (Slika 4). Družine smo vzpostavili tako, da smo v 20 plemenilnikov Lyson s po eno naklado, na 3 satih, nasuli okoli 0,24 dag suhih čebel, dodali pogačo s cvetnim prahom in v vsak plemenilnik vstavili matičnico s pravkar poleženo deviško matico. Po nekaj dneh smo preverili sprejetost novih matic. Družine bomo redno preverjali in po potrebi oskrbovali.



Slika 4. Nizkovolumski plemenilniki Lyson za prezimljanje matic v sezoni 2024-2025.

2.6.2 Preverba kakovosti prezimljenih čebeljih matic

V sezoni 2023 – 2024 smo vzpostavili in vzdrževali družine v nizkovolumskih Kielerjevih plemenilnikih. V spomladanskih mesecih 2024 smo 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.

Poleg tega smo kakovost matic, ki so uspešno prezimile in bile sprejete v čebeljo družino, preverili tako, da smo vsaki od teh matic določili maso, pregledali iztrebke na prisotnost spor Nosema ssp, nato pa s sekcijo teh matic odstranili in stehali ovarije, na podlagi meritev premerov izračunali volumen spermateke, ocenili število

in delež viabilnih spermijev v spermateki, ter prešteli število ovariol. Rezultate smo primerjali z rezultati sekcije letošnjih matic ter z relevantnimi podatki iz literature (Rousseau in Giovenazzo, 2021; Levesque et al., 2022).

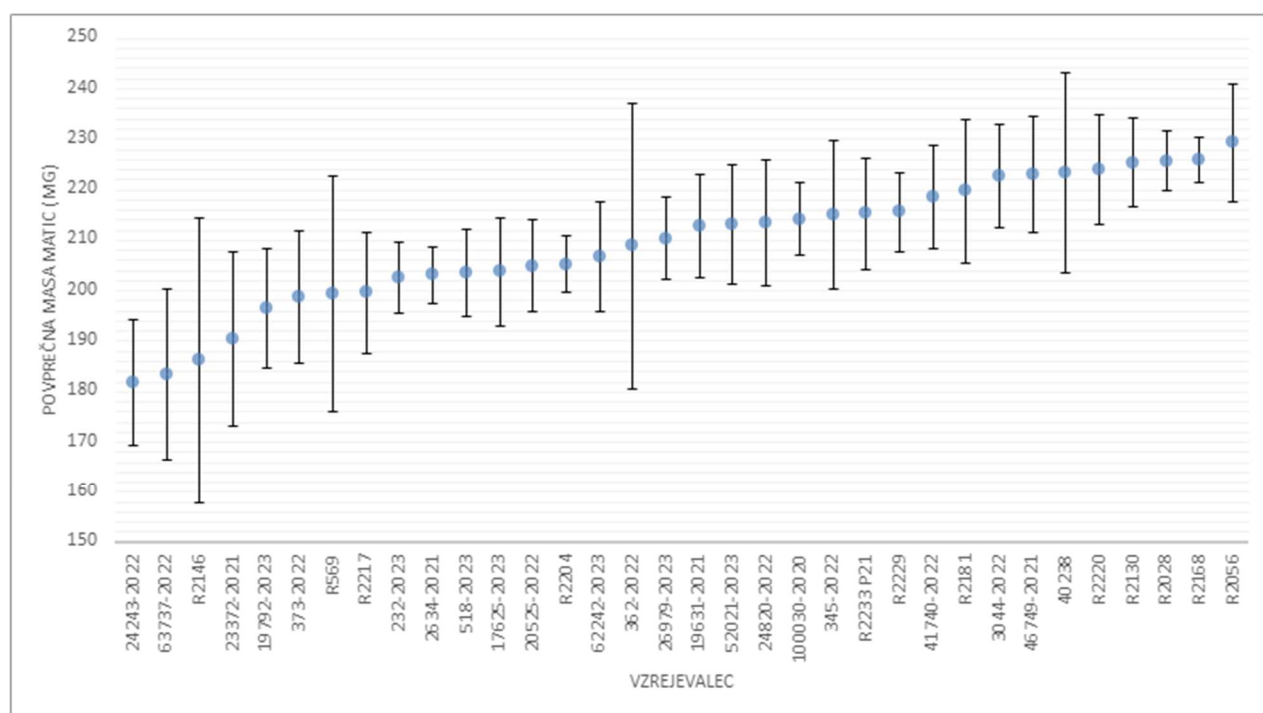
2.6.3 Proučitev ekonomske zanimivosti prezimovanja čebeljih matic za vzrejevalce

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 2024 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

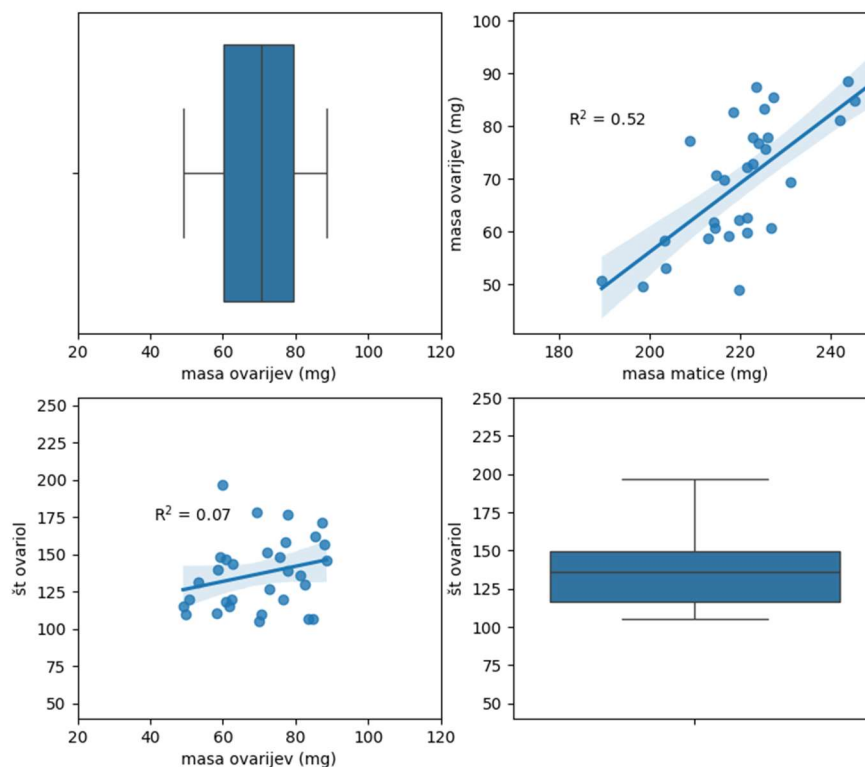
V letu 2024 je bilo vključenih v testiranje 170 matic. Po posameznem vzrejališču smo tehtali po pet matic in izračunali povprečne vrednosti mase matic po vzrejališču (Slika 5). Najvišja povprečna masa v letu 2024 je bila 229.3 mg, in najnižja 181.86 mg; skupno povprečje je bilo pri **209 ± 17.3 mg**. 48 matic je imelo maso nižjo od 200 mg, na trinajstih vzrejališčih je imelo vseh pet merjenih matic maso, višjo od 200 mg.



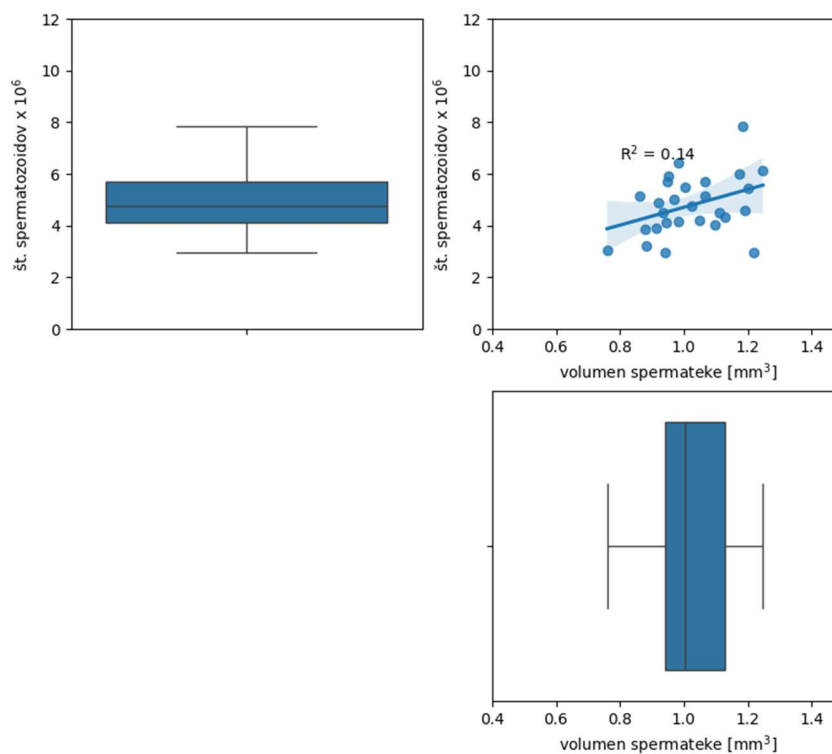
Slika 5. Povprečna masa posameznih linij matic iz vzrejališč.

Na deležu vzorčene populacije (31 matic s petih vzrejališč) smo z disekcijo abdomna odstranili ovarije, jih stehali ter prešteli število ovariol. Povprečna masa ovarijev je **70 ± 12.24 mg**, povprečno število ovariol pa **137 ± 24**. Korelacija med eno in drugo spremenljivko je bila $R^2 = 0.07$, korelacija med maso matic in maso ovarijev pa $R^2 = 0.52$ (Slika 6).

Vsaki matici smo odstranili spermateko, pod lupo odstranili trahealno ovojnico, štirikrat izmerili njen premer s programom ZenPro ter izračunali povprečni volumen: **1.03 ± 0.13 mm³**. Prešteli smo tudi spermatozoide v posamezni spermateki, povprečno število je **4.83 ± 1.15 x 10⁶**. Korelacija med eno in drugo količino je šibka - $R^2 = 0.14$ (Slika 7). Pri dveh 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, razen pri enem (30).



Slika 6. 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 7. 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 **0.67 ± 0.19**; minimalni delež je bil **0.14**, maksimalni delež živih spermatozoidov pa **0.85**.

3.2 DIAGNOSTIKA – PRISOTNOST SPOR *NOSEMA* SPP.

Rezultati pregleda iztrebkov matic na prisotnost spor *Nosema* spp. so predstavljeni v Preglednici 2. Nosemo smo zaznali v iztrebkih šestih matic s 34 vzrejališč. V letu 2024 je bilo s sporami okuženih 3 % pregledanih matic.

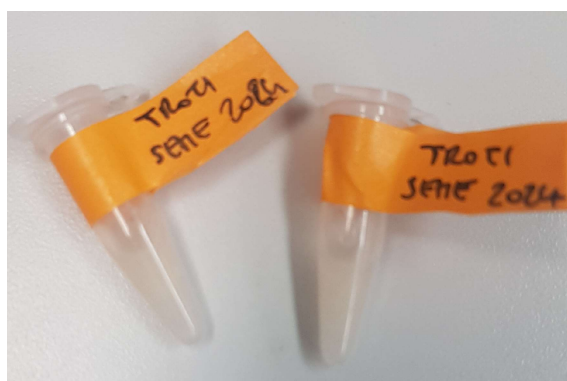
Preglednica 2. Število pregledanih matic in delež pozitivnih na prisotnost spor *Nosema* spp. v letu 2024 v primerjavi s preteklimi leti testiranja.

Leto	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024
št. pregledanih matic	n = 149	n = 140	n = 150	N = 160	N = 180	N=150	N=186	N=183	N=199
št. vzrejališč	N = 30	N = 28	N = 28	N = 30	N = 30	N=30	N=32	N=31	N=34
št. matic, pozitivnih 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 %)	6 (3 %)

V letu 2024 smo v vseh vzorcih spremljevalk matic, ki smo jih uporabili za disekcijo – z izjemo treh – zaznali prisotnost spor *Nosema* spp. (28/31). Pri pregledu preparatov iz črevesa pri 30 maticah v sekciji spor *Nosema* spp. nismo zaznali pri nobenem vzorcu.

3.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA

V letu 2024 smo za krioprezervacijo trotovskega semena izbrali matice z rodovniškimi številkami 365-2022 in 373-2022. Trote, potomce teh matic, 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 8. 8).



Slika 8. Seme trotov po končanem zbiranju.

3.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV

V letu 2024 je rezultate testiranja do 25.07.2024 oddalo 26 vzrejevalcev s 529 čebeljimi družinami. (Preglednica 3).

Preglednica 3. Seznam vzrejevalcev, ki so v letu 2024 opravljali direktni test in so oddali rezultate do 25.07.2024.

Čebeljak	Število testiranih družin	Vse ocene	Del ocen
SI328698	20	20	
SI119841	20	20	
SI324751	20		20
SI194204	20	20	
SI159559	20	3	17
SI320784	20		20
SI266129	20	20	
SI362546	20		20
SI206172	22	20	2
SI368540	20	20	
SI203524	20	20	
SI144355	20	20	
SI102001	21	21	
SI304467	20	20	
SI354361	20		20
SI377522	20	20	
SI220286	20	20	
SI387040	20	20	
SI351494	20		20
SI101871	20	20	
SI169888	24	21	3
SI347084	20	20	
SI338158	22	21	1
SI154075	20	20	
SI291402	20	20	
SI334080	20	20	

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. Ob koncu pašne sezone so stehali ali ocenili pridelek medu. Z letom 2024 se ne opravlja več testa čistilne sposobnosti, saj le-ta pade v delovno najbolj intenzivno obdobje in ga vzrejevalci ne morejo kvalitetno izvesti.

Povprečne vrednosti posameznih ocen in meritev so prikazane v Preglednici 4.

Preglednica 4. Povprečne ocene posameznih ocen in meritev.

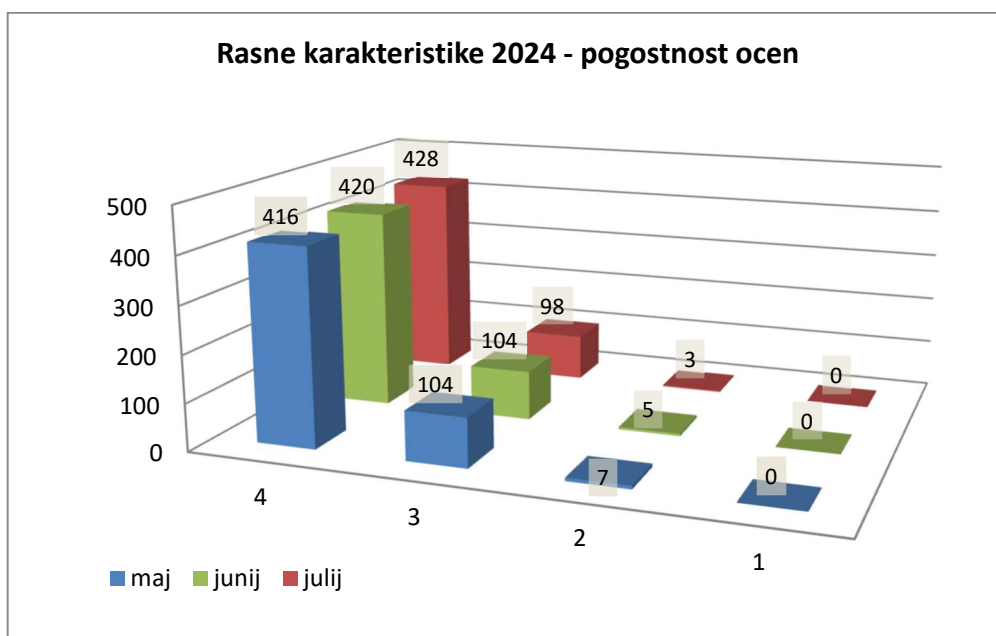
Lastnost	maj	junij	julij	N meritev
Obarvanost	3,82	3,82	3,83	529
Mirnost	3,43	3,44	3,40	529
Rojivost	3,54	3,40		529
Živalnost	3,47	3,51	3,56	529
Odpad varoj		18,5*		508
Pridelek medu			19,6	529

* v 30 dneh testiranja odpada

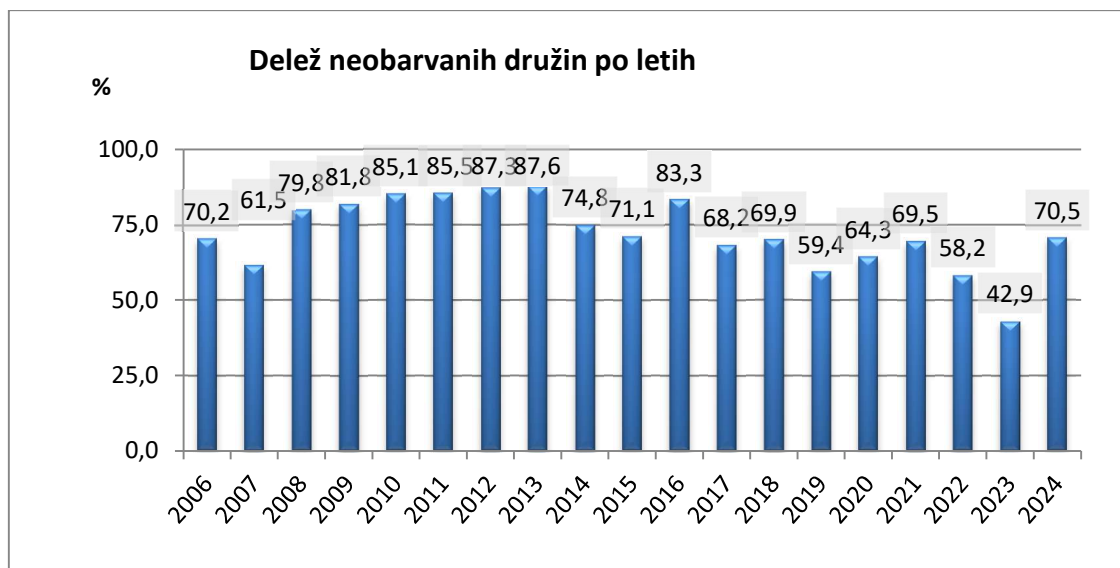
Zaradi zgodnjih otoplitev je bil razvoj čebeljih družin hiter in tudi donosi medu so bili zelo dobri. Zelo malo družin je imelo obarvane čebele, z oceno 1 praktično nobena. Tudi ocena rojivosti je malenkost boljša kot v preteklih letih.

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 je bila ocenjena precej bolje od trenda zadnjih sezon in je bila okoli 3,82 (Slika 9).

**Slika 9. Pogostnost posameznih ocen obarvanosti v letu 2024.**

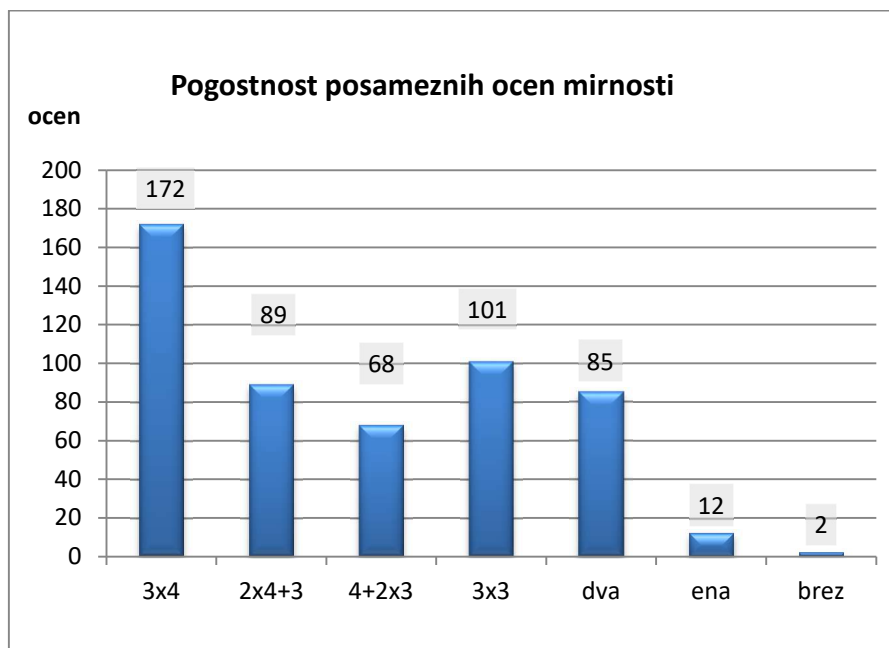
Delež neobarvanih družin v letu 2024 je bil ocenjen na 70,5 % (Slika 10), kaj je precej bolje od zadnjih sezon. Niti ena družina ni dobila ocene 1. Oceno 2 je dobilo 10 družin (1,8), kar pomeni, da bi matice teh družin morali zamenjati z bolj ustreznimi.



Slika 10. Delež družin brez obarvanih čebel po letih direktnega testiranja.

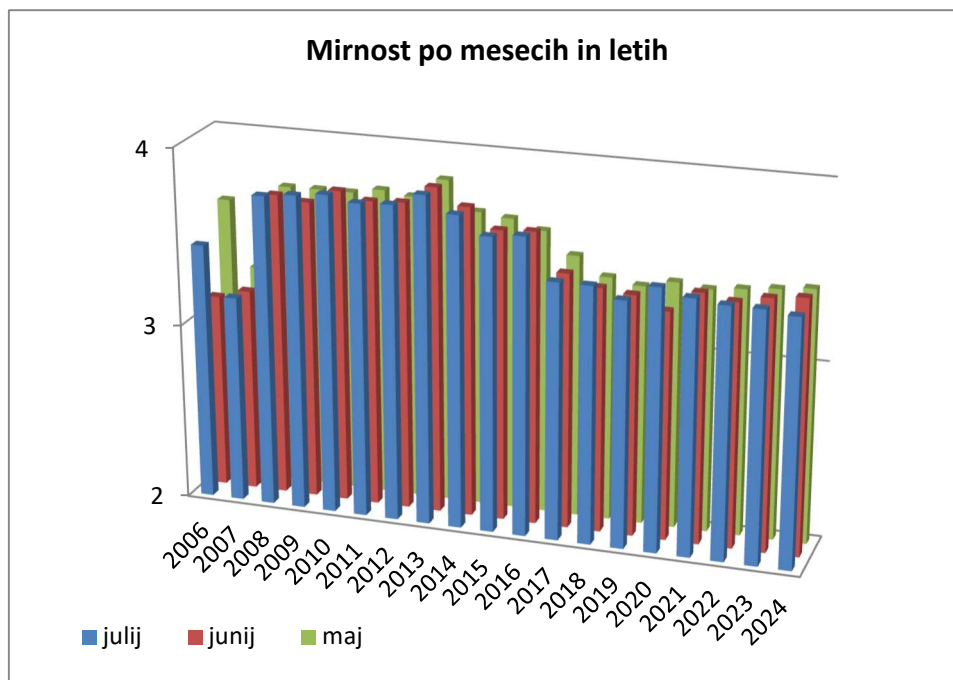
3.4.2 Mirnost ali obnašanje

Vsaka družina je bila trikrat ocenjena na mirnost: v maju 527, v juniju in juliju 529 družin. Povprečna ocena mirnosti v posameznih mesecih je prikazana v preglednici 4. Okoli 32 % družin je vedno dobilo oceno 4. Oceno 2 ali manj je dobilo 87 družin ali 18,3 % (Slika 11). Veliko število nizkih ocen pomeni, da so vzrejevalci družine ocenjevali zadosti strogo, kar je v skladu z navodili za testiranje.



Slika 11. Pogostnost posameznih ocen mirnosti. Prvi trije stolpci prikazujejo, kolikokrat je bila ista družina ocenjena z najvišjo oceno 4.

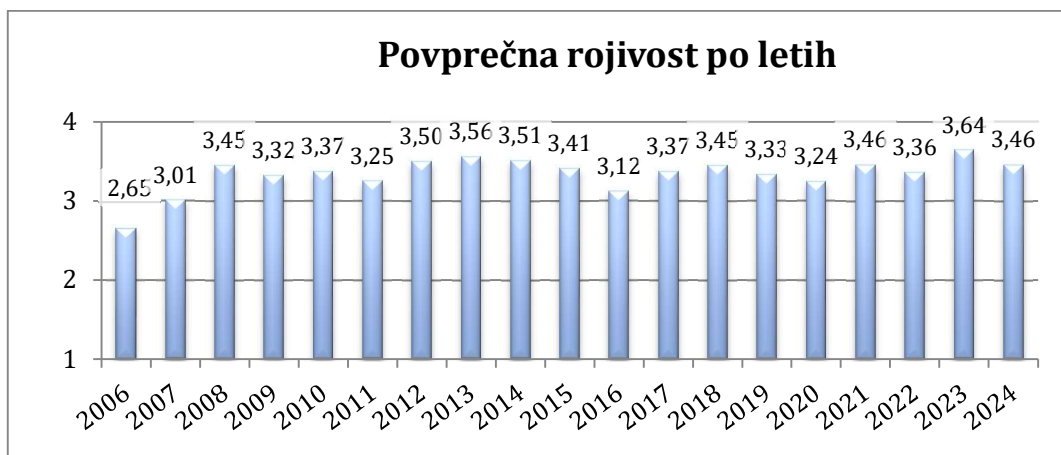
Povprečna ocena mirnosti je bila okoli 3,42, malenkost višje, kot prejšnje sezone. Povprečje mirnosti po posameznih sezonah prikazuje slika 12.



Slika 12. Mirnost po letih in mesecih.

3.4.3 Rojivost

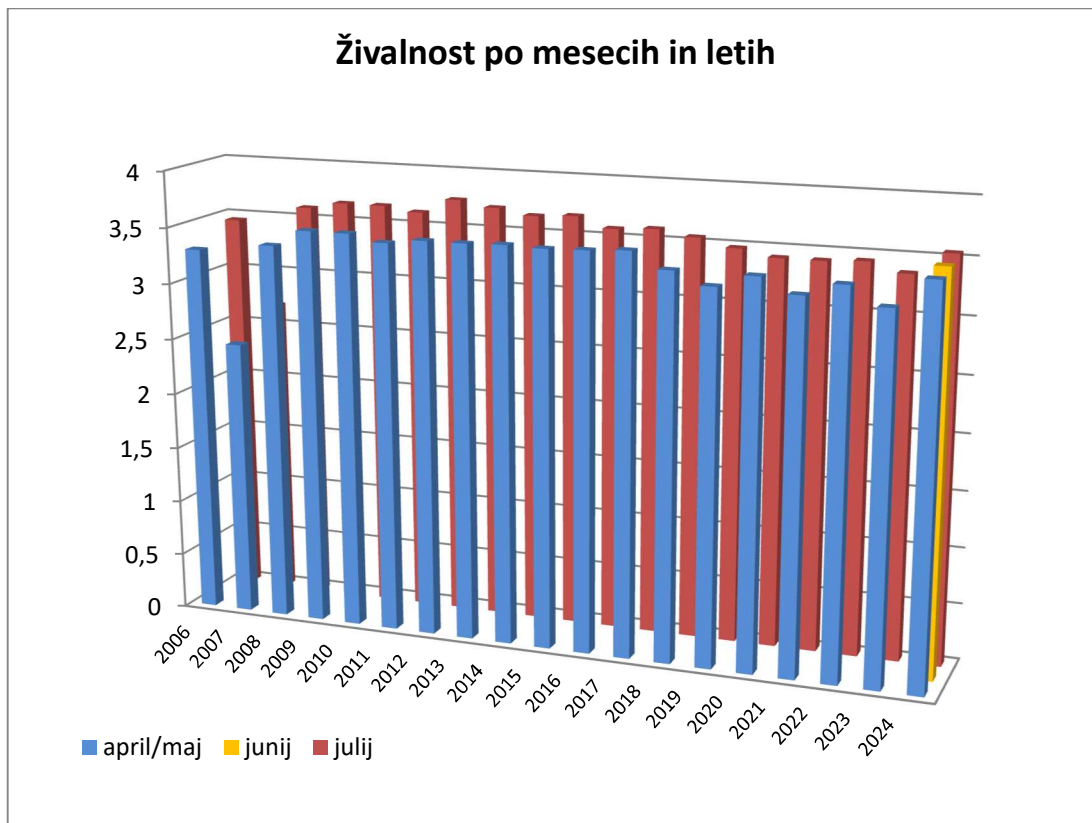
Ocenjevanje rojivosti je letos potekalo dvakrat in sicer v maju (412 družin) in v juniju (525 družin), v času najintenzivnejšega razvoja. 57,1 % družin ni poskusilo rojiti, pri 30,3 % so čebele same podrlle matičnjake. V 8,9 % družin je čebelar s trdom preprečil rojenje in 3,7 % družin je izrojilo. Leto 2024 je ponovno eno manj rojivih let (slika 13).



Slika 13. Prikaz povprečne rojivosti po letih.

3.4.4 Živalnost čebelje družine

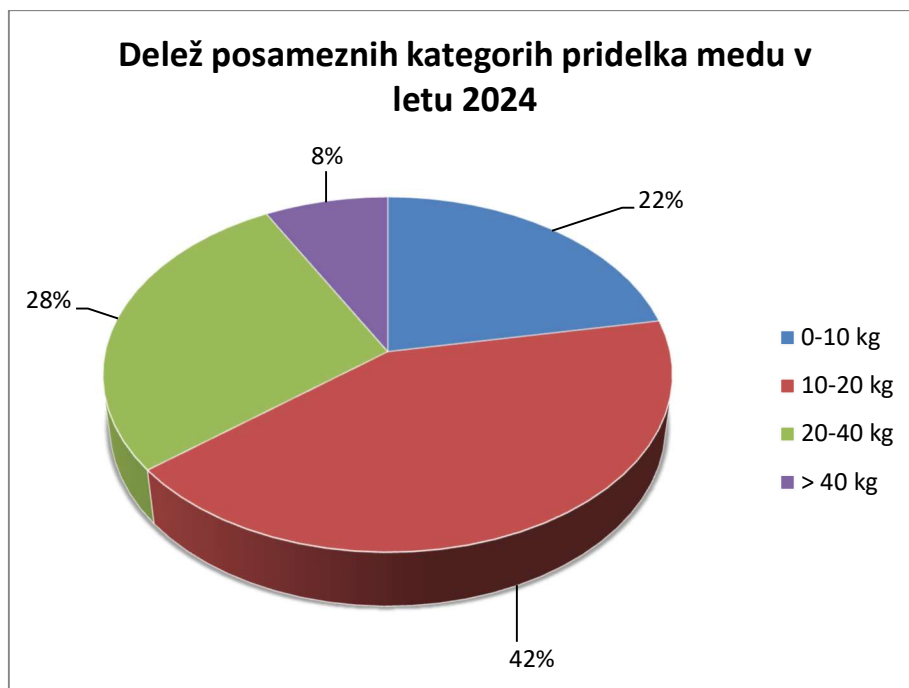
Živalnost je bila ocenjena trikrat; v maju je bilo ocenjenih 527 družin, v juniju in v juliju pa 529. Povprečna ocena v maju je bila 3,47, v juniju 3,51 in v juliju 3,55 (preglednica 4). Družine so bile v poletnih mesecih pričakovano bolj razvite; živalnost je bila v letu 2024 boljša od povprečja zadnjih let (slika 14).



Slika 14. Živalnost po mesecih in letih.

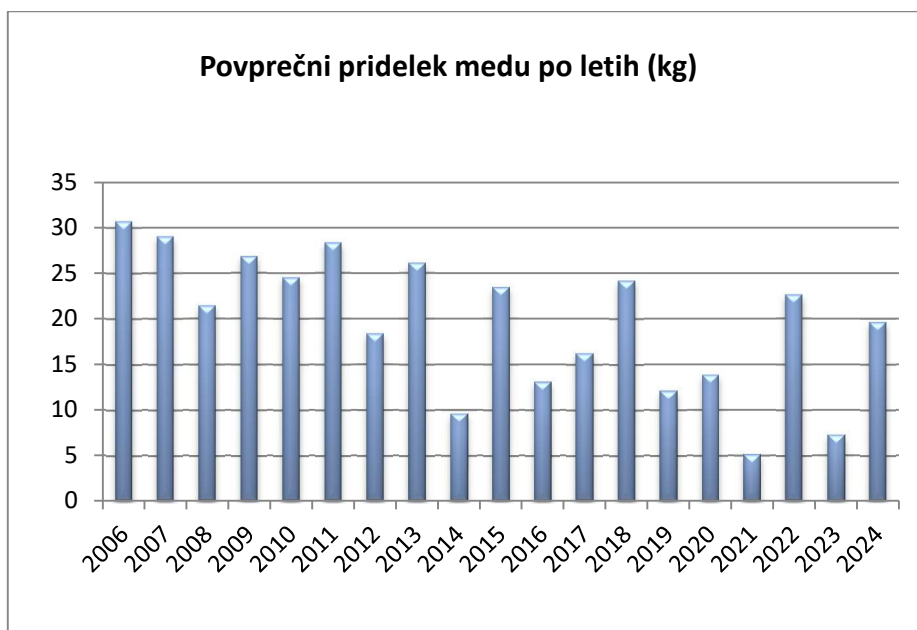
3.4.5 Donos medu

Skupni donosi medu v letu 2024 so bili med 0 in 90 kilogrami na panj. Skupno je bil donos medu izmerjen pri 529 družinah. Povprečni pridelek medu v letu 2024 po nekaj letih ponovno pričakovan in sicer 19,6 kg na panj (slika 15 in slika 16).



Slika 15. Delež posameznih kategorij pridelka medu v letu 2023.

Na sliki 16 so prikazani povprečni pridelki medu v direktnem testu.



Slika 16. Povprečni pridelek medu po letih.

3.4.6 Odpad varoj

Naravni odpad varoj je bil izmerjen pri 508 družinah in se je gibal med 0 in 4,3 varojami povprečno na dan v obdobju 30 dni. V povprečju je bil odpad zelo nizek, 0,6 pršice na družino na dan. 2 % družin sploh ni imelo naravnega odpada varoj.

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 262 izoliranih vzorcev smo nukleotidna zaporedja za mitohondrijski odsek tRNA-Leu uspešno prebrali pri 190 vzorcih, za mitohondrijski odsek COI pa pri 252 vzorcih. Kot uspešno prebrana zaporedja smo šteli zaporedja, ki so vsebovala odsek med začetnimi oligonukleotidi v polni dolžini.

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 **osem** različnih haplotipov za označevalec tRNA-Leu (preglednica 5). Poravnava zaporedij tRNA-Leu vsebuje 11 variabilnih mest, na pozicijah 29, 31, 49, 91, 117, 187,, 253, 388, 493 (pozicije so oštevilčene od prvega nukleotida, ki ni del oligonukleotidnega začetnika dalje).

Preglednica 5. Zastopanost haplotipov med analiziranimi vzorci.

haplotip	število vzorcev	odstotek zastopanosti
C2e	64	33,7
C2c	56	29,5
C1	52	27,4
C2d	8	4,2
Neimenovani SI2023	6	3,2
Neimenovani PL2021	2	1,1
nov1	1	0,5
nov2	1	0,5

V populaciji smo zaznali dva haplotipa, ki v literaturi še nimata imena, sta pa prisotna v podatkovni bazi GenBank. Pogostejšega (Neimenovani SI2023) smo zaznali pri spremljanju mithondrijske linije v letu 2023. Drugi, bolj redek neimenovani haplotip pa je bil prvič opisan na Poljskem v letu 2021. Zaznali smo tudi dva nova, redka haplotipa, ki nimata ekvivalenta v zbirki GenBank.

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 devet haplotipov. Poravnava zaporedij COI vsebuje

osem variabilnih mest na pozicijah 2, 100, 137, 275, 422, 449, 491 in 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 smo izvedli na 15 družinah, ki smo jih redno dohranjevali in vzpostavili na vsaj 3 nakladah. Plemenilčke smo pregledovali in oskrbovali 1x mesečno. Na ta način je uspešno prezimilo 6 matic od 15.

3.6.2 Preverba kakovosti uspešno prezimljenih čebeljih matic

Šest matic, ki so uspešno prezimile, smo dodali v družine in spremljali njihovo sprejetost v družine in površino zalege. Opravili smo tudi fiziološke ter morfološke meritve teh matic in rezultate primerjali z rezultati letošnjih matic v sekciji ter s podatki iz literature.

Preglednica 6. Ocena števila satov zalege v družinah P1 do P6 na datum 18. 6. in 26. 6. 2024.

	Površina zalege (dm ²)		opombe
	18/06/2024	26/06/2024	
P1	63,5	69,5	poapnela zalega
P2	67	64	poapnela zalega
P3	45,25	50,5	poapnela zalega
P4	63,75	46,5	
P5	62,25	38,5	
P6	56	34	

Po tem, ko smo ocenili število satov zalege (preglednica 6), smo vseh 6 matic stehtali, odvzeli iztrebek, nato pa s sekcijo odvzeli ovarije, spermateko in črevo. Postopek je bil enak kot v poglavju 2.1. Povprečna masa teh matic je bila **242.4 ± 22.6 mg**. V primerjavi z maso letošnjih matic v sekciji (poglavje 3.1) so prezimljene matice težje, kar pa je običajno za starejše matice. V primerjavi s tujo nedavno študijo, v kateri so matice prezimljale v različno velikih bankah matic, so vrednosti mase matic, prezimljenih v plemenilnikih, bližje kontrolni skupini, med tem ko so matice, ki so prezimile v bankah, lažje (Levesque & Giovenazzo, 2022).

Masa ovarijev prezimljenih matic je znašala **109.0 ± 20.89 mg**, povprečno število ovariol je bilo **144.5 ± 10.05**. V primerjavi z maticami v sekciji je masa ovarijev prezimljenih matic višja, prav tako je malenkost višje število ovariol. Povprečni volumen spermateke prezimljenih matic je bil **1.01258 mm³** kar je podobne velikosti kot volumen spermatek matic v sekciji. Povprečno število spermatozoidov (**2.1927 ± 0.83 *10⁶**) kot tudi delež živih spermatozoidov (**0.55 ± 0.29**) pa sta precej nižja od vrednosti za matice, ki so bile letos v sekciji.

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, zlasti odvisno od vremena. 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 2024 pa lahko tudi presega 150 €; rezervne družine dosegajo cene med 12 € do 17 € na sat; v ceno izgube gospodarske družine pa je potrebno všteti tudi izgubo pridelka. Prezimljene gospodarske matice v RS imajo cene med 40 in 90 €, v tujini pa cena dosega 89 € (VB). Oglaševana cena prezimljene rodovniške matice v Sloveniji je 200 €. Ti podatki kažejo, da je verjetno ekonomsko upravičeno odzemanje in zgodnje spomladanska prodaja matic iz manjših rezervnih družin (5 - 7 satov).

4 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Matice so ključna komponenta čebelje družine; družine z maticami slabše kvalitete so šibkejšje 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 2024 je bila povprečna masa matic 209 ± 17.3 mg primerljiva s prejšnjimi leti ($210,1 \pm 15,0$ v letu 2020; $212.8 \pm 9,3$ mg v letu 2021; 211.8 ± 17.3 mg v letu 2022; 213.7 ± 13.7 mg v letu 2023). V letu 2024 je imelo 48 matic maso nižjo od 200 mg, na trinajstih vzrejališčih je imelo vseh pet merjenih matic maso, višjo od 200 mg.

Za 31 seciranih matic je bil odnos med št. ovariol in maso ovarijev ter med maso matic in maso ovarijev šibek. Povprečna masa ovarijev je 70 ± 12.24 mg, povprečno število ovariol pa 137 ± 24 . Za primerjavo s prejšnjimi leti so bile te vrednosti: (1) leto 2020 - povprečna masa ovarijev 59 ± 15 mg, povprečno število ovariol 150.1 ± 13.5 , (2) leto 2021 - povprečna masa ovarijev 78 ± 23 mg, povprečno število ovariol 138 ± 37 , (3) leto 2022 - povprečno maso ovarijev $54,8 \pm 9,1$ mg in povprečno število ovariol $155,5 \pm 18,7$ in (4) leto 2023 - 64 ± 13 mg, povprečno število ovariol pa 116 ± 30 .

Povprečni volumen spermateke v letu 2024 je ocenjen na 1.03 ± 0.13 mm³. Povprečno število spermatozoidov pa je bilo $4.83 \pm 1.15 \times 10^6$. Nobena teh dveh vrednosti ne izstopa glede na ocene prejšnjih let. Za primerjavo s prejšnjimi leti sta bili ti vrednosti: (1) leto 2020 - povprečni volumen spermateke: 0.61 ± 0.19 mm³, povprečno število spermatozoidov $5.23 \times 10^6 \pm 1.46 \times 10^6$, (2) leto 2021 povprečni volumen spermateke: 1.02 ± 0.13 mm³, povprečno število spermatozoidov $2.98 \pm 1.85 \times 10^6$, (3) leto 2022 - povprečni volumen spermatek $0,97 \pm 0,17$ mm³, povprečni število spermatozoidov v spermateki $3,76 \pm 1,2 \times 10^6$ in (4) leto 2023 – povprečni volumen spermateke 0.91 ± 0.20 mm³ in povprečno število spermatozoidov $6.64 \pm 2.31 \times 10^6$.

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 2024 je diagnostika pokazala prisotnost spor *Nosema* spp. v iztrebkih zgolj šestih matic z 34 vzrejališč (3 % pregledanih matic), kar je najnižje po letu 2019, ko so bile vse pregledane matice brez prisotnih spor. Upada nose mavosti žal ni zaznati pri čebelah delavkah spremljevalkah matic (kar 28 od 31 vzorcev je bilo pozitivnih).

V letu 2024 so, tako kot prejšnja leta, vzrejevalci izvedli direktni test, v katerem so testirali kandidatne matičarje. Rezultati testiranja so orientacija za odbiro za leto 2024. V letošnjem letu je v navodilu za izvajanje direktnega testiranja prišlo do spremembe in sicer je izvzeto izvajanje testiranja čistilne sposobnosti čebeljih družin s pin-testom (Priloga 1).

Do dogovorjenega datuma je v analizo oddalo rezultate 26 vzrejevalcev, ki so skupno testirali 529 družin. Za vsakega vzrejevalca smo na podlagi zbranih ocen pripravili seznam najprimernejših matic za vzrejo v naslednjem letu in seznam matic, skupaj s priporočilom, katere matice naj vzrejevalec odstrani z vzrejališča, ker so zaradi ene ali več lastnosti za vzrejo neprimerne.

Za vse matice velja, da za nadaljnjo vzrejo niso primerne tiste, ki so bile pri oceni rasnih karakteristik ocenjene z manj kot 4. Priporočamo tudi, da vzrejevalec matice z obarvanimi družinami odstrani iz vzrejališča in nadomesti z bolj primernimi. Neprimerne so tudi tiste, ki so v kategorijah mirnosti, rojivosti ali živalnosti dobile oceno nižjo od 3. Vzrejevalci naj navedeno razvrstitev sprejmejo predvsem kot priporočilo.

V letu 2024 so bile čebelje družine rahlo manj rojive od preteklih let. Rojivost v letu je soodvisna od vremenskih razmer. Leto 2024 je tako kot leto poprej eno najmanj rojivih let. Povprečen pridelek je znašal 19,6 kg na panj, kar je precej bolje kot lani (7,2 kg), ne dosega pa donosov medu v direktnem testiranju med leti 2006 in 2011, ki so se držali nad 20 kg. Obarvanost čebeljih družin se je izrazito izboljšala, družin z močno rumeno obarvanimi čebelami praktično ni bilo. Povprečna ocena mirnosti je bila okoli 3,42, malenkost višje, kot prejšnje sezone. Testiranja zadnjih let prikazujejo trend strožjega ocenjevanja mirnosti in tudi obarvanosti čebeljih družin. Strožje ocenjevanje poenostavi izbor najboljših družin.

Spremljanje mitohondrijske linije je smiselno iz vidika ohranjanja kranjske čebele v Sloveniji kot tudi za spremljanje pestrosti znotraj genskega sklada. Mitohondrijska DNA se deduje neposredno po materini liniji in zato ima zalega, ki se vzorči, praviloma enako mitohondrijsko zaporedje kot matica. Vsi do sedaj testirani vzorci (tudi iz preteklih let) pripadajo ustrezni mitohondrijski liniji – to je linija C. Vzorčenje vseh kandidatnih matičarjev je prikazalo 8 haplotipov mitohondrijskega fragmenta tRNA-Leu. Štirje so pogostejši in so bili prisotni tudi lani, štirje pa so bili redkejši. Dva od teh redkejših haplotipov še nista v zbirki GenBank.

Prezimljene matice so ekonomsko zanimive 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 smo preskusili, kako se obnese prezimljanje matic v nizkovolumskih Kielerjevih plemenilnikih. Ti imajo možnosti nadgradnje volumna z nakladicami. 40 % uspešnost prezimitve je daleč od idealnega rezultata. Vendar moramo tu vzeti v obzir, da i) imajo vsi

vzrejevalci konec vzrejen sezone polnih kar nekaj plemenilnikov in ii) da je te plemenilnike konec sezone potrebno pospraviti. V primeru rabe plemenilnikov, ki jih je možno nadgraditi oz. sestaviti, je poskus prezimovanja matic v nizkovolumskih plemenilnikih poceni, kljub temu, da je družine ravno tako potrebno krmiti in zdraviti, zato ta pristop priporočamo vzrejevalcem.

5 SPLOŠNE UGOTOVITVE

Matica je ključna komponenta čebelje družine. 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. Tovrstno vsakoletno spremljanje populacije čebeljih družin, katerih matice so kandidati za nadaljnjo odbiro, je izrednega pomena.

Slabša kakovost matice vodi do šibkejših družin, kar predstavlja tudi ekonomski problem. Visoko kakovostne matice se odlikujejo z visoko živo maso, številom ovariol, zadostnim številom spermatozoidov v spermateki, zgodnjim začetkom zaleganja, visokim številom poleženih jajčec na dan, kvalitetno, nepresledkasto zalego ter odsotnostjo bolezni in škodljivcev.

V letu 2024 je bila povprečna masa matic 209 ± 17.3 mg, kar je primerljivo s prejšnjimi leti. Povprečna masa ovarijev je bila 70 ± 12.24 mg, povprečno število ovariol pa 137 ± 24 , kar je nekoliko variiralo v primerjavi s preteklimi leti. Povprečni volumen spermateke v letu 2024 je bil 1.03 ± 0.13 mm³, povprečno število spermatozoidov pa $4.83 \pm 1.15 \times 10^6$, kar ne izstopa glede na prejšnja leta.

Diagnostika prisotnosti Nosema je pokazala prisotnost Nosema spp. v iztrebkih zgolj 3 % pregledanih matic, kar je najnižje po letu 2019. Vendar pa ni upada nose mavosti pri delavkah spremljevalkah matic.

Rezultati direktnega testa so pokazali, da so bile čebelje družine manj rojive kot pretekla leta. Povprečen pridelek medu je znašal 19,6 kg na panj, kar je boljše kot lani.

Vsi testirani vzorci pripadajo ustreznim mitohondrijskim linijam C, s prisotnostjo osmih haplotipov mitohondrijskega fragmenta tRNA-Leu.

Rezultati kažejo, da je kvaliteta matic v letu 2024 primerljiva s prejšnjimi leti, z nekaterimi izboljšavami in izzivi. Spremljanje in izboljšanje kvalitete matic ostaja ključnega pomena za uspešno čebelarjenje.

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
- Levesque, M., Rousseau, A., & Giovenazzo, P. (2022).** Impacts of indoor mass storage of two densities of honey bee queens (*Apis mellifera*) during winter on queen survival, reproductive quality and colony performance. *Journal of Apicultural Research*, 62(2), 274–286. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2126613>
- 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/s13592-011-0073-1](https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1)

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** izenačenih družin iz istega selekcijskega čebelnjaka. Družine se testira trikrat letno.

Matice v testiranju **so kandidatke za matičarje v letu 2024. Priporočljivo je, da imajo že znano poreklo** ter dodeljeno **rodovniško številko**, saj je ta podatek bistven za analizo. V primeru, da rodovniške oz. gospodarske številke še nima, vam bomo dodelili novo. Če ima družina znanega matičarja, nam to prosim sporočite.

Delavkam iz testiranih družin bomo v jesenskem obdobju na Kmetijskem inštitutu Slovenije izmerili **kubitalni indeks in določili število 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:

1. medeno satje, izloženo iz družine, označimo in stehtamo. Po končanem točenju prazno satje ponovno stehtamo in neto količino medu zabeležimo na evidenčni list.
2. Sprejemljiva je tudi druga metoda, pri kateri izloženo 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 so vmesne ocene.

- 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.

ODPORNOST NA VAROJO: 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.

RASNE KARAKTERISTIKE: Obarvanost obročkov zadka. Ocenjuje se obarvanost prvega in drugega obročka na zadku ter število posameznih čebel z obarvanimi obročki. 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 stojišču. 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).

Vzrejališče (čebelar):
Stojišče:
Registrska oznaka čebelnjaka:

[illegible]

O – obarvanost obročkov zadka, **M** – mirnost, **R** – rojivost, **Ž** – živalnost