

Oddelek za živinorejo

Čebelarstvo

Hacquetova ulica 17

SI-1001 Ljubljana

Slovenija

T: 01 280 51 74

F: 01 280 52 55

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

Programsko obdobje 2020 – 2022

Poročilo o izvedenih nalogah v letu 2021

Vodja naloge:

dr. Ajda Moškrič

Poročilo pripravili:

dr. Ajda Moškrič

dr. Janez Prešern

dr. Maja Ivana Smodiš Škerl

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.....	5
2.1.2 Merjenje premera spermateke in računanje volumna	5
2.1.3 Štetje spermatozoidov v spermateki čebelje matice z uporabo hemocitometra	6
2.2 DIAGNOSTIKA - PRISOTNOST SPOR NOSEMA SPP.	7
2.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA	7
2.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV.....	7
2.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE.....	7
2.6 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC.....	9
2.6.1 Preverba kakovosti teh čebeljih matic	10
2.6.2 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 NOSEMA SPP.....	13
3.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA	13
3.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV.....	14
3.4.1 Rasne karakteristike – obarvanost obročkov zadka.....	15
3.4.2 Mirnost ali obnašanje	16
3.4.3 Rojivost.....	17
3.4.4 Živalnost	17
3.4.5 Donos medu.....	18
3.4.6 Odpad varoj in čistilna sposobnost.....	18
3.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE.....	20
3.6 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC.....	22
3.6.1 Priprava za ponovitev poizkusa prezimovanja v banki matic in preverba kakovosti uspešno prezimljenih čebeljih matic.....	23
3.6.2 Ekonomska zanimivost prezimovanja čebeljih matic	23
4 INTERPRETACIJA REZULTATOV	25
5 SPLOŠNE UGOTOVITVE	26
6 VIRI	27
PRILOGA 1: DIREKTNO TESTIRANJE ČEBELJIH DRUŽIN.....	1

POVZETEK

V raziskavi smo v obdobju od 1. 8. 2020 do 31. 7. 2021 spremljali kakovost vzreje matic kranjske čebele ter proučevali možnosti ohranjanja matic čez zimo. Matice izhajajo iz selekcioniranih matičarjev. Skupno smo vzorčili in analizirali 180 matic iz 30 vzrejališč. Izvedli smo morfološko analizo, pregledali iztrebke matic na prisotnost spor *Nosema* spp., pri deležu vzorčene populacije pa smo z disekcijo določili tudi maso ovarijev, število ovariol, izmerili premer in izračunali volumen spermateke ter določili število spermatozoidov v spermateki. Pri pregledovanju spermatozoidov pod mikroskopom smo ovrednotili delež živih spermatozoidov.

Pri kandidatnih matičarjih smo z molekularnimi tehnikami preverili pripadnost mitohondrijski liniji C ter ovrednotili variabilnost odbranih vzorcev na podlagi dveh mitohondrijskih lokusov (tRNA-Leu in COI). Variabilnost v nukleotidnih zaporedjih in filogenetske odnose kandidatnih matičarjev smo prikazali z deležem prisotnih haplotipov v posamezni statistični regiji in s prikazom v obliki haplotipskih mrež.

Trotovsko seme potomcev matic vzrejališča Kmetijskega inštituta 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 27. 7. 2021.

V okviru proučevanja možnosti ohranjanja matic čez zimo smo ovrednotili uspeh pri vzpostavitvi banke matic v poizkusu, ki je bil izveden pozimi 2020/2021. Na podlagi rezultatov in recentnih znanstvenih študij na področju prezimovanja matic v banki načrtujemo prilagojene parametre preizkusa prezimovanja matic v banki pozimi 2021/2022. Opravili smo pregled aktualnega tržišča, ter naredili osnovno kalkulacijo cene prezimovanja za leto 2021 ter ocenili ekonomičnosti prezimovanja.

1 UVOD

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

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

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

Vzrejevalci čebeljih matic nas pogosto seznanjajo s povpraševanjem po prezimljenih maticah, zlasti v poznih zimskih in zgodnjih spomladanskih mesecih, torej v obdobju, ko so čebelje družine že aktivne, vzreja matic pa se še ni začela. Najpogostejši način prezimovanja matic je v rezervnih družinah, vendar tak način za vzrejevalca lahko predstavlja znaten strošek. V porastu so znanstvene raziskave, ki proučujejo uspešno vzpostavitev zimske banke matic in kakovost teh matic po prezimitvi. Ocenjujemo, da bi bil tak način prezimovanja ekonomsko ugodnejši, saj bi v eni družini lahko prezimovalo več matic naenkrat.

V okviru naše raziskave smo spremljali kakovost matic s fiziološkimi in morfološkimi meritvami, izvedli diagnostiko, dolgoročno shranili trotovsko seme visoko kvalitetnih matic, obdelali podatke zbrane v okviru direktnega testiranja vzrejevalcev ter spremljali mitohondrijsko linijo na vzorcih čebel iz kandidatnih matičarjev. Proučevali smo možnost ohranjanja čebeljih matic čez zimo s tem da smo izvedli poizkus prezimovanja večjega števila matic v banki matic pri stalni temperaturi ter v plemenilnikih pod različnimi temperaturnimi režimi. Ocenili smo ekonomsko sprejemljivost vzpostavitve banke za prezimovanje matic za vzrejevalce.

2 METODE DELA

2.1 SPREMLJANJE ČEBELJIH MATIC S FIZIOLOŠKIMI IN MORFOLOŠKIMI MERITVAMI

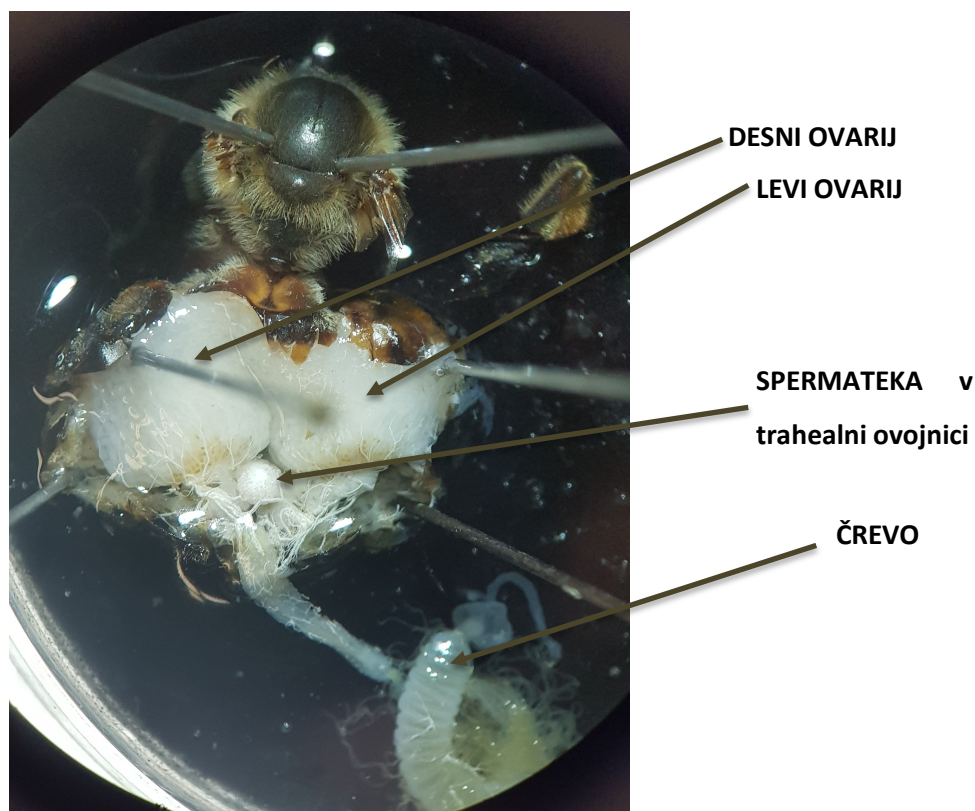
Preglednica 1: Pregled vzrejevalcev v letu 2021

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 Ljubecna
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	Kmetijski inštitut Slovenije	Hacquetova ulica 17	1000 Ljubljana
16	Kolar Peter	Doklece 3	2323 Ptujška Gora
17	Koštomaj Matija	Paridol 15	3224 Dobje pri Planini
18	Lesnjak Tomaž	Mali Vrh 59	3327 Šmartno ob Paki
19	Lešek Venčeslav	Olešče 28	3270 Laško
20	Luznar Henrik	Begunje 170	4275 Begunje na Gorenjskem
21	Metelko Miha	Studenec 23a	8293 Studenec
22	Nakrst Mitja	Žeje 30	1233 Dob
23	Novak Miha	Zg. Slivnica 17	1293 Šmarje-Sap
24	Petelin Irma	Pliskovica 102	6221 Dutovlje
25	Pokorni Julij	Gačnik 3	2211 Pesnica
26	Poslek Boris	Mariborska 45	2314 Zgornja Polskava
27	Vidovič Jože	Apače 300	2324 Lovrenc na Dr. Polju
28	Vozelj Ladislav	Dragovšek 18	1275 Šmartno pri Litiji
29	Zaletelj Henrik	Fužina 59	1303 Zagradec
30	Zemljič Andrej	Boračeva	9252 Radenci

V letu 2021 smo pregledali 180 matic iz tridesetih odobrenih vzrejališč gospodarskih matic (Preglednica 1). Matice so izvirale iz vzrejališč iz 11 statističnih regij v Sloveniji: gorenjske, goriške, JV Slovenije, koroške, osrednjeslovenske, podravske, primorsko-notranjske, pomurske, posavske, savinjske in zasavske regije. Zabeležili smo podatke na matičnicah (rodovniška številka, številka matice), vrsto matičnice in število čebel spremljevalk. Zabeležili smo tudi morebitne poškodbe matic. Po pet matic iz vsakega vzrejališča smo uspravili

z ogljikovim dioksidom (CO₂) skupaj s spremljevalkami; vsako matico smo stehali z analitsko tehtnico (Mettler Toledo). Po tehtanju smo matico preložili v sterilno plastično petrijevko in počakali, da se iztrebi. Iztrebek smo redčili v 200 µL sterilne destilirane vode in shranili na -20°C do nadaljnje obdelave. Iztrebek smo kasneje pregledali na prisotnost spor mikrosporidija *Nosema* spp., del iztrebka pa smo shranili za molekularne analize.

Dodatno smo na vzorcu tridesetih matic s treh vzrejališč opravili še disekcijo. Matice smo pred sekcijo najprej uspavali s CO₂, jih stehali ter vzorčili iztrebek (kot je opisano v prejšnjem odstavku). Nato smo jih ponovno uspavali s CO₂ in izvedli sekcijo (Slika 1). Odstranili in stehali smo ovarije ter prešteli število ovariol v enem ovariju. Odstranili smo spermateko, s pomočjo stereomikroskopa odstranili ovoj iz trahej ter izvedli po 4 meritve premera vsake spermateke. Na podlagi teh meritev smo izračunali volumen spermateke. Po merjenju smo ocenili število spermatozoidov, ki so bili prisotni v spermateki. Ocenili smo tudi delež živih spermatozoidov v vzorcu. Za kasnejše analize smo shranili tudi preparat črevesa vsake od matic v disekciji. Po eno nogo vsake matice smo shranili za ekstrakcijo DNA in določanje mitohondrijske linije z molekularno metodo PCR.



Slika 1. Matica v sekciji, pred odstranjevanjem črevesa, ovarijev in spermateke.

2.1.1 Tehtanje ovarijev in štetje ovariol

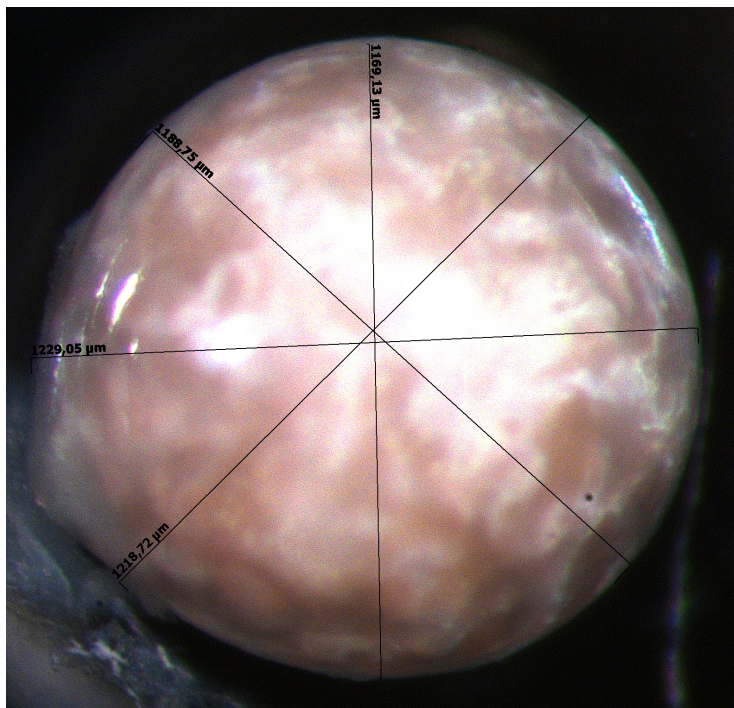
Odstranjena ovarija smo skupaj stekali z analitsko tehtnico (Mettler Toledo). Po tehtanju smo ovarije fiksirali v 1 ml 10 % raztopini formalina in shranili na 4°C do štetja. Število ovariol smo določili s štetjem posameznih ovariol pod lupo ter izračunali povprečno št. ovariol.

2.1.2 Merjenje premera spermateke in računanje volumna

Pod svetlobnim mikroskopom smo pri vsaki spermateki na objektnem stekelcu najprej s pomočjo pincete odstranili ovoj iz trahej. Nato smo spermateko slikali in izmerili po 4 premere (Slika 2; d), ki smo jih potem izpovprečili ($\bar{d}$). Na podlagi povprečnega premera smo izračunali volumen spermateke (Enačba 1).

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

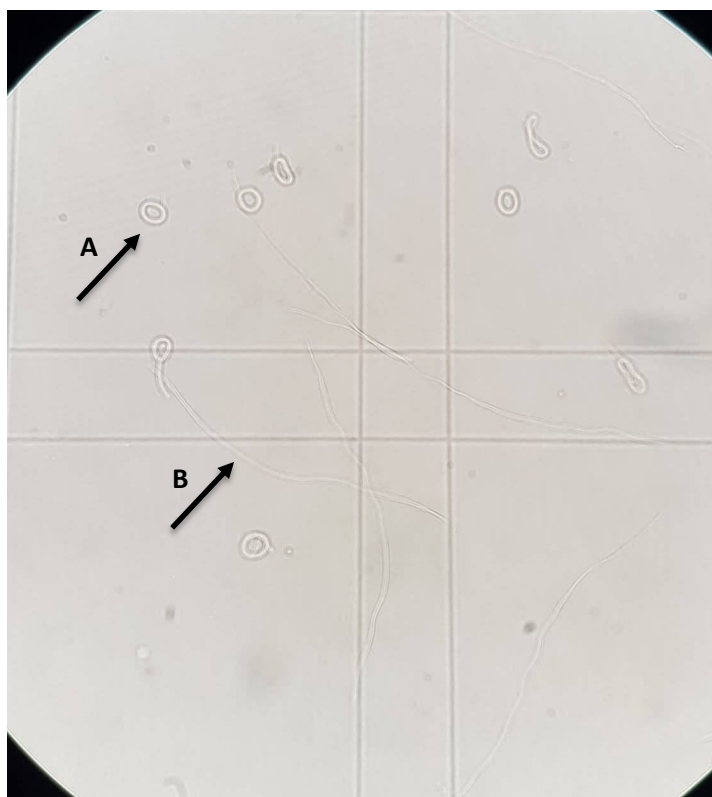
Enačba 1. Izračun volumna



Slika 2. Merjenje premera spermateke.

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 fiziološke raztopine. Počakali smo 5 min, da se semenčice enakomerno razporedijo v raztopini, nato smo dodali 950 µL destilirane vode. Semenčice, ki so žive, se v prisotnosti destilirane vode zvijejo zaradi nabrekanja repkov (Nur in sod., 2011). Tako tretirane spermatozoide smo inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi, nato smo dodali 4 mL fiksirnega sredstva (sestava: 0,6 g 1M NaHCO₃, 2 ml formaldehida, destilirana voda do 200 ml). Tako pripravljene vzorce smo shranili na 4°C do štetja spermatozoidov. Vzorec smo pred nanosom na Bürker – Türkov hemocitometer rahlo pretresli, da so se spermatozoidi enakomerno razporedili. Nato smo s pipeto nanesli kapljico suspenzije v »V« utor hemocitometra ob robu krovnega stekelca in napolnili površino kamrice brez preplavljanja. Pred štetjem smo nekaj minut počakali, da so se spermatozoidi umirili na dnu. Spermatozoide smo prešteli pod svetlobnim mikroskopom v 80 kvadratkih na mreži hemocitometra pri 400 x povečavi. Da bi ocenili delež živih spermatozoidov, smo naknadno pri vsakem vzorcu prešteli po 200 spermatozoidov in na podlagi oblike sklepali, ali so bili spermatozoidi pred fiksacijo živi ali mrtvi. Živi spermatozoidi se po dodatku destilirane vode zvijejo, mrtvi pa ostanejo iztegnjeni (Harizanis, 1983; Nur in sod., 2011; Fuse in sod., 1993). Iz števila prešteti spermatozoidov smo izračunali delež živih spermatozoidov v spermateki.



Slika 3. Ocena deleža živih spermatozoidov v spermateki. A – zviti spermatozoid, B – iztegnjen spermatozoid. 400x povečava.

2.2 DIAGNOSTIKA - PRISOTNOST SPOR NOSEMA SPP.

Število spor *Nosema* spp. smo določali z mikroskopsko preiskavo vzorcev iztrebkov matic. Za prisotnost spor *Nosema* spp. smo pregledali skupno 179 vzorcev iztrebkov. Pri maticah, ki smo jih uporabili v disekciji, smo za prisotnost spor pregledali poleg vzorcev iztrebkov tudi 30 vzorcev homogeniziranih zadkov čebel spremljevalk ter 30 preparatov črevesa teh matic. Vse vzorce smo v suspenziji pregledali pod svetlobnim mikroskopom na hemocitometru Bürker – Türk. Pri pojavu spor v vzorcu smo upoštevali vse spore v 400 poljih hemocitometra.

2.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA

Dolgoročno shranjevanje genskega materiala kakovostnih matic smo izvedli sodelavci Kmetijskega inštituta Slovenije. S sterilno tehniko smo odvzeli seme trotom, potomcem odbranih matic. 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 2021 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 2021 je rezultate testiranja do vključno 28. 7. 2021 oddalo 20 vzrejevalcev s 404 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 2021 vpisane v rodovniško knjigo. Na podlagi pravilno izvedenega direktnega testa bomo pridali tudi potrdilo o pravilni izvedbi direktnega testa. Splošne rezultate direktnega testiranja podajamo v poglavju 3.4 tega poročila.

2.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE

Mitohondrijsko linijo smo določili genetsko z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) s pomnoževanjem specifičnega mitohondrijskega fragmenta, ki je uporaben kot napovedovalec pripadnosti linijam C, M, A ali O. Fragment intergenske regije t-RNA^{Leu} – Cox2 (v nadaljevanju tRNA-Leu) je najbolj široko uporabljen mitohondrijski označevalec za razlikovanje med linijami in nekaterimi podvrstami medonosne čebele

(pregledni članek Meixner in sod., 2013). Za podvrste, ki pripadajo evolucijski liniji C, kamor spada tudi kranjska čebela, je značilno kratko zaporedje in odsotnost variabilnosti v dolžini fragmenta tRNA-Leu.

Za bolj celosten vpogled v variabilnost populacije slovenske kranjske čebele v vzrejališčih matic smo dodatno izbrali še en mitohondrijski označevalec, COI (citokrom oksidaza 1), ki je v lanskem letu na preliminarnem setu vzorcev pokazal variabilnost.

Mitohondrijska DNA se deduje izključno po materini liniji, torej imajo vse delavke, ki so potomke iste matice, enak genetski zapis mitohondrijske DNA. Za vsak kandidatni matičar smo pripravili ekstrakt DNA enega vzorca delavke, skupno smo analizirali 257 vzorcev. Celokupno DNA smo ekstrahirali iz celotnih prsnih delov čebel delavk.

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 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. 2.

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

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

Specifične fragmente smo pomnožili v cikličnem termostatu pri naslednjih pogojih:

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

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

Po 5 µl pomnoženega produkta smo nanесли v jamice v 1 % agaroznem gelu z dodatkom EtBr (etidijevega bromida) v 0,5 x pufu 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. 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 v11.1.5. (<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.

Za določanje posameznih haplotipov na podlagi poravnanih homolognih zaporedij smo uporabili R paket "pegas" (Population and Evolutionary Genetics Analysis System, v. 1.0-1, Paradis, 2010). Haplotipske mreže smo s funkcijami paketa pegas tudi izračunali in izrisali. Določili smo deleže prisotnosti posameznih haplotipov v celotni populaciji ter posamezno po statističnih regijah.

2.6 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC

Priprave na proučitev vpliva prezimovanja čebeljih matic v letu 2020 so obsegale vzpostavitev banke matic ter vzdrževanje nizkovolumskih plemenilčkov. V poskusu smo uporabili matice istega matičarja, katerih del smo shranili v ustrezno prirejenih brezmatičnih čebeljih družinah, nameščenih v zatemnjeni klimatizirani komori. Temperatura v komori je bila stalno med 14 in 15 °C. Za zimsko banko matic smo pripravili čebeljo družino v dveh 10- satnih nakladah. V banko smo nato vstavili 56 matic v transportnih matičnicah. Čebeljo družino smo izdatno nakrmili s sladkorno raztopino, ter jo do 15. 10. 2020 pustili zunaj, nato pa smo jo prestavili v klimatizirano komoro do 9. 3. 2021.

Drugi del matic smo prezimljali v nizkovolumskih Kielerjevih plemenilnikih z eno dodatno naklado (6 satov) zalege in čebel, ter eno naklado hrane (6 satov) ki so bili nameščeni pod različnimi temperaturnimi režimi (v komori in zunaj). Te družine smo izdatno dokrmili, jih redno preverjali in po potrebi oskrbovali.

Za preizkus prezimljanja matic v banki matic v sezoni 2021 smo glede na rezultate odločili, da spremenimo nekatere parametre preizkusa:

- Transportne matičnice, ki smo jih za prezimljanje matic uporabljali v lanski sezoni, bomo zamenjali z lesenimi (Zandrove) matičnicami.
- Spremljali in beležili bomo temperaturo in vlago v banki matic
- Temperatura v zatemnjeni klimatizirani komori v času prezimovanja matic bo nastavljena na 16°C, skladno z recentno raziskavo, ki poroča, da imajo pri tem temperaturnem pogoju matice v banki visoko stopnjo uspešne prezimitve (Rousseau in Giovenazzo, 2021).

2.6.1 Preverba kakovosti teh čebeljih matic

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. Pri deležu uspešno prezimljenih matic bomo spremljali morfološke in fiziološke lastnosti, kot so masa, št. spermatozoidov v spermateki ter delež živih spermatozoidov v spermateki.

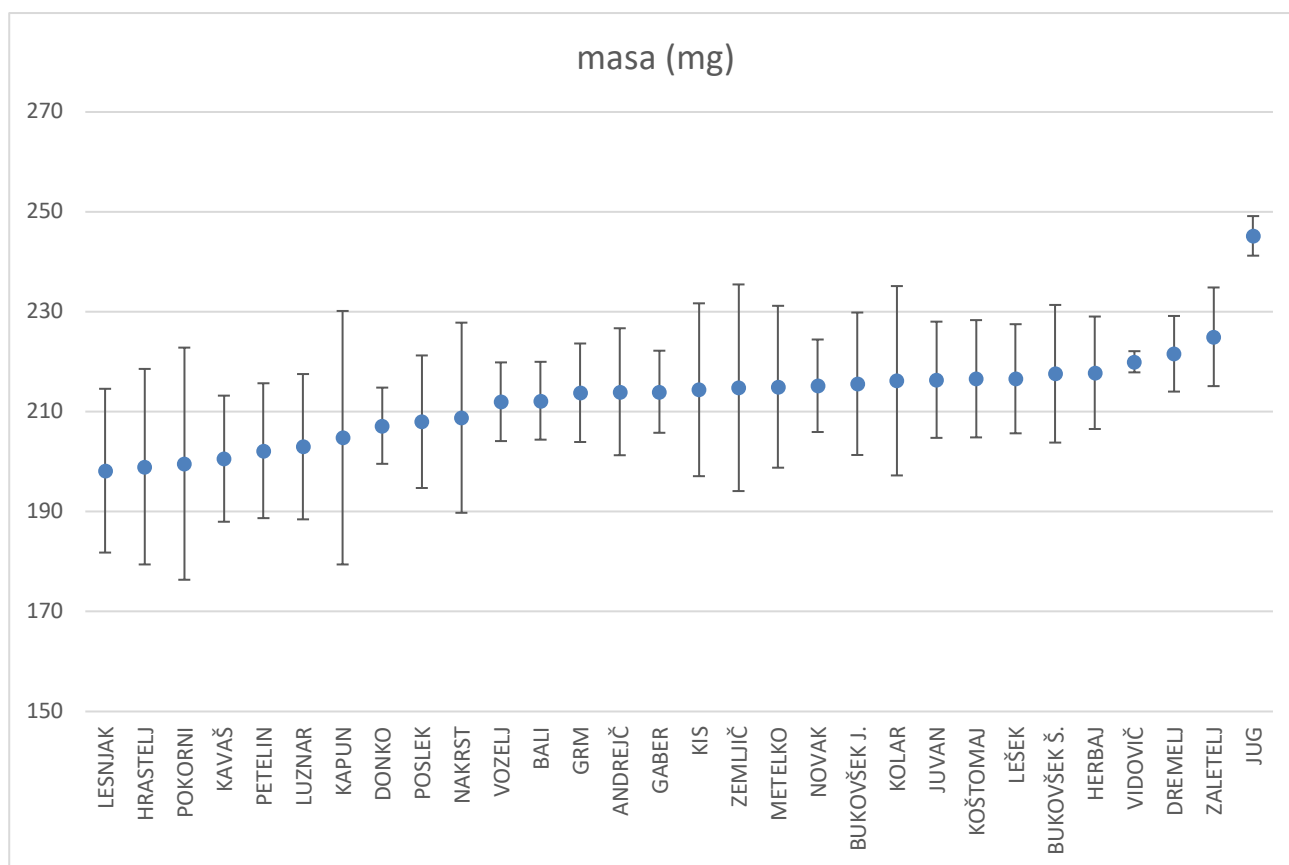
2.6.2 Proučitev ekonomske zanimivosti prezimovanja čebeljih matic

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 2021 smo pregledali cene čebeljih matic, kot jih ponujajo različni vzrejevalci in preprodajalci. Cene, ki smo jih zbrali, so vezane na Evropsko tržišče.

3 REZULTATI

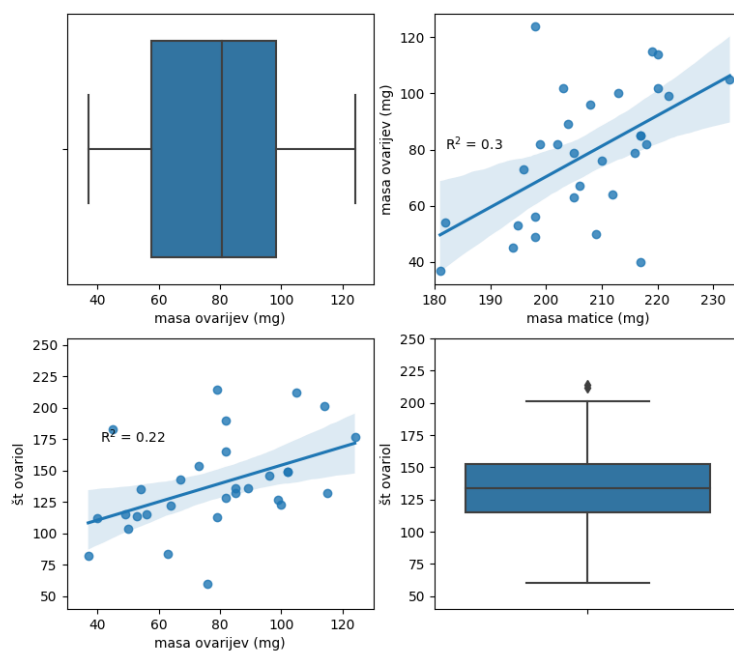
3.1 SPREMLJANJE MORFOLOŠKIH IN FIZIOLOŠKIH PARAMETROV ČEBELJIH MATIC

V letu 2021 je bilo vključenih v testiranje 180 matic. Po posameznem vzrejališču smo tehtali po pet matic in izračunali povprečne vrednosti po vzrejališču (Slika 4). Največja povprečna masa v letu 2021 je bila 250.00 mg, in najmanjša 179 mg; povprečje je bilo pri **212.8 ± 9.3 mg**. 26 matic je imelo maso nižjo od 200 mg, na štirinajstih vzrejališčih je imelo vseh pet merjenih matic maso, višjo od 200 mg.

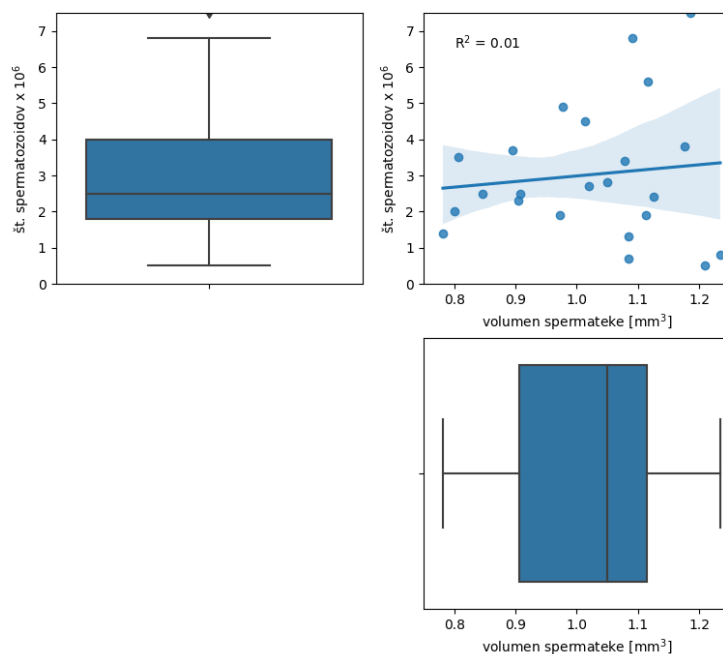


Slika 4. Povprečna masa matic iz vzrejališč. Zadnjih sedem (Lešek – Jug) je v prvem kvartilu.

Na deležu vzorčene populacije (30 matic iz 3 vzrejališč) smo z disekcijo abdomna odstranili ovarije, jih stekali ter prešteli število ovariol. Povprečna masa ovarijev je **78 ± 23 mg**, povprečno število ovariol pa **138 ± 37**. Korelacija med eno in drugo spremenljivko je bila šibka, $R^2 = 0.22$, korelacija med maso matic in maso ovarijev pa $R^2 = 0.3$ (Slika 5). Nadalje smo vsaki matici odstranili spermateko, pod lupo odstranili trahealno ovojnico, izmerili njen premer s programom AxioVision ter izračunali povprečni volumen: **1.02 ± 0.13 mm³**. Prešteli smo tudi spermatozoide v posamezni spermateki, povprečno število je **2.98 ± 1.85 × 10⁶**. Korelacija med eno in drugo količino je zelo šibka, $R^2 = 0.01$ (Slika 6). Pri sedmih maticah ni bilo mogoče oceniti velikosti spermateke in določiti števila spermatozoidov zaradi poškodbe spermateke med odstranjevanjem trahealne ovojnice.



Slika 5. Masa ovarijev (zgoraj levo) in število ovariol (spodaj desno). Odnos med maso matic in maso ovarijev (desno zgoraj) ter med maso ovarijev in številom ovariol (spodaj levo).



Slika 6. 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 **0.83 ± 0.14**; minimalni delež je bil **0.31**, maksimalni delež živih spermatozoidov pa **0.98**.

3.2 DIAGNOSTIKA – PRISOTNOST SPOR *NOSEMA* SPP.

Rezultati pregleda iztrebkov na prisotnost spor *Nosema* spp. so predstavljeni v Preglednici 3, iz katere je razvidna stopnja okuženosti čebeljih matic. Nosemo smo zaznali v iztrebkih enaintridesetih matic z 19 vzrejališč. Ugotovili smo, da je bilo v letu 2021 s spori okuženi 20.6 %. To je več kot v letih 2016 - 2020.

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

Leto	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Št. pregledanih matic	n = 149	n = 140	n = 150	N = 160	N = 180	N=150
Št. vzrejališč	N = 30	N = 28	N = 28	N = 30	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 %)	31 (21 %)

V vseh vzorcih spremljevalk matic – z izjemo enega – ki smo jih uporabili za disekcijo, smo zaznali prisotnost *Nosema* spp. (29/30). Pri pregledu preparatov iz črevesa pri 30 maticah v sekciji smo zaznali prisotnost spor *Nosema* spp. pri 9 maticah (30 %).

3.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA

V letu 2021 smo za krioprezervacijo trotovskega semena izbrali matice z rodovniškimi številkami: 41022-2020, 26329-2020 in 26308-2020. Troti, potomci teh matic, so bili nabrani v kletke in njihovo seme zbrano v laboratoriju. Zbrano je bilo približno dvakrat po 30 µL semena, ki smo ga shranili v zamrzovalni skrinji na – 80°C (Slika 7).



Slika 7. Seme trotoev po končanem zbiranju.

3.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV

V letu 2021 je rezultate direktnega testiranja do 28. 7. 2021 oddalo 20 vzrejevalcev s 404 čebeljimi družinami (Preglednica 4).

Preglednica 4. Seznam vzrejevalcev, ki so v letu 2021 opravljali direktni test in so oddali rezultate do 28. 7. 2021.

Vzrejevalec	Čebeljak	Število testiranih družin	Vse ocene	Del ocen	Čistilna sposobnost
Jože Andrejč	SI328702	20	20	-	da
Janko Bukovšek	SI119841	20	20	-	da
Štefan Bukovšek	SI324751	20	20	-	da
Bojan Donko	SI328702	20	20	-	da
Janez Dremelj	SI320784	20	20	-	da
Gaber Viktor	SI266129	20	20	-	da
Darko Grm	SI154525	20	20	-	da
Jožef Herbaj	SI206172	21	17	4	da
Marko Hrastelj	SI368640	21	21	-	da
Erik Kapun	SI179029	20	20	-	da
Matija Koštomaj	SI304467	20	20	-	da
Tomaž Lesnjak	SI354361	22	-	22	da
Venčeslav Lešek	SI314028	20	20	-	da
Irma Petelin	SI210322	20	20	-	da
Boris Poslek	SI348937	20	20	-	da
Jože Vidovič	SI338158	20	20	-	da
Ladislav Vozelj	SI154075	20	20	-	da
Henrik Zaletelj	SI291402	20	20	-	da
Andrej Zemljčič	SI334080	20	20	-	da
KIS	SI340788	20	16	4	da

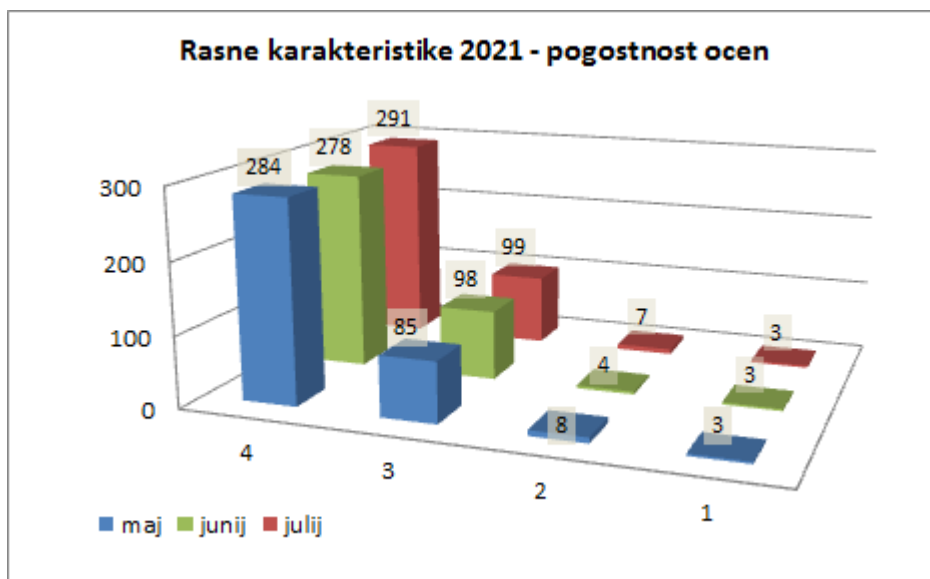
Družine v testu so čebelarji ocenjevali trikrat: v maju, juniju in juliju, v obdobju najpogostejših paš in hitrega razvoja čebeljih družin. V tem obdobju so ocenili tudi naravni odpad varoj in opravili standardni pin test za določanje čistilne sposobnosti. Ob koncu pašne sezone so stehali ali ocenili pridelek medu. V prvi fazi analize smo izračunali povprečne vrednosti posameznih ocen in meritev, ki jih prikazujemo v preglednici 5.

Preglednica 5. Povprečne ocene posameznih ocen in meritev.

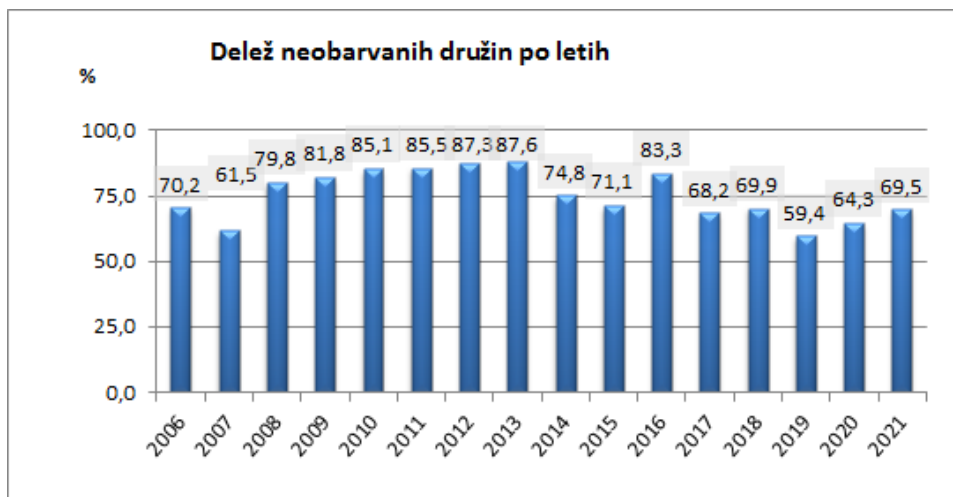
Lastnost	maj	junij	julij	N meritev
Obarvanost	3,74	3,72	3,73	400
Mirnost	3,37	3,41	3,44	399
Rojivost		3,46		383
Živalnost	3,27		3,42	401
Odpad varoj			0,78	362
Pridelek medu			5,1	380
Čistilna sposobnost			73,9	383

3.4.1 Rasne karakteristike – obarvanost obročkov zadka

Obarvanost zadkov, s katero poskušamo oceniti pasemsko čistost čebeljih družin je bila ocenjena v vseh treh ocenjevanjih, v maju, juniju in juliju. Povprečna obarvanost se je malenkost znižala in je bila okoli 3,73. Delež obarvanih družin skozi sezono narašča (Slika 8). Delež neobarvanih družin v letu 2021 je bil 64,3 % (Slika 9). 16 družin (3,7 %) je vsaj enkrat dobilo oceno 1 ali 2, kar pomeni, da bi matice teh družin morali zamenjati z bolj ustreznimi.



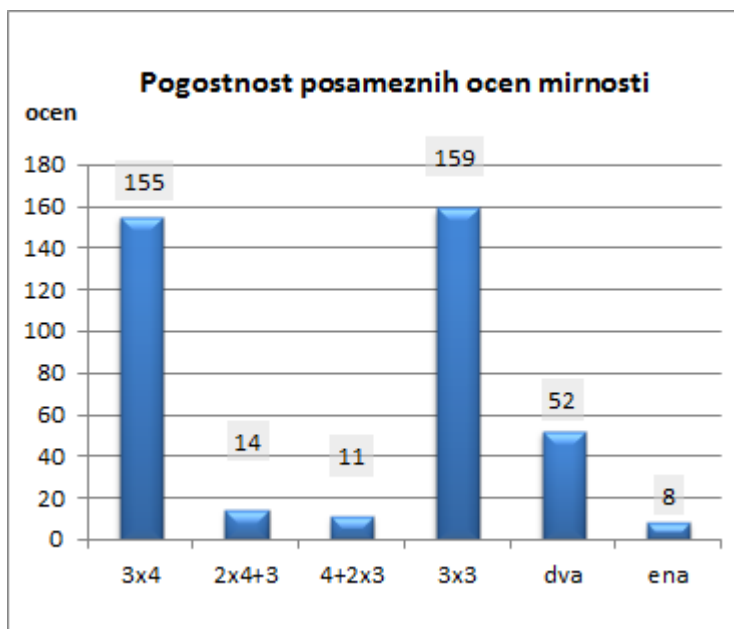
Slika 8. Pogostnost posameznih ocen obarvanosti v letu 2021.



Slika 9. Delež družin brez obarvanih čebel po letih direktnega testiranja.

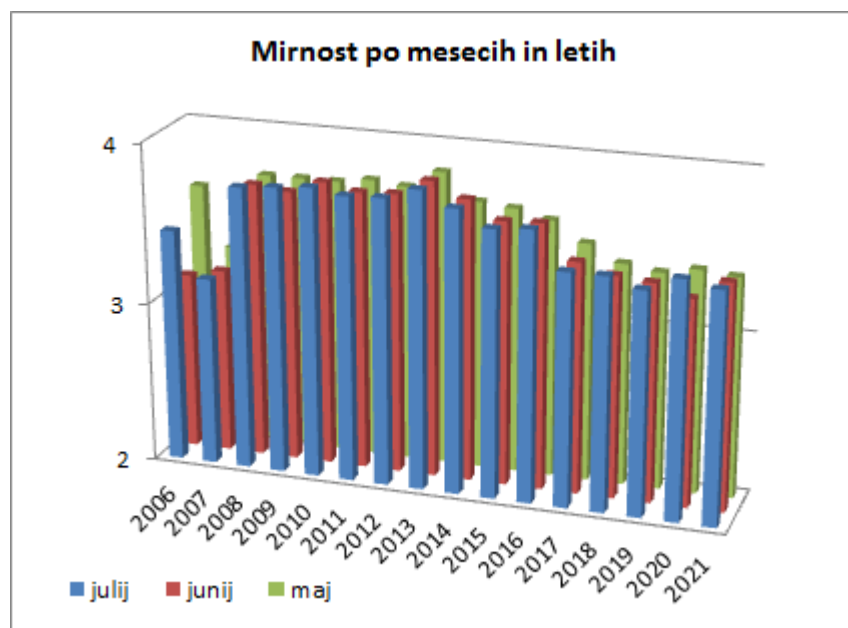
3.4.2 Mirnost ali obnašanje

Vsaka družina je bila trikrat ocenjena na mirnost: v maju 380, ter v juniju 383 in juliju 399 družin. Povprečna ocena mirnosti v posameznih mesecih je prikazana v Preglednica 5. Le okoli 39 % družin je vedno dobilo oceno 4. Oceno 2 ali manj je dobilo 60 družin ali 15,0 % (Slika 10).



Slika 10. Pogostost posameznih ocen mirnosti. Prvi trije stolpci prikazujejo, kolikokrat je bila ista družina ocenjena z najvišjo oceno 4.

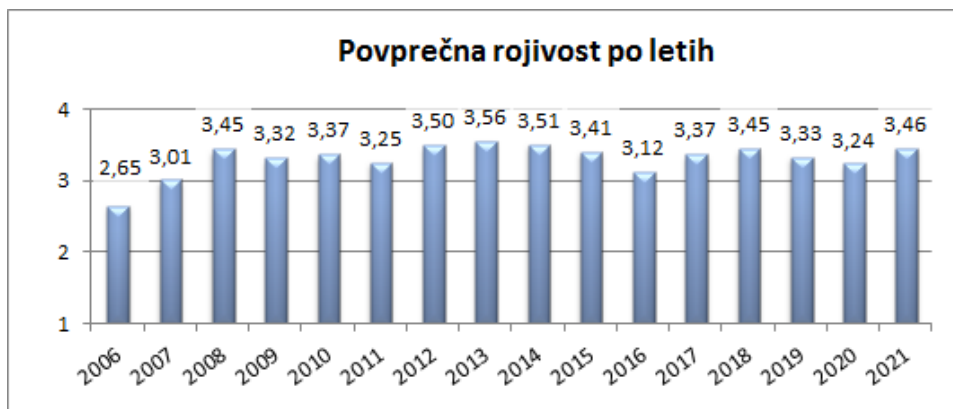
Testiranja zadnjih let prikazujejo trend zmanjševanja mirnosti čebeljih družin zaradi strožjega ocenjevanja. V zadnjih štirih letih so ocene mirnosti približno konstantne (Slika 11).



Slika 11. Mirnost po letih in mesecih.

3.4.3 Rojivost

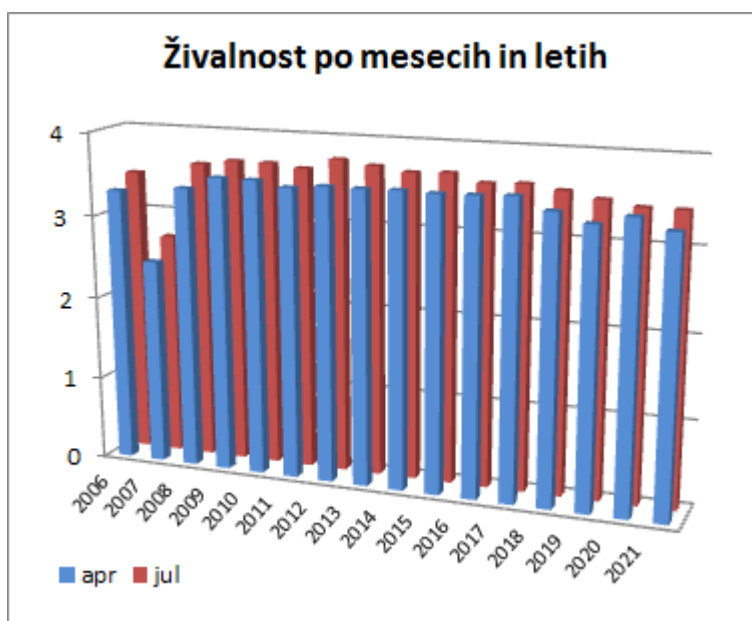
Ocenjevanje rojivosti se izvaja v juniju, v času najintenzivnejšega razvoja čebeljih družin. Ocenjenih je bilo 383 družin. Kar 63,5 % družin ni poskusilo rojiti, pri 24,3 % so čebele same podrle matičnjake. V 9,7 % družinah je čebelar s trudom preprečil rojenje in le 2,6 % družin je izrojilo. Presenetljivo je leto 2021 eno najmanj rojivih let (Slika 12).



Slika 12. Prikaz povprečne rojivosti po letih.

3.4.4 Živalnost

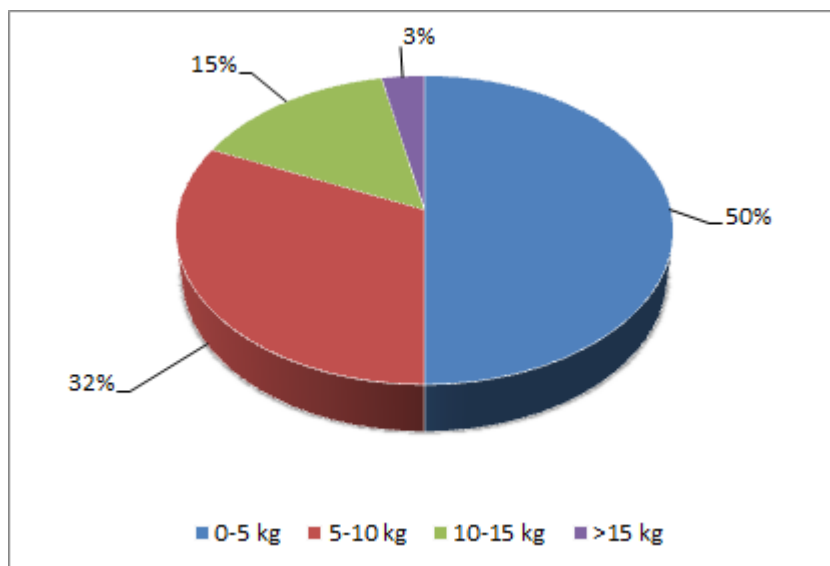
V maju je bilo ocenjenih 380 družin in v juliju 401 družina. Povprečna ocena v maju je bila 3,27 in v juliju 3,42 (Preglednica 5). Majska povprečna ocena je pričakovano nižja od julijske, saj je takrat prisotnih več pašnih čebel. (Slika 13).



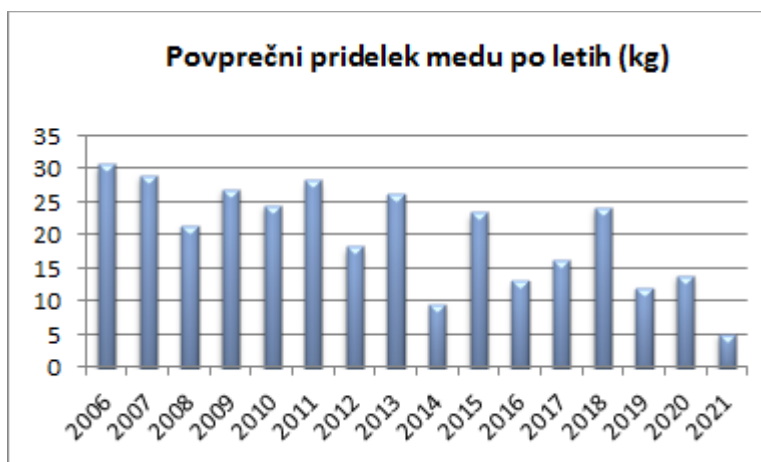
Slika 13. Živalnost po mesecih in letih.

3.4.5 Donos medu

Skupni donosi medu v letu 2021 so bili med 0 in 22 kilogrami na panj. Skupno je bil donos medu izmerjen pri 380 družinah (Slika 14). Povprečni pridelek medu v letu 2021 je zaradi izredno hladne pomladi in suhega začetka poletja rekordno nizek in sicer le 5,1 kg na panj (Slika 15).



Slika 14. Delež posameznih kategorij pridelka medu v letu 2020.

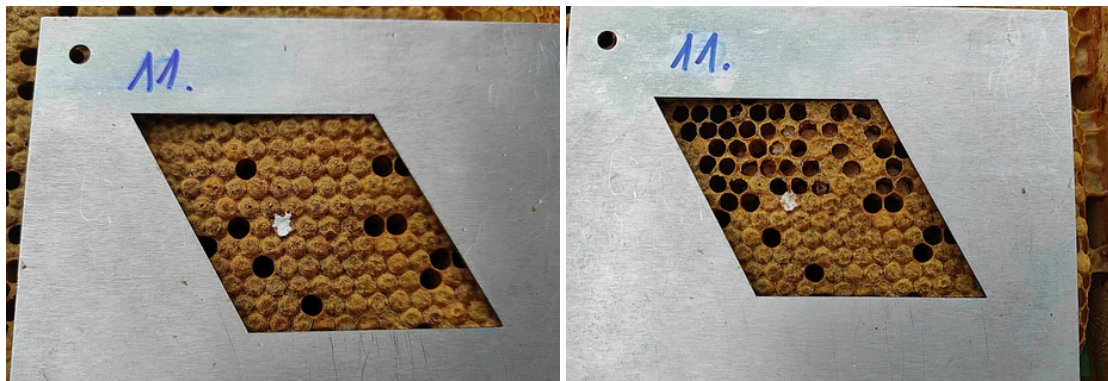


Slika 15. Povprečni pridelek medu po letih.

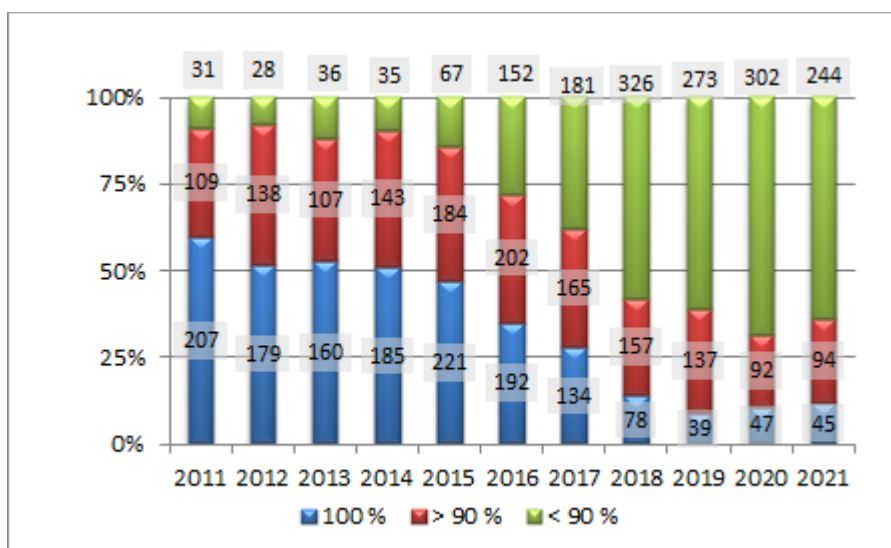
3.4.6 Odpad varoj in čistilna sposobnost

Naravni odpad varoj je bil izmerjen pri 361 družinah in se je gibal med 0 in 7 varojami povprečno na dan, v povprečju pa 0,78 pršice na družino na dan. Vzrejevalci pri 12,7 % družin sploh niso zabeležili naravnega odpada varoj. V letu 2021 je bila čistilna sposobnost pravilno izmerjena pri 383 družinah. Vse družine so bile pred in po testu tudi fotografirane (Slika 16). 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 17). Za vzrejo priporočamo družine, ki imajo čistilno sposobnost vsaj 90 % ali pa družine izmed najboljše tretjine v čebelnjaku.



Slika 16. Ocenjevanje čistilne sposobnosti. Levo sat s petdeset prebodenimi celicami in desno sat po 8 urah.



Slika 17. Razporeditev družin po oceni čistilne sposobnosti in po letih.

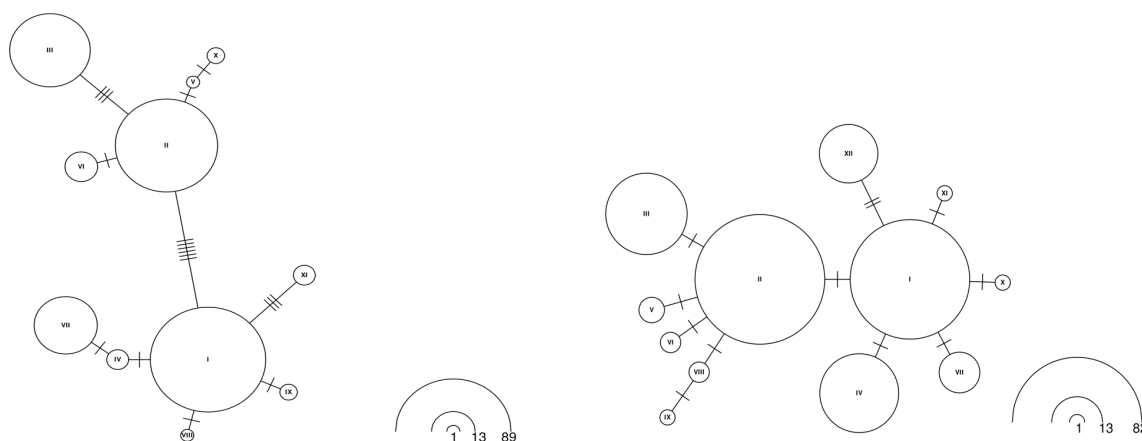
3.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE

Z molekulsko metodo pomnoževanja specifičnih nukleotidnih zaporedij s polimerazo (PCR) smo uspešno pomnožili in prebrali nukleotidna zaporedja za 2 mitohondrijska odseka pri delavkah kandidatnih matičarjev. Skupno smo pri 257 vzorcih uspešno pridobili nukleotidna zaporedja za tRNA-Leu pri 249 vzorcih in za COI pri 249 vzorcih.

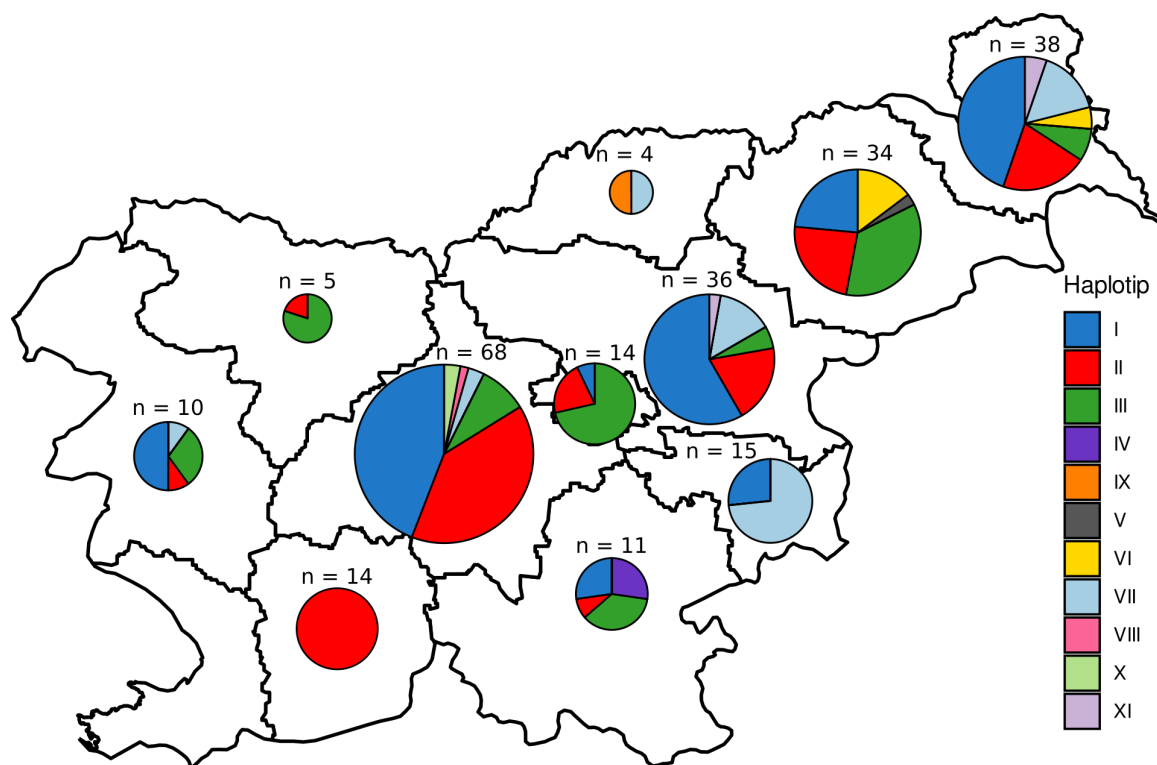
Označevalec tRNA-Leu je uveljavljen pokazatelj mitohondrijske linije. Na ta način smo uspešno določili mitohondrijsko linijo pri vseh vzorcih. Vsi analizirani vzorci **pripadajo mitohondrijski liniji C**, kar je v skladu s standardnimi metodami uvrstitve kranjske čebele ter ne odstopajo od te temeljne genetske značilnosti. Genetska osnova kandidatnih matičarjev je ustrezna. Med vzorci smo določili 11 različnih haplotipov za označevalec tRNA-Leu. Poravnava zaporedij tRNA-Leu vsebuje 19 variabilnih mest.

Označevalec COI je uveljavljen v sistematiki kot »barcode« za določanje vrst, pri medonosni čebeli pa manj pogosto uporabljen (Syromyatnikov in sod., 2018; Bubnič in sod., 2020). Naši preliminirani rezultati so pokazali znatno variabilnost in s tem uporabnost tega označevalca. Za označevalec COI smo določili 12 različnih haplotipov. Poravnava zaporedij COI vsebuje 10 variabilnih mest.

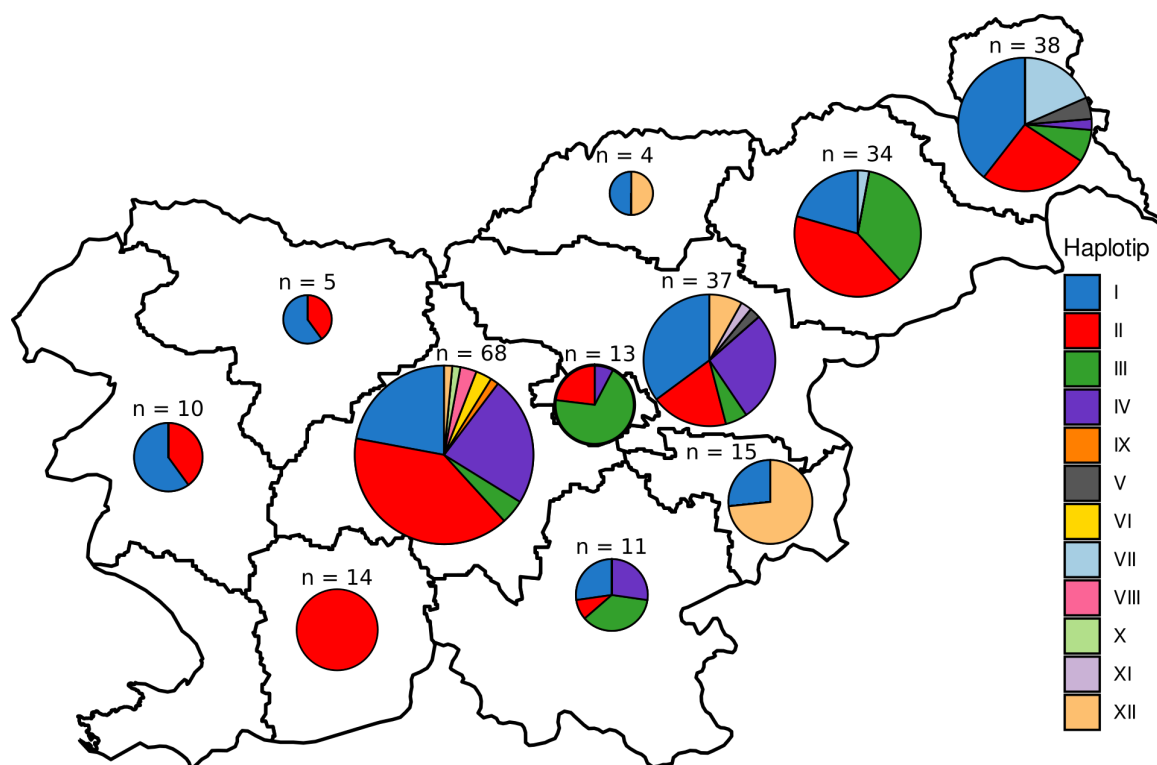
Haplotipske mreže za posamezen označevalec so prikazane na Slika 18 Slika 1, deleži posameznih haplotipov po statističnih regijah pa so prikazani na Slika 19 in Slika 20.



Slika 18. Haplotipska mreža za označevalec tRNA-Leu (LEVO) in COI (DESNO). Velikost krogov prikazuje število vzorcev z določenim haplotipom (haplotip I do haplotip XI). Haplotipi se med sabo povezujejo po sorodnosti, kratke pravokotne črte na vejah, ki povezujejo haplotip pa prikazujejo število korakov mtuacij.



Slika 19. Zastopanost haplotipov tRNA-Leu po regijah. Velikost krogov je sorazmerna številu vzorcev.



Slika 20. Zastopanost haplotipov COI po regijah. Velikost krogov je sorazmerna številu vzorcev.

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 (Slika 21).



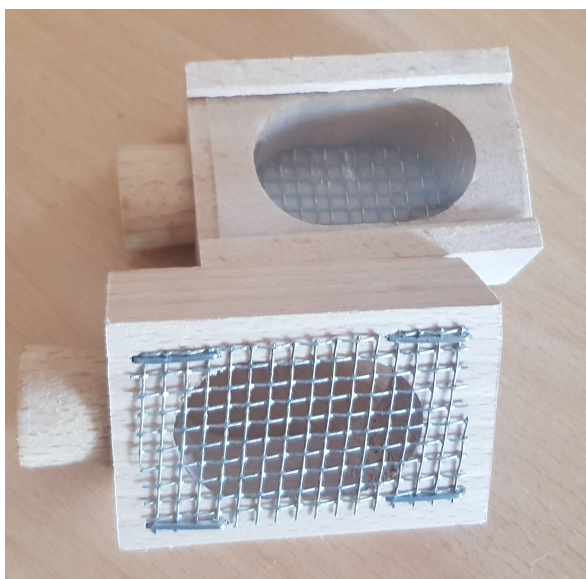
Slika 21. Prikaz postavitve matic v banki v transportnih matičnicah v poizkusu prezimitve v letu 2020. Na enem okviru je prostora za prezimitev 28 matic naenkrat.

V mesecu septembru smo matice prestavili v zimsko banko v katerih so prezimile. V hladilnici je bila v času prezimovanja od 15. 10. 2020 do 9. 3. 2021 stalna temperatura 14-15 °C. V obdobju prezimovanja nismo preverjali stanja matic vseh matic, štirikrat pa smo splošno stanje družin (na datume 25. 11. 2020, 17. 12. 2020, 20. 1. 2021 in 22. 2. 2021). Na datum 20. 1. 2021 smo čebelje družine preko sončnega dela dneva prestavili na zunanje stojišče zaradi iztrebljanja. Ob koncu prezimovanja – 9. 3. 2021 – smo čebelje družine ponovno prestavili na zunanje stojišče in opravili pregled družin in matic. Ugotovili smo, da prezimovanja ni preživela nobena matica v poizkusu, »družina« oz. čebele v banki pa so preživele. Prezimovanje matic v nizkovolumskih plemenilnikih, od katerih sta bila dva ravno tako v temperirani komori v Jablah, dva pa na stojišču v Ljubljani, jer bilo ravno tako neuspešno: ne glede na režim so družine propadle zaradi pomanjkanja hrane.

Kakovosti teh čebeljih matic nismo preučevali, razlog je v celoti neuspešna prezimitev matic v poizkusu.

3.6.1 Priprava za ponovitev poizkusa prezimovanja v banki matic in preverba kakovosti uspešno prezimljenih čebeljih matic

V sezoni 2021-2022 bomo matice prezimili v bankah v lesenih (Zandrovih) matičnicah (Slika 22) v hladilnici na nekoliko višji temperaturi (cca 16 stopinj), del pa jih bomo prezimili na prostem v nizkovolumskih plemenilnikih, ki jih bomo prezimili kot običajne čebelje družine.



Slika 22. Lesene Zandrove matičnice.

V letu 2022 bomo spremljali kakovost prezimljenih matic preko klasičnih parametrov: sprejetost v družine, površina in tip zalege, mirnost ter donos. Pri deležu teh matic bomo opravili fiziološke ter morfološke meritve.

3.6.2 Ekonomska zanimivost prezimovanja čebeljih matic

Prve matice, vzrejene v tekočem letu, se na slovenskem tržišču pojavijo običajno v prvi polovici maja. Za zgodnejše povpraševanje je torej potrebno odvzeti matico gospodarski/rezervni družini, ki se jo potem razstavi in porabi za okrepitev drugih družin. Tak poseg je potrebno ekonomsko nadomestiti, cena gospodarske družine v letu 2021 pa lahko tudi presega 125 €; rezervne družine dosegajo cene med 8.5 € do 14 € na sat; v ceno izgube gospodarske družine pa je potrebno všteti tudi izgubo pridelka. Prezimljene matice v RS imajo cene med 70 in 90 €, v tujini pa do 100 € (VB); cena prezimljene rodovniške matice pa je RS med 120 in 290 €, v tujini pa 160 € (ZRN). Ti podatki kažejo, da je verjetno ekonomsko upravičeno odzemanje in

zgodnjespomladanska prodaja matic iz manjših rezervnih družin (5 - 7 satov), vsekakor pa ni upravičljiva prodaja matic iz gospodarskih družin.

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

4 INTERPRETACIJA REZULTATOV

Matice so ključna komponenta čebelje družine; družine z maticami slabše kvalitete so šibkejšje in zato (tudi) z ekonomskega stališča problematične. Visoko kakovostne matice naj bi imele naslednje značilnosti: visoka živa masa in masa ovarijev, visoko število ovariol, zadovoljivo visoko število spermatozoidov v spermateki, zgoden začetek zaleganja, visoko število poleženih jajčec na dan, kvalitetno, nepresledkasto zalego, odsotnost bolezni in škodljivcev (Hatjina in sod., 2014).

V letu 2021 je bila povprečna masa matic v primerjavi z letom 2020 primerljiva ($210,1 \pm 15,0$ v letu 2020 v primerjavi z $212,8 \pm 9,3$ mg v letu 2021). Zgolj 26 matic od 180 je imelo maso nižjo od 200 mg, na štirinajstih vzrejališčih je imelo vseh pet merjenih matic maso, višjo od 200 mg.

Na deležu matic, ki je bil podvržen disekciji, je bil odnos med št. ovariol in maso ovarijev ter med maso matic in maso ovarijev pričakovan in znotraj že objavljenih rezultatov. Razlika glede na preteklo leto se kaže v vrednostih volumna spermateke ter števila spermatozoidov. Povprečen volumen spermateke v letu 2020 je bil $0,61 \pm 0,19$, v letu 2021 pa kar $1,01 \pm 0,02$ mm³. Znanstvene študije poročajo, da je večji volumen spermateke eden od znakov za višjo kakovost matice (Hatjina in sod., 2014). Ravno nasprotno pa je povprečno število spermatozoidov v letošnjem letu bilo nižje kot v preteklem letu; $2,98 \pm 1,85 \times 10^6$ (2021) v primerjavi z $5,23 \pm 1,46 \times 10^6$ (2020), kar je v nasprotju s pričakovanjem, da je v večji spermateki število spermatozoidov večje.

Diagnostika je pokazala prisotnost spor *Nosema* Spp. v iztrebkih enaintridesetih od stopetdesetih testiranih matic, kar je najvišja vrednost od 2016 do 2021 (21 % v letu 2021 v primerjavi z 15,4 % v letu 2016). *Nosema* pri maticah (in spremljevalkah) je lahko naznanitelj dolgoročnih problemov. Okužene matice imajo slabši razvoj ovarijev, kar se odraža 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).

V letu 2021 so, tako kot prejšnja leta, vzrejevalci izvedli direktni test, v katerem so testirali kandidatne matičarje. Rezultati testiranja naj bi bili orientacija za odbiro za leto 2022. Do datuma je v analizo oddalo rezultate dvajset vzrejevalcev čebeljih matic. Vsako leto vzrejevalcem na podlagi prejetih ocen izdamo priporočilo za vzrejo za naslednjo plemenilno sezono. Odsvetujemo vse matice z obarvanimi družinami, nemirne matice ter matice z slabim čistilnim nagonom. 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, čeprav je bilo leto 2021 zelo nerojivo. 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. Donos medu je bil po neugodnem hladnem koncu pomladi in suhem začetku poletja pričakovano nizek, le 5,1 kg na panj. Ocenjevanje čistilne sposobnosti se je v letih 2018 – 2021 močno popravilo. Precej manj družin je ocenjenih s 100%, kar kaže, da več vzrejevalcev test izvaja pravilno.

Z mitohondrijskimi označevalci smo spremljali mitohondrijsko linijo pri kandidatnih matičarjih. Vsi testirani vzorci pripadajo ustrezni mt liniji – to je linija C. Vzorčenje vseh kandidatnih matičarjev je prikazalo 11 haplotipov mitohondrijskega fragmenta tRNA-Leu. Spremljanje mitohondrijske linije je smiselno iz vidika ohranjanja čistosti kranjske čebele v Sloveniji kot tudi za spremljanje pestrosti znotraj genskega sklada. Mitohondrijska DNA se deduje neposredno po materini liniji in zato ima zalega praviloma enako mitohondrijsko zaporedje kot matica. Ta informacija nam lahko pomaga tudi pri ugotavljanju, ali so določene matice res potomke iste matere ali je prišlo do nenamerne zamenjave.

Prezimovanje čebeljih matic je ekonomsko zanimivo predvsem v spomladanskem času, pred prvo serijo v istem letu vzrejenih matic. 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.

5 SPLOŠNE UGOTOVITVE

Ugotavljamo, da je vsako letno spremljanje populacije, ki kandidira za nadaljnjo odbiro, izrednega pomena.

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

V letu 2021 je med vzorci izrazit porast prisotnosti spor *Nosema* Spp. v vzorcih iztrebkov matic. Glede na slabe vremenske pogoje v letošnji sezoni in pomanjkanje pašnih virov, ki so privedli do nujnega dohranjevanja čebeljih družin, to morda ni presenetljivo. Informacija je kljub temu pomembna z vidika spremljanja zdravstvenega stanja družin in večje pozornosti na morebitne klinične znake okužbe. V letošnjem letu je bila prav tako ocenjena nižja povprečna koncentracija spermatozoidov v spermateki. Število živih spermatozoidov v spermateki je pomembno za nadaljnji razvoj družine in za njeno uspešnost. Bolj kakovostne matice imajo višjo telesno maso, večjo maso ovarijev in večje število ovariol, večji volumen spermateke in več živih spermatozoidov v spermateki. Prav tako v vzorcih teh matic ni prisotnih spor *Nosema* Spp.

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

6 VIRI

- Bailey L. 1955.** The infection of the ventriculus of the adult honey-bee by *Nosema apis* Zander, Parasitology 45, 86–94.
- Büchler R, Andonov S, Bienefeld K, Costa C, Hatjina F, Kezić N, Kryger P, Spivak M, Uzunov A, Wilde J. 2013.** Standard methods for rearing and selection of *Apis mellifera* queens. V: Dietemann V, Ellis JD, Neumann P. (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research. J Apic Res 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.07>
- Bubnič, J.; Mole, K.; Prešern, J.; Moškrič, A.** Non-Destructive Genotyping of Honeybee Queens to Support Selection and Breeding. Insects 2020, 11, 896. <https://doi.org/10.3390/insects11120896>
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1994, 3, 294–299.
- Fyg W. 1964.** Anomalies and diseases of the queen honey bee. Ann. Rev. Entomol.9, 207–224.
- Fuse H, S. Ohta, M. Sakamoto, T. Kazama & T. Katayama (1993)** Hypoosmotic Swelling Test with a Medium of Distilled Water, Archives of Andrology, 30:2, 111-116, DOI: 10.3109/01485019308987743
- Garnery, L.; Franck, P.; Baudry, E.; Vautrin, D.; Cornuet, J.-M.; Solignac, M. Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera mellifera* and *A. m. iberica*) I. Mitochondrial DNA. Genet. Sel. Evol. 1998, 30
- Hatjina, F., Bieńkowska, M., Charistos, L., Chlebo, R., Costa, C., Dražić, M. M., ... Wilde, J. (2014).** A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. Journal of Apicultural Research, 53(3), 337–363. doi:10.3896/ibra.1.53.3.02
- Harizanis P.C.** 1983. Biology and activity of honey bee sperm: migration, concentration and ATP analysis: A hemacytometer method for counting honey bee (*Apis mellifera* L.) spermatozoa. University of California, Davis.
- Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Mol. Biol. Evol. 2013, 30, 772–780
- Liu, T.P.** 1992. Oocytes degeneration in the queen honey bee after infection by *Nosema apis*. Tissue Cell 24: 131-136.
- Meixner, M.D.; Pinto, M.A.; Bouga, M.; Kryger, P.; Ivanova, E.; Fuchs, S. Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. J. Apic. Res. 2013, 52, 1–28.
- Nur Z, Seven-Cakmak S, Ustuner B, Cakmak I, Erturk M. 2011.** The use of the hypo-osmotic swelling test, water test, and supravital staining in the evaluation of drone sperm. Apidologie, 43 (1), pp.31-38. [ff10.1007/s13592-011-0073-1](https://doi.org/10.1007/s13592-011-0073-1)
- Paradis E. 2010.** pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. Bioinformatics 26: 419-420.
- Rousseau A, Giovenazzo P.** 2021. Successful Indoor Mass Storage of Honeybee Queens (*Apis mellifera*) during Winter. Agriculture. 11(5):402. <https://doi.org/10.3390/agriculture11050402>

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

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

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

Priloga 1: DIREKTNO TESTIRANJE ČEBELJIH DRUŽIN

Navodila za ocenjevanje testnih družin

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

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

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 stojšču. Ocenjuje se z ocenami od 1 do 4 (ocene 1, 1.5, 2 in 2.5 pod povprečjem, ocene 3, 3.5 in 4 nad povprečjem).

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

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

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

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

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

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

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

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

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 izraženos **Bubnič** t te lastnosti.

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

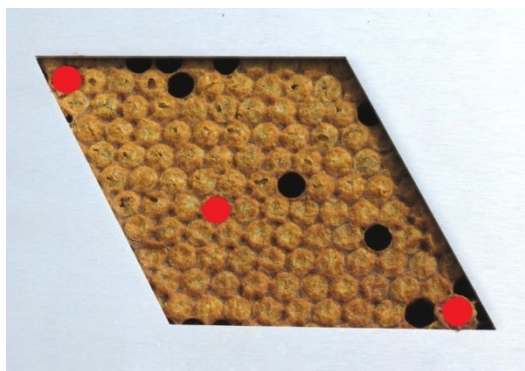
V evidenčni list se vpiše rezultate vsaj enega opravljenega PIN-testa in datum izvedbe testa. Priložiti je potrebno označene fotografije s šablono pred in po prebadanju. Pripišite podatek, po koliko urah ste opravili drugi pregled.



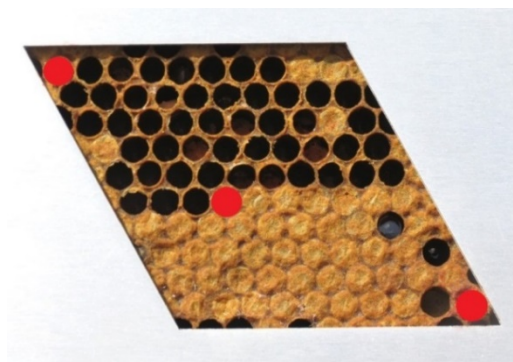
Slika 1. Primerna starost zalege je okrog 17 dni, to je stadij bube z rožnatimi do rdečimi očmi.



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.

