

Oddelek za živinorejo

Čebelarstvo

Hacquetova ulica 17

SI-1001 Ljubljana

Slovenija

T: 01 280 51 74

F: 01 280 52 55

Poročilo o izvedenem ukrepu v letu 2020

**SPREMLJANJE KAKOVOSTI MATIC KRANJSKE ČEBELE IN VZREJE TROTOV
TER PROUČEVANJE MOŽNOSTI OHRANJANJA MATIC ČEZ ZIMO**

Programsko obdobje 2020 – 2022

Poročilo o izvedenih nalogah v letu 2020

Vodja naloge:

dr. Ajda Moškrič

Poročilo pripravili:

dr. Ajda Moškrič

dr. Janez Prešern

dr. Maja Ivana Smodiš Škerl

Jernej Bubnič

Peter Podgoršek



Poročilo je v skladu z Uredbo o izvajanju Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2020–2022 (Uradni list RS, št. 78/19) in je oblikovano na osnovi javnega naročila z oznako JN004017/2020-W01 z dne 23. 6. 2020, Odločitve o oddaji javnega naročila s številko 430-84/2020/17 z dne 11. 8. 2020 in bipartitne pogodbe med Ministrstvom za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in Kmetijskim inštitutom Slovenije s številko 2330-20-000183.

Doseženi rezultati so nastali v okviru Programa ukrepov na področju čebelarstva v Republiki Sloveniji v letih 2020-2022, ki je financiran iz sredstev proračuna RS na proračunski postavki 140033 Program ukrepov v čebelarstvu – 14-20-SLO (50 %) in 140031 Programa ukrepov v čebelarstvu – 14-20-EU (50 %), ukrepu Podpore v čebelarstvu; uredba 2020-2022, NRP 2330-20-0004.

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 IZVAJANJE DIAGNOSTIKE.....	5
2.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENKEGA MATERIALA	6
2.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV	6
2.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE	7
2.6 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC	9
2.7 PREVERBA KAKOVOSTI TEH ČEBELJIH MATIC	9
2.8 PROUČITEV EKONOMSKE ZANIMIVOSTI PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC.....	10
3 REZULTATI	11
3.1 SPREMLJANJE MORFOLOŠKIH IN FIZIOLOŠKIH PARAMETROV ČEBELJIH MATIC	11
3.2 DIAGNOSTIKA – PRISOTNOST SPOR <i>NOSEMA</i> SPP.	13
3.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENKEGA MATERIALA	13
3.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV	15
3.4.1 Rasne karakteristike – obarvanost obročkov zadka	16
3.4.2 Mirnost ali obnašanje.....	16
3.4.3 Rojivost.....	17
3.4.4 Živalnost.....	18
3.4.5 Donos medu	18
3.4.6 Odpad varoj in čistilna sposobnost.....	19
3.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE	21
3.6 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC	22
3.7 PREVERBA KAKOVOSTI TEH ČEBELJIH MATIC	22
3.8 EKONOMSKA ZANIMIVOST PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC	22
4 INTERPRETACIJA REZULTATOV	24
5 SPLOŠNE UGOTOVITVE.....	25
6 VIRI.....	26
PRILOGA 1: DIREKTNO TESTIRANJE ČEBELJIH DRUŽIN	1

POVZETEK

V raziskavi smo v obdobju od podpisa pogodbe do 4. 9. 2020 spremljali kakovost vzreje matic kranjske čebele ter proučevali možnosti ohranjanja matic čez zimo. Matice izhajajo iz selekcioniranih matičarjev. Skupaj smo vzorčili in analizirali 180 matic iz 30 vzrejališč. Izvedli smo morfološko analizo, pri deležu vzorčene populacije pa smo z disekcijo določili maso ovarijev, število ovariol, izmerili premer in izračunali volumen spermateke ter določili število spermatozoidov v spermateki. Pri čebelah spremljevalkah smo mikroskopsko določali prisotnost spor *Nosema* spp. Pri deležu vzorčene populacije smo z molekularnimi tehnikami določili mitohondrijsko linijo, določili ustreznost pripadnosti mitohondrijski liniji C ter ovrednotili variabilnost odbranih vzorcev na podlagi treh mitohondrijskih lokusov (tRNA-Leu, COI in ND2). Trotovsko seme potomcev visoko kakovostnih matic smo shranili z uporabo postopkov za dolgoročno shranjevanje genetskega materiala. Zbrali in obdelali smo podatke v okviru direktnega testiranja vzrejevalcev.

Za potrebe proučevanja možnosti ohranjanja matic čez zimo smo opravili pripravljalna dela za vzpostavitev banke matic istega matičarja. Proučili smo znanstveno in strokovno literaturo v zvezi s tehnikami prezimovanja matic ter določili ključne parametre za poskus, ki bo izveden pozimi 2020/2021. Opravili smo preliminarno oceno ekonomičnosti prezimovanja.

1 UVOD

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

Vzreja matic je v sodobnem čebelarstvu pomembna dejavnost. Uspešna vzreja mora temeljiti na upoštevanju naravnih zakonitosti, zato se pri vzreji poskuša ustvariti podobne razmere, kot so v naravni vzreji matic. Vzreja kakovostnih, reproduktivnih matic je cilj slehernega čebelarja vzrejevalca. V Sloveniji čebelarimo z avtohtono čebeljo podvrsto, katere lastnosti želimo ohraniti, zato je vzreja kakovostnih matic zelo pomembna. Na ta način tudi prispevamo k razvoju in ohranjanju zdravih čebeljih družin ter pridelavi potrebnih količin varnih in kakovostnih čebeljih pridelkov.

Vzrejevalci z vzrejenimi maticami »opremljajo« tudi lastne družine v selekcijskem čebelnjaku, kar je nujno za linijsko vzrejo skozi daljše obdobje. 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*. Zato v letošnjem letu 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. Te matice so običajno namenjene sanaciji družin, katerih matice so propadle preko zime. Najpogostejši način prezimljanja matic je v rezervnih družinah; domnevamo, da je tak način za vzrejevalca ekonomsko zahteven. V zadnjem času se zopet uveljavljajo raziskave o možnosti vzpostavitve zimske banke matic, ki bi bila ekonomsko bolj ugodna, saj bi v eni družini lahko prezimovalo več matic.

2 METODE DELA

2.1 SPREMLJANJE ČEBELJIH MATIC S FIZIOLOŠKIMI IN MORFOLOŠKIMI MERITVAMI

Tabela 1: Pregled vzrejevalcev v letu 2020

Zap. št.	Vzrejevalec	NASLOV	POŠTA
1	Andrejč Jožef	Murski Petrovci 1a	9251 Tišina
2	Bali Robert	Apače 303	2324 Lovrenc na Dr. Polju
3	Bukovšek Janko	Ul. M. Korbarjeve 20a	4000 Kranj
4	Bukovšek Štefan	Golo Brdo 19	1215 Medvode
5	Donko Bojan	Dolgovaške gorice 16	9220 Lendava
6	Dremelj Janez	Dragovšek 13	1275 Šmartno pri Litiji
7	Gaber Viktor	Novačanova ulica 3	3202 Ljubečna
8	Grm Darko	Hude Ravne 1	1273 Dole pri Litiji
9	Herbaj Jožef	Nedelica 29	9224 Turnišče
10	Hrastelj Marko	Ženje 5	8270 Krško
11	Jug Vasja	Grant 1e	5242 Grahovo ob Bači
12	Juvan Nejc	Pod Gonjami 103	2391 Prevalje
13	Kapun Erik	Vaneča 70a	9201 Puconci
14	Kavaš Milena	Ribiška 8	9233 Odranci
15	Kolar Peter	Doklece 3	2323 Ptujška Gora
16	Koštomaj Matija	Paridol 15	3224 Dobje pri Planini
17	Lešek Venčeslav	Olešče 28	3270 Laško
18	Luznar Henrik	Begunje 170	4275 Begunje na Gorenjskem
19	Nakrst Mitja	Žeje 30	1233 Dob
20	Novak Miha	Zg. Slivnica 17	1293 Šmarje-Sap
21	Petelin Irma	Pliskovica 102	6221 Dutovlje
22	Pokorni Julij	Gačnik 3	2211 Pesnica
23	Poslek Boris	Mariborska 45	2314 Zgornja Polskava
24	Tomažič Matevž	Visole 19	2310 Slovenska Bistrica
25	Tratnjek Jožef	Žižki 93	9232 Črenšovci
26	Vidovič Jože	Apače 300	2324 Lovrenc na Dr. Polju
27	Vozelj Ladislav	Dragovšek 18	1275 Šmartno pri Litiji
28	Zaletelj Henrik	Fužina 59	1303 Zagradec
29	Zemljič Andrej	Boračeva	9252 Radenci
30	Kmetijski inštitut Slovenije	Hacquetova ulica 17	1000 Ljubljana

Matice so izvirale iz vzrejališč v različnih statističnih regij v Sloveniji: gorenjske, goriške, JV Slovenije, obalno-kraške, osrednjeslovenske, podravske, pomurske, savinjske in zasavske regije. V letu 2020 smo pregledali 180 matic iz tridesetih od enaintridesetih odobrenih vzrejališč gospodarskih matic (Tabela 1). Vzorčene matice iz istega vzrejališča so izvirale od istega matičarja. 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; matico smo stehali z analitsko tehtnico (Mettler Toledo). Po tehtanju smo matico preložili v petrijevko in počakali, da se iztrebi. Iztrebek smo redčili v 200 µL destilirane vode in shranili na -20°C do nadaljnje obdelave. Iztrebek smo kasneje pregledali na prisotnost spor mikrosporidija *Nosema* spp.



Slika 1. Matica v petrijevki za vzorčenje iztrebka (levo). Disekcija matice pod lupo (sredina in desno).

Dodatno smo na šestih maticah s petih vzrejališč opravili še disekcijo: skupaj smo secirali trideset matic. Matice smo ravno tako uspavali s CO₂, jih stehali ter vzorčili iztrebek (Slika 1). Nato smo izvedli sekcijo, stehali smo ovarije, prešteli število ovariol v enem ovariju, izmerili premer in izračunali volumen spermateke ter prešteli spermatozoide, ki so prisotni v spermateki. Za kasnejše analize smo shranili tudi preparat črevesa vsake od matic v disekciji. Toraks matic smo uporabili za ekstrakcijo DNA in določanje mitohondijske linije z molekulsko metodo PCR.

2.1.1 Tehtanje ovarijev in štetje ovariol

Odstranjena ovarija smo stehali z analitsko tehtnico (Mettler Toledo). Po tehtanju smo ovarije fiksirali v 1 ml raztopini formalina in shranili na 4 °C do štetja. Število ovariol smo določili s štetjem posameznih ovariol pod lupo.

2.1.2 Merjenje premera spermateke in računanje volumna

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

Enačba 1. Izračun volumna

Spermateko smo shranili v 50 µL raztopine »Insect ringer« (Hyes-ova raztopina). Pod svetlobnim mikroskopom smo pri vsaki spermateki na objektnem stekelcu najprej odstranili ovoj iz trahej. Nato smo spermateko slikali

in izmerili 4 premere (Slika 2; d), ki smo jih potem izpovprečili (\bar{d}). Na podlagi povprečnega premera smo izračunali volumen (Enačba 1).



Slika 2. Merjenje premera spermateke. Spermateka z ovojem iz trahej (levo). Spermateka z odstranjenim ovojem, pred meritvami (desno).

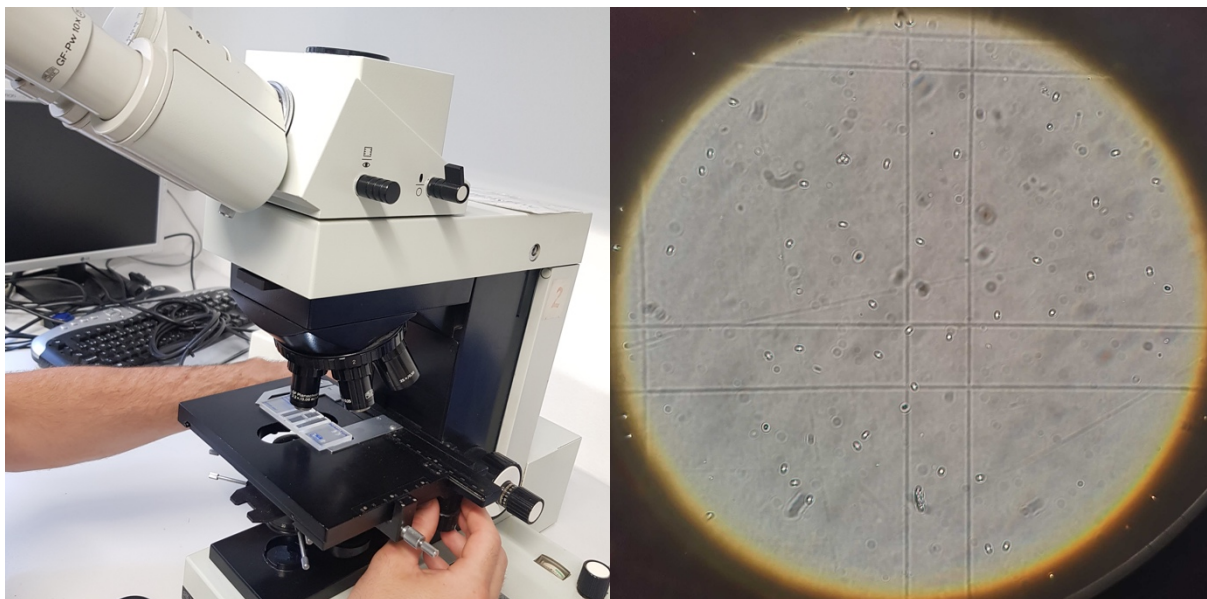
2.1.3 Štetje spermatozoidov v spermateki čebelje matice z uporabo hemocitometra

Po izvedenih meritvah premera spermateke smo posamezno spermateko s pinceto odprli v 50 μL raztopine »Insect ringer«. Počakali smo 5 min, nato smo dodali 950 μL destilirane vode. Tako tretirane spermatozoide smo inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi, nato smo dodali 4 mL formalina, ki omogoči fiksacijo preparata. Tako pripravljene vzorce smo shranili na 4 °C do štetja spermatozoidov. Vzorec smo pred nanosom na hemocitometer rahlo pretresli, da so se spermatozoidi premešali. Nato smo s pipeto nanесли kapljico suspenzije v »V« utro 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 400x povečavi.

2.2 IZVAJANJE DIAGNOSTIKE

Število spor *Nosema* spp. smo določali z mikroskopsko preiskavo iztrebkov matic, kot omenjeno zgoraj. Preparat za opazovanje smo pripravili v petrijevki z dodatkom 200 μL destilirane vode, nato smo suspenzijo pod svetlobnim mikroskopom pregledali s hemocitometrom. Pri pojavu spor v vzorcu smo upoštevali vse spore v 400 poljih hemocitometra. Za prisotnost spor *Nosema* sp. smo pregledali skupno 180 vzorcev

iztrebkov. Pri deležu matic, ki smo jih uporabili za disekcijo, smo za prisotnost spor pregledali tudi 30 vzorcev homogeniziranih zadkov čebel spremljevalk.



Slika 3. Mikroskopsko pregledovanje vzorcev na prisotnost spor *Nosema* spp. (levo). Spore *Nosema* spp. v vzorcu iztrebka pri eni izmed matic.

2.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENKEGA MATERIALA

Dolgoročno shranjevanje genskega materiala kakovostnih matic smo izvedli sodelavci Kmetijskega inštituta Slovenije. S sterilno tehniko je odvzeto seme trotom, potomcem skrbno odbranih matic za namen nadzorovanega parjenja, s plemenilne postaje v Bohinju. Seme je bilo shranjeno na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, skladno z 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 2020 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 2020 je rezultate testiranja do 20. 08. 2020 oddalo 21 vzrejevalcev s 442 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

2020 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 sekciji 3.4.

2.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE

Mitohondrijsko linijo smo določili genetsko z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) s pomnoževanjem specifičnega mitohondrijskega fragmenta, ki je uporaben kot dober napovedovalec pripadnosti linijam C, M, A ali O. Fragment intergenske regije t-RNA^{Leu} – Cox2 (v nadaljevanju tRNA-Leu) je najbolj široko uporabljen mitohondrijski marker za razlikovanje med linijami in nekaterimi podvrstami medonosne čebele (pregledni članek Meixner in sod., 2013). Za podvrste, ki pripadajo evlucijski liniji C (kamor spadajo poleg kranjske čebele tudi *A. m. ligustica*, *A. m. caucasica*, *A. m. carpathica* in *A. m. cercopia*), je značilno kratko zaporedje in odsotnost variabilnosti v dolžini fragmenta tRNA-Leu.

Da bi dobili bolj celosten vpogled v variabilnost populacije slovenske kranjske čebele v vzrejališčih matic, smo dodatno izbrali še dva mitohondrijska markerja: COI (citokrom oksidaza 1) in ND2 (NADH-dehidrogenaza 2). Metoda "DNA barcoding" z markerjem COI, ki je visoko ohranjen na ravni vrst, se uspešno uporablja pri identifikaciji organizmov (Herbert in sod, 2003). Uporabnost pri razlikovanju med podvrstami medonosne čebele na podlagi tega markerja je zaenkrat omejena (Bouga in sod., 2011), so pa pokazali možnost uporabe COI markerja za razlikovanje lokalnih populacij nekaterih podvrst medonosne čebele (Syromyatnikov in sod., 2018). Ugotovili so, da se pri medonosni čebeli COI marker izkaže kot najboljši pokazatelj topologije filogenetskih odnosov v primerjavi z zaporedjem celotnega mitohondrijskega genoma pri populacijah linij C, A, O in M (Henriques et al., 2019). ND2 je uporaben pri razločevanju nekaterih populacij znotraj linije M, za linijo C podatkov še ni (Henriques et al., 2019).

Celokupno DNA smo ekstrahirali iz celotnih torakalnih delov matic, žrtvovanih v disekciji. Skupno smo pripravili 30 ekstraktov. Ti nam služijo za preliminarni test in optimizacijo metode. Čebele delavke posameznih matičarjev so vzorčene, glede na izbor kandidatnih matičarjev bodo rezultati spremljanja mitohondrijske linije znani v pred naslednjim potrjevanjem matičarjev.

Za ekstrakcijo DNA smo uporabili komercialni komplet QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Nemčija). Pri ekstrakciji smo sledili navodilom proizvajalca po protokolu za ekstrakcijo tkiva preko membrane s centrifugiranjem. DNA smo eluirali v 100 µL elucijskega pufra. Ekstrakte DNA smo shranili pri -20 °C.

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo uspešno pomnožili tri mitohondrijske markerje — zgoraj opisanega tRNA-Leu, ter COI in ND2. Osnovni volumen reakcije je bil 30 µL. Reakcijska mešanica je vsebovala 15 µL 2x mešanice DreamTaq MasterMix polimeraze (ThermoFischer Scientific, ZDA), po 0.4 µL 20 µM vsakega začetnega oligonukleotida, 2 µL izolirane DNA in 12,2 µL destilirane H₂O (Sigma, ZDA). Informacije o markerjih, nukleotidnih zaporedjih oligonukleotidnih začetnikov in nastavitve programa PCR smo povzeli po

literaturi (Garnerey in sod., 1993 (tRNA-Leu), Folmer in sod., 1994 (COI) in Arias in sod., 2008 (ND2)). 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. 2.

Tabela 2: Začetni oligonukleotidi, uporabljeni pri pomnoževanju specifičnih mitohondrijskih regij

IME MARKERJA	IME OLIGONUKLEOTIDNEGA ZAČETNIKA	ZAPOREDJE OD 5' PROTI 3' KONCU	VIR
TRNA-LEU	COI_3363F	GGCAGAATAAGTGCATTG	Gernerey in sod., 1993
	COI_3934R	CAATATCATTGATGACC	
COI	LCO 1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTG	Folmer in sod., 1994
	HCO 2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAT	
ND2	ND2F	TGATAAAAAGAAATATTTTGA	Arias in sod., 2008
	ND2R	GAATCTAATTAATAAAAAA	

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. Specifične fragmente smo pomnožili v cikličnem termostatu pri naslednjih pogojih:

MARKER	tRNA-Leu		COI		ND2	
Začetna denaturacija,	3 min	95 °C	4 min	95 °C	5 min	94 °C
3-stopenjsko pomnoževanje fragmentov (35 ciklov):						
Denaturacija	1 min	95 °C	1 min	95 °C	1 min	42 °C
Prileganje	1 min	50 °C	1 min	45 °C	1 min	42 °C
Podaljševanje	1 min	72 °C	2 min 30 s	72 °C	1 min	72 °C
Zaključno podaljševanje	5 min	72 °C	7 min	72 °C	10 min	72 °C

Uspešnost pomnoževanja nukleotidnega zaporedja smo preverili tako, da smo 5 µL pomnoženega produkta nanесли 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 nanесли v eno od jamic na gelu. PCR produkte 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 DNA zaporedij smo združili v programu Geneious v11.1.5. (<https://www.geneious.com>) in popravili morebitne napake v branju zaporedja. Nato smo urejena homologna zaporedja poravnali bodisi z dodatkom ClustalW (Thompson in sod. 1994) ali z dodatkom MAFFT v.7 (Katoh, 2013) z uporabo algoritma E-ins-i v programu Geneious. Vsako od poravnav smo skrbno pregledali za morebitne napake v branju. Kodirajoča zaporedja markerjev COI in ND2 smo prevedli v aminokislinska zaporedja in preverili, da ne vsebujejo stop-kodonov. Vsa zaporedja smo preverili s spletnim orodjem BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ali se po podobnosti ujemajo z že znanimi homolognimi zaporedji pri medonosni čebeli *Apis mellifera*.

Za določanje posameznih haplotipov na podlagi poravnanih homolognih zaporedij smo uporabili program DNAsp (DNA Sequence Polymorphism, v. 6.12.03 x64 (<http://www.ub.es/dnasp>)).

2.6 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC

Priprave na proučevanje vpliva prezimovanja čebeljih matic so obsegale vzpostavitev banke matic ter vzdrževanje nizkovolumskih plemenilčkov. V poskusu bomo uporabili matice istega matičarja, katerih del bomo shranili v ustrezno prirejenih brezmatičnih čebeljih družinah, ki bodo nameščene v zatemnjeni klimatizirani komori z temperaturo, ki bo preprečevala formiranje zimske gruče. Drugi del matic bomo prezimljali v nizkovolumskih plemenilnikih, ki bodo nameščeni pod različnimi temperaturnimi režimi. Družine bomo redno preverjali in po potrebi oskrbovali.



Slika 4. Organizacija banke matic.

2.7 PREVERBA KAKOVOSTI TEH ČEBELJIH MATIC

V spomladanskih mesecih 2021 bomo 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.

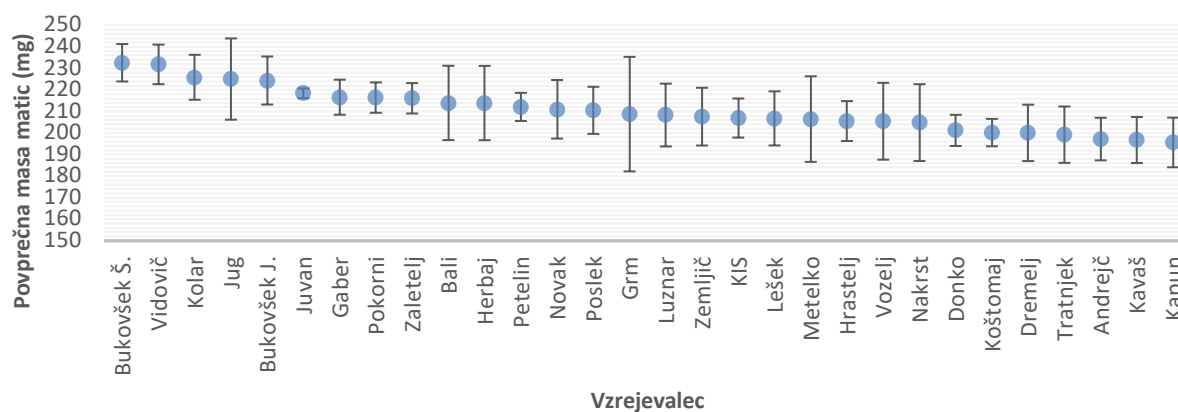
2.8 PROUČITEV EKONOMSKE ZANIMIVOSTI PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC

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 2020 smo pregledali cene čebeljih matic, kot jih ponujajo različni vzrejevalci in preprodajalci. Cene, ki smo jih zbrali, so vezane na Evropsko tržišče. V nadaljevanju bomo preverili povpraševanje po prezimljenih maticah.

3 REZULTATI

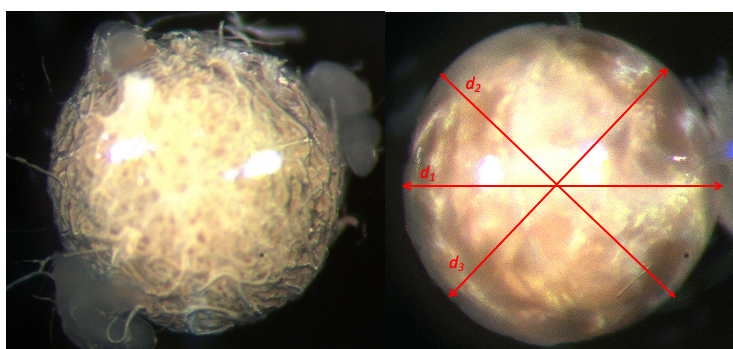
3.1 SPREMLJANJE MORFOLOŠKIH IN FIZIOLOŠKIH PARAMETROV ČEBELJIH MATIC

V 2020 je bilo vključenih v testiranje 180 matic. Po posameznem vzrejališču smo tehtali po pet matic in izračunali povprečne vrednosti po vzrejališču (Slika 5). Največja povprečna masa v letu 2020 je bila 232,62 mg in najmanjša 195,64 mg, povprečje pa je bilo pri $210,1 \pm 15,0$. 43 matic je imelo maso pod 200 mg. Na osmih vzrejališčih so imele vse matice maso, višjo od 200 mg.



Slika 5. Povprečna masa matic iz vzrejališč. Prvih sedem (Bukovšek Š - Gaber) je v prvem kvartilu.

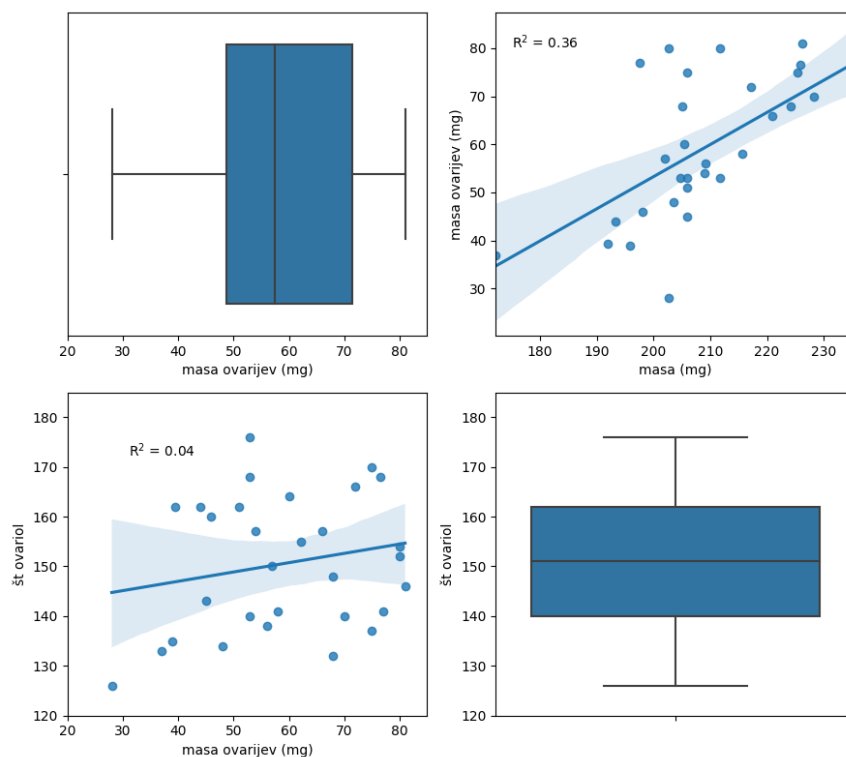
Na deležu vzorčene populacije smo z disekcijo abdomna odstranili ovarije, jih stehtali ter prešteli število ovariol. Povprečna masa ovarijev je bila 59 ± 15 mg, povprečno število ovariol pa $150,1 \pm 13,5$. Korelacija med eno in drugo spremenljivko je bila šibka, $R^2 = 0,04$; korelacija med maso matic in maso ovarijev pa $R^2 = 0,36$. Obe vrednosti ustrezata že objavljenim (Prešern & Smodiš Škerl, 2019; Slika 7).



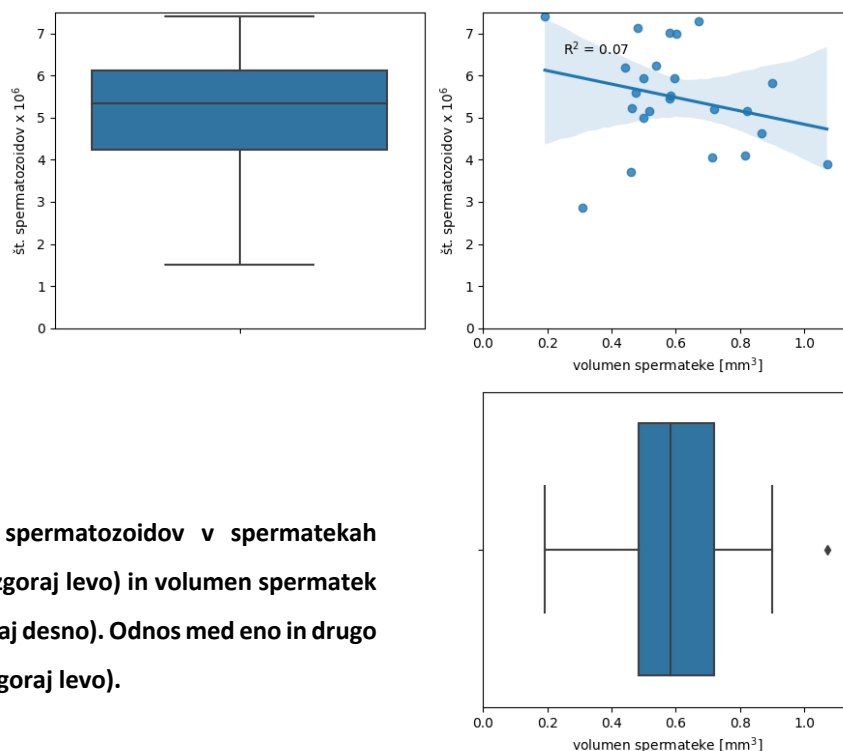
Slika 6. Spermateka s trahealno ovojnico (levo) in več meritev premera spermateke brez ovojnice (desno).

Nadalje smo vsaki matici odstranili spermateko, ter le-tej pod lupo odstranili trahealno ovojnico, izmerili njen premer s programom AxioVision ter izračunali povprečni volumen: $0,61 \pm 0,19$ mm³. Prešteli smo tudi spermatozoide v posamezni spermateki, število je $5,23 \times 10^6 \pm 1,46 \times 10^6$. Korelacija med eno in drugo količino

je bila zopet šibka, $R^2 = 0,07$ (Slika 8), in je podobna objavljenim (Prešern & Smodiš Škerl, 2019). Pri štirih maticah števila spermatozoidov ni bilo možno določiti zaradi poškodb spermateke med odstranjevanjem trahealne ovojnice.



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



Slika 8. Količina spermatozoidov v spermatekah podvzorca matic (zgoraj levo) in volumen spermatek taistih matic (spodaj desno). Odnos med eno in drugo količino je šibak (zgoraj levo).

3.2 DIAGNOSTIKA – PRISOTNOST SPOR *NOSEMA* SPP.

Rezultati pregleda iztrebkov na prisotnost spor *Nosema* spp. so predstavljeni v Tabela 3, iz katere je razvidna stopnja okuženosti čebeljih matic. Nosemo smo zaznali na štirih vzrejališčih in sicer v iztrebkih devetih matic. Ugotovili smo, da je bilo v letu 2020 s sporami okuženi 5 % matic. To je več kot v letih 2018 in 2019 in manj kot v letu 2016.

Tabela 3. Število pregledanih matic in pozitivnih na prisotnost spor *Nosema* spp. v primerjavi s prejšnjimi leti testiranja.

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

Pri spremljevalkah matic iz 5 vzrejališč, ki smo jih uporabili za disekcijo smo zaznali prisotnost spor *Nosema* spp. pri 23 vzorcih od 30.

3.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA

Najpriročnejša oblika dolgoročnega shranjevanja genskega materiala je krioprezervacija trotovskega semena. V letu 2020 smo za krioprezervacijo izbrali sestrške matice z rodovniškimi številkami 30622-2018, 30623-2018, 30624-2018 in 30625-2018, ki so potomke matere R510. Te matice so bile na plemenilni postaji Bohinj

nameščene v trotarjih, ki so bili na razpolago za praho vzrejevalcem čebeljih matic. Troti, potomci teh matic, so bili nabrani v kletke in njihovo seme zbrano na terenu (Slika 9). Zbrano je bilo približno 20 μ L semena, ki je bilo združeno ter shranjeno v zamrzovalno skrinjo na -80°C .



Slika 9. Zbiranje semena trotov na terenu za krioprezervacijo (levo). Postopek odzema semena (sredina). Seme po končani krioprezervaciji (desno).

3.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV

V letu 2020 je rezultate direktnega testiranja do datuma 20. 8. 2020 oddalo 21 vzrejevalcev (Tabela 4).

Tabela 4. Seznam vzrejevalcev, ki so v letu 2020 opravljali direktni test in so oddali rezultate do 20.8.2020.

Vzrejevalec	Čebeljak	Število testiranih družin	Vse ocene	Del ocen	Čistilna sposobnost
Andrej Zemljič	SI334080	20	20	-	da
Bojan Donko	SI328702	20	19	1	da
Boris Poslek	SI119841	20	-	20	da
Darko Grm	SI154525	20	20	-	da
Erik Kapun	SI179029	20	20	-	da
Henrik Zaletelj	SI291402	20	20	-	da
Irma Petelin	SI210322	20	20	-	da
Janez Dremelj	SI320748	20	20	-	da
Janko Bukovšek	SI119841	20	20	-	da
Jože Vidovič	SI338158	20	18	2	da
Jožef Andrejč	SI328698	20	20	-	da
Jožef Herbaj	SI206172	21	20	1	da
Jožef Tratnjek	SI218076	21	21	-	da
Ladislav Vozelj	SI154075	20	20	-	da
Marko Hrastelj	SI368640	20	20	-	da
Mitja Nakrst	SI351494	20	20	-	da
Štefan Bukovšek	SI324751	20	20	-	da
Tomaž Lesnjak	SI159487, SI354361	40	-	40	da
Vasja Jug	SI203524	20	20	-	da
Venčeslav Lešek	SI314028	20	20	-	da
Viktor Gaber	SI266129	20	20	-	da

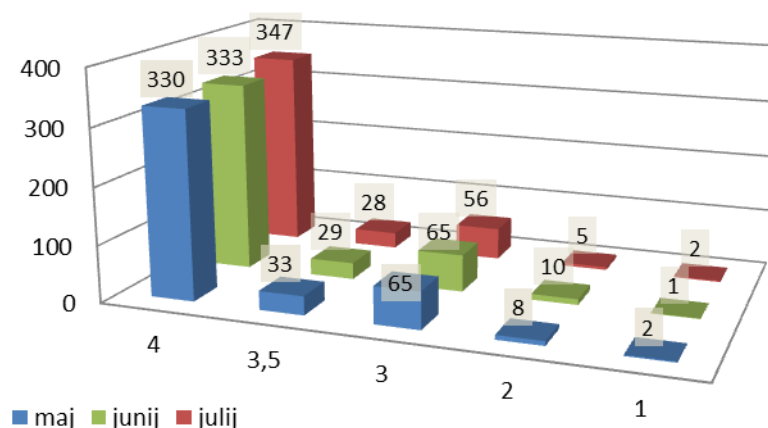
Družine v testu so čebelarji ocenjevali trikrat: v maju, juniju in juliju, v obdobju najpogostejših paš in hitrega razvoja čebeljih družin. V tem obdobju so ocenili tudi naravni odpad varoj in opravili standardni pin test za določanje čistilne sposobnosti. Ob koncu pašne sezone so stehali ali ocenili pridelek medu. V prvi fazi analize smo izračunali povprečne vrednosti posameznih ocen in meritev, ki jih prikazujemo v tabeli 6.

Tabela 5. Povprečne ocene posameznih ocen in meritev.

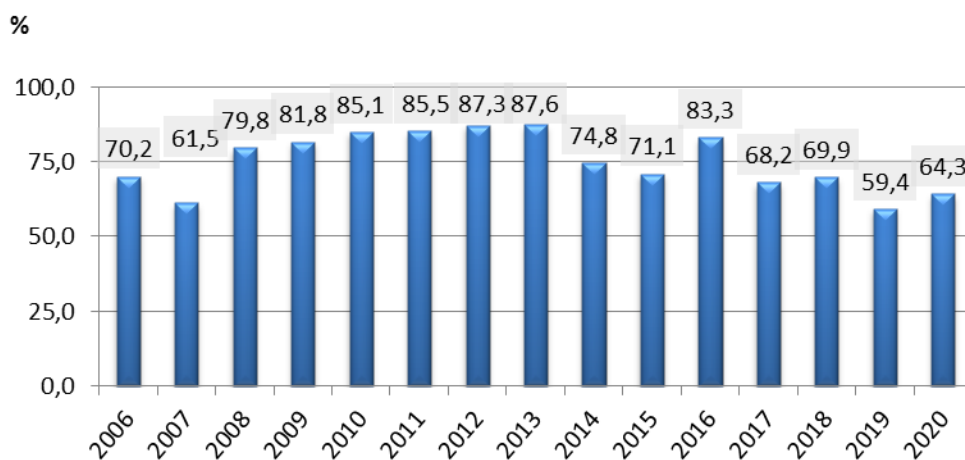
Lastnost	maj	junij	julij	N meritev
Obarvanost	3,76	3,76	3,79	442
Mirnost	3,39	3,29	3,48	442
Rojivost		3,24		442
Živalnost	3,4		3,42	442
Odpad varoj			5,92	402
Pridelek medu			13,8	441
Čistilna sposobnost			69,2	441

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 ostala podobna lanskemu letu, okoli 3,75. Po pričakovanju je delež obarvanih družin ob koncu sezone najvišji (Slika 10). Delež neobarvanih družin v letu 2020 je bil 64,3 % (Slika 11). 16 družin (3,7 %) je vsaj enkrat dobilo oceno 1 ali 2, kar pomeni, da bi matice teh družin morali zamenjati z bolj ustreznimi.



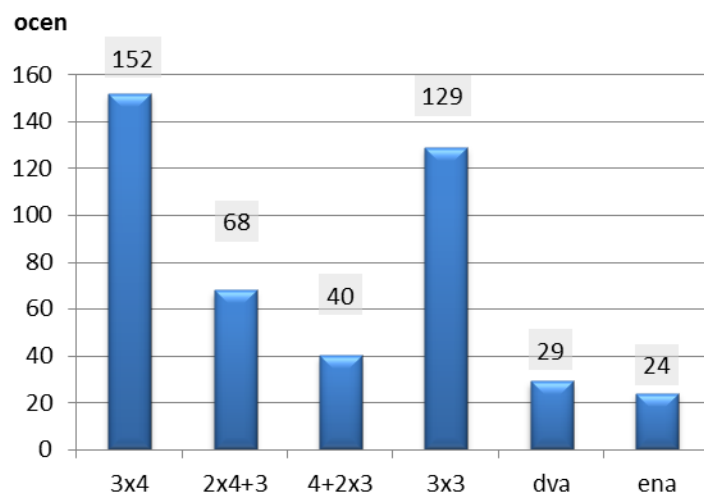
Slika 10. Pogostnost posameznih ocen obarvanosti v letu 2020.



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

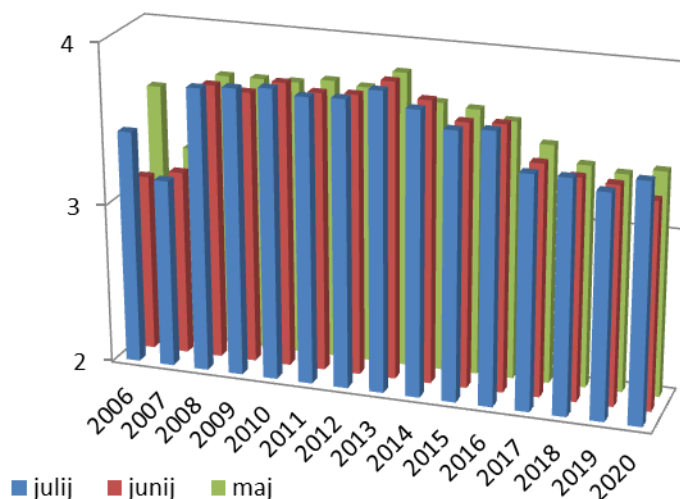
3.4.2 Mirnost ali obnašanje

Vsaka družina je bila trikrat ocenjena na mirnost: v maju 441, ter v juniju in juliju 442 družin. Povprečna ocena mirnosti v posameznih mesecih je prikazana v Tabela 5. Le okoli 34 % družin je vedno dobilo oceno 4. Oceno 2 ali manj je dobilo 53 družin ali 12,0 % (Slika 12). Testiranja zadnjih let prikazujejo trend zmanjševanja mirnosti čebeljih družin.



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

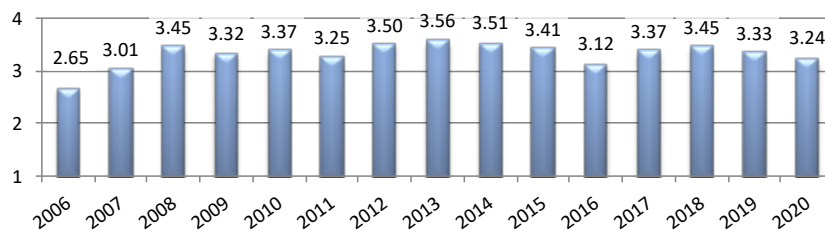
Testiranja zadnjih let prikazujejo trend zmanjševanja mirnosti čebeljih družin. Ta trend je zelo izrazit v zadnjih petih letih, z rahlim izboljšanjem v letu 2020 (Slika 13).



Slika 13. Mirnost po letih in mesecih.

3.4.3 Rojivost

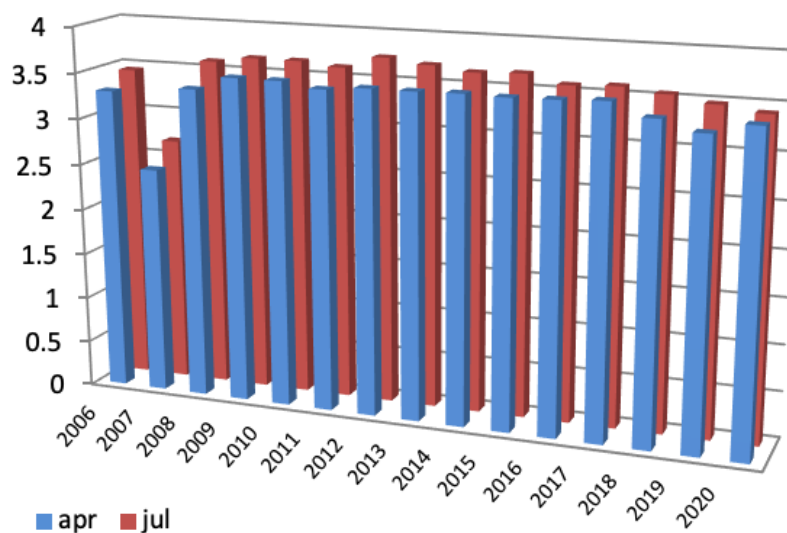
Ocenjevanje rojivosti se izvaja v juniju, v času najintenzivnejšega razvoja čebeljih družin. Ocenjenih je bilo 442 družin. Le 52,9 % družin ni poskusilo rojiti, pri 29,7 % so čebele same podrle matičnjake. V 11,1 % družin je čebelar s trudom preprečil rojenje in kar 6,1 % družin je izrojilo. Leto 2020 je eno bolj rojivih let (Slika 14).



Slika 14. Prikaz povprečne rojivosti po letih.

3.4.4 Živalnost

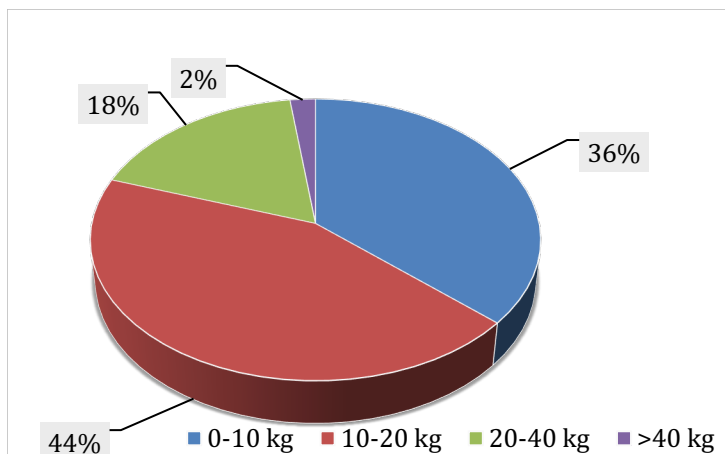
V maju in juliju je bilo ocenjenih 442 družin. Povprečna ocena v maju je bila 3,40 in v juliju 3,42 (Tabela 5). Majska povprečna ocena je pričakovano nižja od julijske, saj je takrat prisotnih več pašnih čebel (Slika 15).



Slika 15. Živalnost po mesecih in letih.

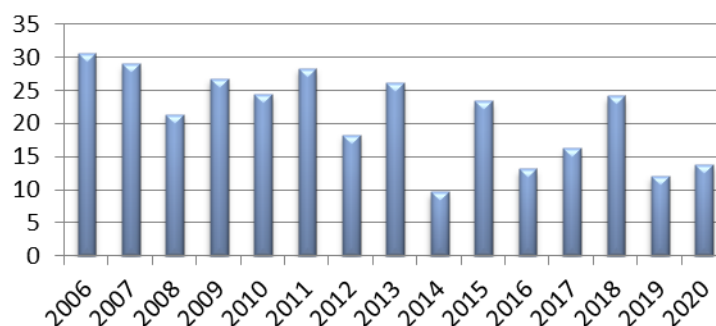
3.4.5 Donos medu

Skupni donosi medu v letu 2020 so bili med 3 in 50 kilogrami na panj. Skupno je bil donos medu izmerjen pri 441 družinah (Slika 16). Povprečni pridelek medu v letu 2020 je ponovno zelo nizek in sicer 13,8 kg na panj (Slika 17).



Slika 16. Delež posameznih kategorij pridelka medu v letu 2020.

Povprečni pridelek medu po letih (kg)



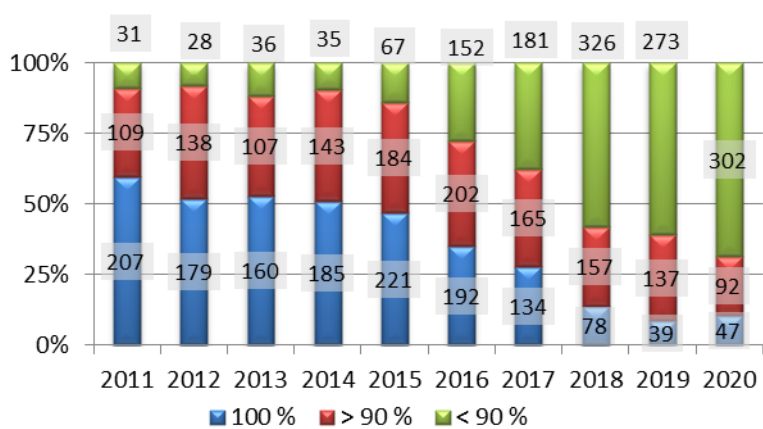
Slika 17. Povprečni pridelek medu po letih.

3.4.6 Odpad varoj in čistilna sposobnost

Naravni odpad varoj je bil izmerjen pri 402 družinah in se je gibal med 0 in 100 varojami povprečno na dan, v povprečju pa 5,92 pršice na družino na dan. Vzrejevalci pri 12,9 % družin sploh niso zabeležili naravnega odpada varoj. V letu 2020 je bila čistilna sposobnost pravilno izmerjena pri 441 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 0 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.



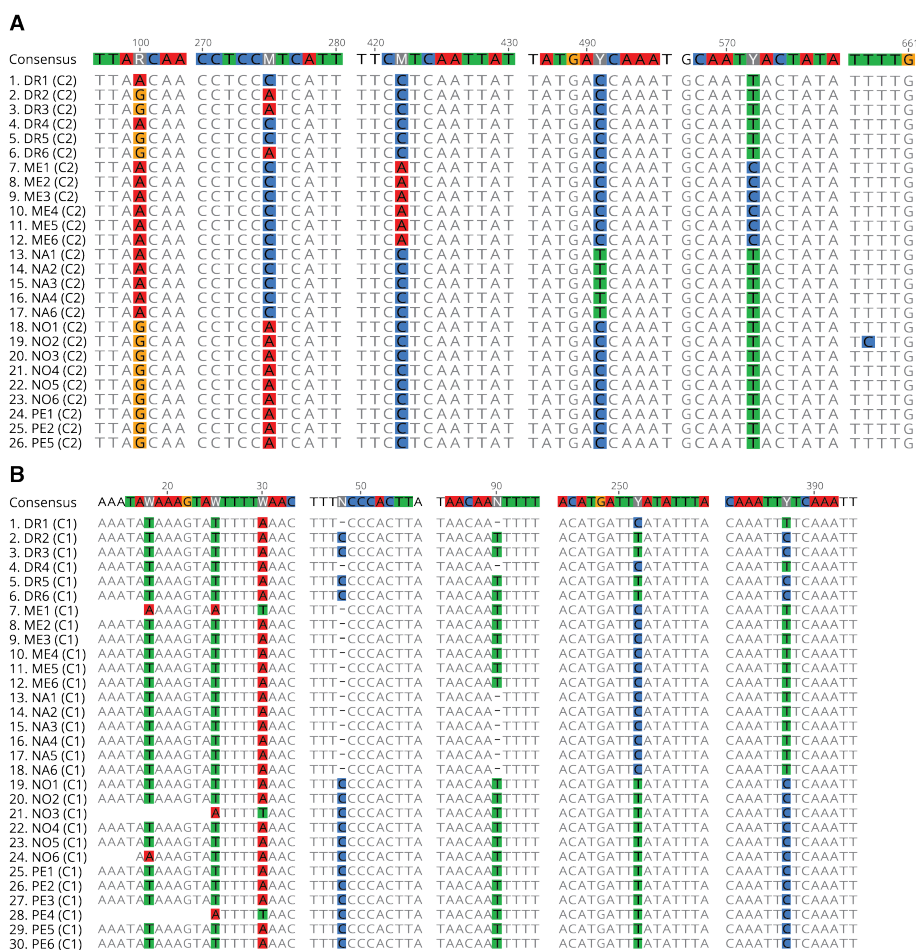
Slika 18. Ocenjevanje čistilne sposobnosti. Levo sat s petdeset prebodenimi celicami in desno sat po 10 urah.



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

3.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE

Z molekulske metode pomnoževanja specifičnih nukleotidnih zaporedij s polimerazo (PCR) smo uspešno pomnožili in prebrali nukleotidna zaporedja za 3 mitohondrijske odseke, ki predstavljajo 3 molekulske markerje, pri maticah, žrtvovanih v disekciji. Preizkus delovanja metode in optimizacija so prva stopnja v postavitvi metode spremljanja mitohondrijske linije na vzorcih čebel iz kandidatnih matičarjev.



Slika 20. Variabilna mesta, t.i. SNP-ji na mitohondrijskih odsekih DNA. COI regija je bila uspešno določena pri šestindvajsetih vzorcih (zgoraj), tRNA-Leu pa pri tridesetih vzorcih (spodaj).

Uspešno smo pridobili nukleotidna zaporedja za markerje tRNA-Leu (30 vzorcev), COI (26 vzorcev), ND2 (26 vzorcev). Poravnana nukleotidna zaporedja za vsak marker za vse uspešno testirane vzorce so prikazana na Slika 20. Z markerjem tRNA-Leu, ki je uveljavljen pokazatelj mitohondrijske linije, smo uspešno določili mitohondrijsko linijo pri vseh vzorcih. Vsi vzorci pripadajo mitohondrijski liniji C, kar je v skladu z standardnimi metodami uvrščanja podvrst medonosne čebele ter ne odstopajo od te temeljne genetske značilnosti, ki opisuje podvrsto kranjska čebela. S tem potrjujemo ustreznost preverjenih matic glede genetske osnove. Znotraj vzorcev smo določili 3 različne haplotipe pri markerju tRNA-Leu in 6 različnih haplotipov pri markerju

COI. Pri markerju ND2 smo med vzorci ločili 2 haplotipa, ki se razlikujeta na enem nukleotidnem mestu (pozicija na poravnavi 624 - A/T).

3.6 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC

Matice istega matičarja smo začasno shranili v banki, ki je primerna za skladiščenje matic v poletnih mesecih, preden se čebele stisnejo v zimsko gručo. V mesecu septembru bomo matice prestavili v družine, v katerih bodo preživele zimo.

3.7 PREVERBA KAKOVOSTI TEH ČEBELJIH MATIC

V letih 2021 in 2022 bomo spremljali kakovost prezimljenih matic preko klasičnih parametrov: sprejetost v družine, površina in tip zalege, mirnost ter donos.

3.8 EKONOMSKA ZANIMIVOST PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC

Rezervne matice so pomembne zlasti v zgodnjem spomladanskem obdobju, ko družine postanejo zopet aktivne in čebelar pri pregledu odkrije morebitno izgubo matice. Na slovenskem tržišču se prve matice v sezoni običajno pojavijo v prvi polovici maja, zato so prezimljene matice pomembne v smislu premostitve izgube, da ne pride do propada gospodarske družine (10 ali več satov), katere vrednost na tržišču lahko spomladi presega 125€. Prezimovanje čebeljih matic je v grobem implementirano v dveh različnih konceptih:

1. Prezimovanje matic v rezervnih družinah
2. Prezimovanje matic v namenskih družinah, ki služijo kot banka matic in v njih prezimuje več matic

Ad 1) Rezervne družine so namenjene nadomeščanju propadlih preko zime oz. prodaji, če čebelar nima potrebe po njih. Pri sanaciji brezmatične družine čebelarji prestavijo matico, preostalo zalego in čebele pa porabijo za ojačitev drugih družin. Alternativno, nekateri ometejo brezmatično družino, jo nadomestijo z rezervno v istem panju in pustijo, da se ometene čebele »uletijo« nazaj. Cena rezervne družine na sedmih satih na trgu v Sloveniji je v povprečju 85 €.

Ad 2) Tehnični aspekt vzpostavitve zimske banke matic je bil preučevan s strani Wyborna s sod. (1993), Shehate (1982), novejša raziskava pa so bile opravljene ravno tako s strani kanadskih raziskovalcev (Rosseau et al, 2019). Sama zimska banka matic omogoča prezimovanje več matic v eni sami družini; pri tem so raziskovalci uporabili 40 – 80 matic. Poroča se izplen 60 – 80 % matic v pomladanskem času, pri tem pa je uspešnost sprejema ravno tako v razponu 60 – 80 %: izplen je v razponu med 14 in 51 matic, za ceno ene

gospodarske družine (~125 € v RS). Ta način zahteva poleg družin tudi tehnične prilagoditve: temen prostor s stalno temperaturo ~15°C z urejenim zračenjem, kar pa ni na razpolago v vsakem vzrejališču.

Razpon cen prezimljenih gospodarskih matic je med 70 in 90 €. Cene prezimljenih čebeljih matic so na domačem tržišču trenutno podobne cenam rezervnih čebeljih družin, kar je nekako smiselno, saj je za pridobitev ene čebelje matice pred vzrejno sezono potrebno razdreti eno čebeljo družino. Prezimljene rodovniške matice imajo ceno med 120 in 290 € na domačem tržišču. Na tujem tržišču je cena prezimljenih gospodarskih matic podobna, med 45 in 100 €, cena prezimljenih rodovniških pa v povprečju okoli 160 € (Švica, Nemčija, Velika Britanija). Prezimovanje matic v bankah lahko v ekonomskem smislu imelo dva pozitivna učinka:

- Znižanje tržne cene na enoto (matico) zaradi nižjih stroškov prezimovanja, kar bi bilo ugodno predvsem za čebelarje.
- Zvišanje dobička na enoto (matico) ob nespremenjenih tržnih cenah prezimljenih matic, kar bi bilo ugodno predvsem za vzrejevalce matic.

4 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Matice so ključna komponentna čebelje družine; družine z maticami slabše kvalitete so šibkejše in zato (tudi) z ekonomskega stališča problematične. V letu 2020 je bila povprečna masa matic v primerjavi z letom 2019 podobna ($210,1 \pm 15,0$ vs. $214,1 \pm 18,7$). Na deležu matic, ki je bil podvržen disekciji, ni bilo presenečenj, kar se tiče morfoloških in drugih izmerkrov: odnos med št. ovariol in maso ovarijev ter med maso matic in maso ovarijev je bil pričakovan in znotraj že objavljenih rezultatov. Ravno tako so bile matice ustrezno sprašene: le dve matici sta imeli manj kot 3 milijone spermatozoidov.

Diagnostika je pokazala prisotnost spor v devetih od stoosemdesetih testiranih matic, kar je več kot lani in predlani in pa manj kot v letu 2016. *Nosema* pri maticah je lahko naznanitelj dolgoročnih problemov, saj imajo okužene matice 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 težave z nosemozo v plemenilčkih, saj se s sporami *Nosema* spp. okužijo le odrasle čebele (White, 1919; Bailey, 1955).

Genski material trotarjev iz letošnjega leta je seveda pomemben, saj definira genetski material približno tridesetih rodovniških matic, sprašenih na plemenilni postaji Bohinj.

V letu 2020 so, tako kot prejšnja leta, vzrejevalci testirali kandidatne matičarje. Rezultati testiranja naj bi bili orientacija za odbiro kandidatnih matičarjev za leto 2021. Do datuma je v analizo oddalo rezultate enaindvajset vzrejevalcev čebeljih matic. Delež družin, ki se ne »kvalificirajo« za odbiro, se je v letošnjem letu zmanjšal za slabih pet odstotkov. Pričakujemo, da bodo vzrejevalci te matice zamenjali. 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. Rojivost v letu je soodvisna od vremenskih razmer, zato rahlo niha, kar je opazno na samem grafu. Trend upadanja donosa medu je v direktnem testiranju opazen 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. Ocenjevanje čistilne sposobnosti se je v letih 2017 – 2020 močno popravilo. Precej manj družin je ocenjenih s 100%, kar kaže, da več vzrejevalcev test izvaja pravilno.

Z mitohondrijskimi markerji smo opravili preliminarni test spremljanja mitohondrijske linije. Pokazali smo, da vsi testirani vzorci pripadajo ustreznim mt liniji – to je linija C, kamor poleg kranjske čebele spadajo tudi nekatere druge evropske podvrste medonosne čebele. V študiji iz leta 2009 je bilo odkrili 9 haplotipov mitohondrijskega fragmenta tRNA-Leu v vzrejališčih matic kranjske čebele v Sloveniji (Franck in sod., 2000; Sušnik in sod., 2004; Božič in sod., 2016). Poleg znanih haplotipov so tedaj odkrili 4 nove, še ne objavljene haplotipe. V kasnejši sistematični študiji mtDNA haplotipov v Sloveniji so pokazali prisotnost 17 haplotipov, med njimi 10 novih haplotipov. Naši preliminarni rezultati na 30 vzorcih so pokazali prisotnost 3 haplotipov mitohondrijskega

fragmenta tRNA-Leu; C2e (Munoz in sod., 2012), C1a (ta haplotip spada med pogosto zastopane haplotipe v populaciji kranjske čebele v Sloveniji; Božič in sod., 2016) ter C2d. Novih haplotipov nismo zaznali, kar glede na to, da smo vzorčili zgolj majhen delež populacije, ni nenavadno. Pričakujemo, da bo razširjeno vzorčenje prikazalo večje število haplotipov mitohondrijskega fragmenta tRNA-Leu. Spremljanje mitohondrijske linije je smiselno iz vidika ohranjanja čistosti kranjske čebele v Sloveniji kot tudi za spremljanje variabilnosti znotraj genskega sklada, pomembno pa lahko prispeva tudi k preverjanju skladnosti vzorcev po maternalni liniji. Markerja COI in ND2 sta bila pri kranjski čebeli v Sloveniji uporabljena prvič. 6 različnih haplotipov pri mitohondrijskem fragmentu COI kaže na to, da bi ta marker lahko bil primeren za določanje strukturiranosti populacij znotraj Slovenije. Pri markerju ND2 smo med vzorci ločili 2 haplotipa, kar kaže na nizko variabilnost v tem segmentu mitohondrialne DNA pri kranjski čebeli v Sloveniji. Ta enotnost pa ne izključuje možnosti, da bi ND2 fragment bil uporaben za ločitev slovenske populacije od tujih populacij. Za potrditev bodo potrebne dodatne raziskave na večjem deležu populacije.

Prezimovanje čebeljih matic je ekonomsko zanimivo predvsem v spomladanskem času, pred prvo serijo v istem letu vzrejenih matic. Prezimovanje matic v specializiranih bankah pa je verjetno finančno nedosegljivo za povprečnega vzrejevalca zaradi potrebe po temni komori z uravnavanjem temperature.

5 SPLOŠNE UGOTOVITVE

Na splošno lahko ugotavljamo, da je vsako letno spremljanje populacije, ki kandidira za nadaljnjo odbiro, izrednega pomena. Ravno tako zbiranje podatkov o maticah, ki jih vzrejevalci postavijo na tržišče, saj nam leto pomembno dopolni sliko, kaj se dogaja s slovensko populacijo kranjske sivke. Ne nazadnje so te ugotovitve lahko tudi vzpodbuda vzrejevalcem čebeljih matic.

6 VIRI

Arias, M.C., Silvestre, D., Francisco, F.d.O. et al. An oligonucleotide primer set for PCR amplification of the complete honey bee mitochondrial genome. *Apidologie* 39, 475–480 (2008).

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

Bouga M, Alaux C, Bienkowska M, Büchler R, Carreck N, et al. 2011. A review for discrimination of honey bee populations as applied to European beekeeping. *J Api Res*, 50: 51 – 84.

Božič J, Kordiš D, Križaj I, Leonardi A, Močnik R, Nakrst M, Podgoršek P et al. 2016. Novel aspects in characterisation of Carniolan honey bee. *Acta Agriculturae Slovenica, Supp 5*. 18 – 27.

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>

Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson D, Locke B, Delaplane KS, Wauquiez Q, Tannahill C, Ellis JD. 2013. Standard methods for varroa research. V: Dietemann V., Ellis J.D., Neumann P. The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. *J Apic Res* 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>

Franck P, Koeniger N, Lahner G, Crewe RM, Solignac M. 2000. Evolution of extreme polyandry: an estimate of mating frequency in two African honeybee subspecies, *Apis mellifera monticola* and *A. m. scutellata*. *Ins Soc*, 47: 364 – 370.

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

Gramacho KP, Gonçalves LS. 1994. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração de crias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. V: Congresso Latinoiberoamericano de Apicultura 4: 45 str.

Güler A in Toy H. 2013. Relationship between dead pupa removal and season and productivity of honey bee (*Apis mellifera*, Hymenoptera: Apidae) colonies. *Turk J Vet Anim Sci*, 37: 462 –467.

Kanbar G in Engels W. 2003. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by *Varroa* mites. *Parasitol Res*, 90(5): 349 – 354.

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

Kozmus et al. (2018), Rejski program za kranjsko čebelo (2018-2023) : (*Apis mellifera carnica*, Pollmann 1879), Kmetijski inštitut Slovenije.

Liu Q-H, Zhang S-C, Li Z-J, Gao C-R. 2009. Characterization of a pattern recognition molecule vitellogenin from carp (*Cyprinus carpio*). *Immunobiology* 214, 257–267.

Muñoz, I., Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., & De la Rúa, P. (2012). Genetic variation of *Apis mellifera* from Serbia inferred from mitochondrial analysis, *Journal of Apicultural Science*, 56(1), 59-69. doi: <https://doi.org/10.2478/v10289-012-0007-9>

Murilhas AM. 2002. Varroa destructor infestation impact on *Apis mellifera carnica* capped worker brood production, bee population and honey storage in Mediterranean climate. *Apidologie*, 33(3): 271 – 281.

Newton DC in Ostasiewski NJ. 1986. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood. *Am Bee J*, 126: 278 – 281.

Panskiuk B, Skowronek W in Gerula D. 2009. Effect of period of the season and environmental conditions on rate of cleaning cells with dead brood. *J Api Sci*, 53 (1): 95 – 103.

Prešern J, Smodiš Škerl MI. 2019. Parameters influencing queen body mass and their importance as determined by machine learning in honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie*, 5(50): 745 – 757.

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Sys Biol*, 61: 539 – 542.

Rosseau A. 2019. Mass storage of honey bee queens overwintered at different temperatures in Canada. *Apimondia*, Montreal.

Shehata SM. 1982. Long-Term Storage of Queen Honeybees in Isolation. *J Api Res*, 21: 11 – 18.

Sušnik S, Kozmus P, Poklukar J, Meglič V. 2004. Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia. *Apidologie*, 35: 623 – 636.

Syromyatnikov M, Borodachev A, Kokina A, Popov V. 2018. A Molecular Method for the Identification of Honey Bee Subspecies Used by Beekeepers in Russia. *Insects*, 9, 10.

Uzunov A, Costa C, Panasiuk B, Meixner M, Kryger P in drugi. 2014. Swarming, defensive and hygienic behaviour in honey bee colonies of different genetic origin in pan-European experiment. *J Api Res*, 53 (2): 248 – 260.

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

Wyborn MH, Winston ML, Laflamme PH. 1993. Mass storage of honeybee (Hymenoptera: Apidae) queens during the winter. *The Canadian Entomologist*, 125: 113 –128.

Žvokelj L. 2013. Razvojne lastnosti matic kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*) v različnih pogojih vzreje. Doktorska disertacija.

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 dvakrat na leto, v aprilu 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).

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> <p>ČS = ((NC – PCO) / 50) * 100 %</p> <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> <p>ČS = ((NC - PCO) / 100) * 100 %</p> <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 izraženost te lastnosti.

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

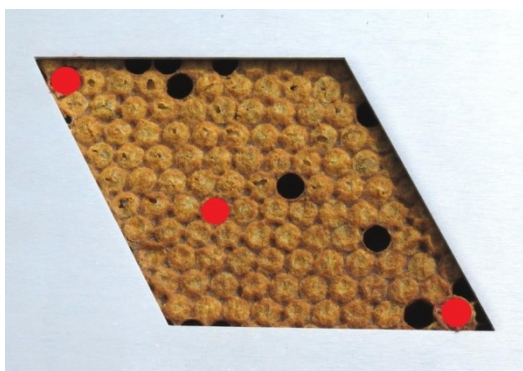
V evidenčni list se vpiše rezultate vsaj enega opravljenega PIN-testa in datum izvedbe testa. Priložiti je potrebno označene fotografije s šablono pred in po prebadanju. Pripišite podatek, po koliko urah ste opravili drugi pregled.



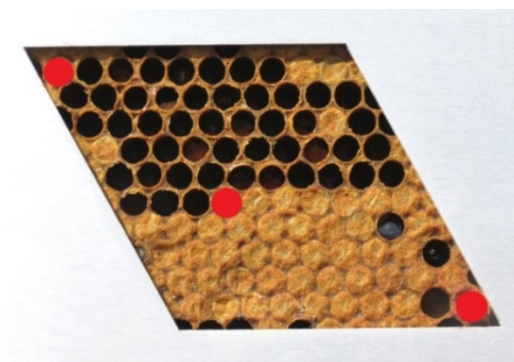
Slika 1. Primerna starost zalege je okrog 17 dni, to je stadij bube z rožnatimi do rdečimi očmi.



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.

