

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 letih 2020 do 2022

Vodja naloge:
dr. Ajda Moškrič

Poročilo pripravili:
dr. Ajda Moškrič
doc. dr. Janez Prešern
doc. 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	4
2.1.2 Merjenje premera spermateke in računanje volumna	4
2.1.3 Štetje spermatozoidov v spermateki čebelje matice z uporabo hemocitometra	5
2.2 DIAGNOSTIKA - PRISOTNOST SPOR NOSEMA SPP.	6
2.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA	6
2.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV	7
2.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE.....	7
2.5.1 Leto 2020	9
2.5.2 Leto 2021	9
2.5.3 Leto 2022	9
2.6 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC.....	9
2.6.1 Poizkus 2020 - 2021	9
2.6.2 Poizkus 2021 - 2022	10
2.6.3 Preverba kakovosti teh čebeljih matic	10
2.6.4 Proučitev ekonomske zanimivosti prezimovanja čebeljih matic.....	10
3 REZULTATI.....	11
3.1 SPREMLJANJE MORFOLOŠKIH IN FIZIOLOŠKIH PARAMETROV ČEBELJIH MATIC	11
3.1.1 Leto 2020	11
3.1.2 Leto 2021	13
3.1.3 Leto 2022	15
3.2 DIAGNOSTIKA – PRISOTNOST SPOR NOSEMA SPP.....	17
3.2.1 Leto 2020	17
3.2.2 Leto 2021	17
3.2.3 Leto 2022	17
3.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA	18
3.3.1 Leto 2020	18
3.3.2 Leto 2021	18
3.3.3 Leto 2022	18
3.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV	19
3.4.1 Rasne karakteristike – obarvanost obročkov zadka.....	22

3.4.2	<i>Mirnost ali obnašanje</i>	24
3.4.3	<i>Rojivost</i>	26
3.4.4	<i>Živalnost</i>	26
3.4.5	<i>Donos medu</i>	27
3.4.6	<i>Odpad varoj in čistilna sposobnost</i>	29
3.4.7	<i>Leto 2022</i>	30
3.5	SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE	32
3.5.1	<i>Leto 2020</i>	32
3.5.2	<i>Leto 2021</i>	33
3.5.3	<i>Leto 2022</i>	35
3.6	PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC	36
3.6.1	<i>Poizkus 2020 - 2021</i>	36
3.6.2	<i>Poizkus 2021 - 2022</i>	37
3.6.3	<i>Ekonomska zanimivost prezimovanja čebeljih matic</i>	38
4	INTERPRETACIJA REZULTATOV	39
4.1	SPREMLJANJE ČEBELJIH MATIC S FIZIOLOŠKIMI IN MORFOLOŠKIMI MERITVAMI	39
4.2	DIAGNOSTIKA – PRISOTNOST SPOR <i>NOSEMA</i> SPP.	39
4.3	DIREKTNO TESTIRANJE VZREJEVALCEV	40
4.4	SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE	40
4.5	PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC	40
5	SPLOŠNE UGOTOVITVE	41
6	VIRI	42
	PRILOGA 1: DIREKTNO TESTIRANJE ČEBELJIH DRUŽIN	1

POVZETEK

V raziskavi smo v obdobju od 1. 8. 2020 do 31. 7. 2022 spremljali kakovost vzreje matic kranjske čebele ter proučevali možnosti ohranjanja matic čez zimo. Matice izhajajo iz selekcioniranih matičarjev. Vsako leto smo spremljali matice iz odobrenih 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/ali 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.

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 smo pozimi 2021/2022 poizkus prezimovanja ponovili s spremenjenimi parametri. Opravili smo pregled aktualnega tržišča, naredili osnovno kalkulacijo cene prezimovanja za leto 2021 ter ocenili ekonomičnosti prezimovanja.

1 UVOD

Usmeritev čebelarstva v vzrejo matic za tržišče je strateška odločitev. Vzreja kvalitetnih, reproduktivnih matic je cilj slehernega čebelarja vzrejevalca. Uspešna vzreja temelji na upoštevanju naravnih zakonitosti, zato se pri vzreji poskuša ustvariti podobne razmere, kot so v naravni vzreji matic. 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 in 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

V obdobju 2020-2022 smo pregledali matice iz vzrejališč iz 11 statističnih regij: gorenjske, goriške, JV Slovenije, koroške, obalno-kraške, osrednjeslovenske, podravske, pomurske, posavske, savinjske in zasavske regije. Skupno smo v letu 2020 pregledali 180 matic iz tridesetih od enaintridesetih odobrenih vzrejališč gospodarskih matic, v letu 2021 smo pregledali 180 matic iz tridesetih odobrenih vzrejališč in v letu 2022 smo pregledali 186 matic iz dvaintridesetih odobrenih vzrejališč (Tabela 1).

Tabela 1. Pregled vzrejevalcev v letu 2020, 2021 in 2022 (✓- vzrejevalec je sodeloval v določenem letu)

Zap. št.	Vzrejevalec	NASLOV	POŠTA	2020	2021	2022
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	Dremelj Jan	Dragovšek 12	1275 Šmartno pri Litiji			✓
8	Gaber Viktor	Novačanova ulica 3	3202 Ljubečna	✓	✓	✓
9	Grm Darko	Hude Ravne 1	1273 Dole pri Litiji	✓	✓	✓
10	Herbaj Jožef	Nedelica 29	9224 Turnišče	✓	✓	✓
11	Hrastelj Marko	Ženje 5	8270 Krško	✓	✓	✓
12	Jug Vasja	Grant 1e	5242 Grahovo ob Bači	✓	✓	✓
13	Juvan Nejc	Pod Gonjami 103	2391 Prevalje	✓	✓	✓
14	Kapun Erik	Vaneča 70a	9201 Puconci	✓	✓	✓
15	Kavaš Milena	Ribiška 8	9233 Odranci	✓	✓	✓
16	Kmetijski inštitut Slovenije	Hacquetova ulica 17	1000 Ljubljana	✓	✓	
17	Kolar Peter	Doklece 3	2323 Ptujška Gora	✓	✓	✓
18	Koštomaj Matija	Lažiše 52	3225 Planina pri Sevnici	✓	✓	✓
19	Kovačević Ivana	Lažiše 52	3225 Planina pri Sevnici	✓	✓	✓
20	Lesnjak Tomaž	Mali vrh 59	3327 Šmartno ob Paki		✓	✓
21	Lešek Venčeslav	Olešče 28	3270 Laško	✓	✓	✓
22	Luznar Erik	Begunje 170	4275 Begunje na Gorenjskem	✓	✓	✓
23	Metelko Miha	Studenec 23a	8293 Studenec		✓	✓
24	Nakrst Mitja	Žeje 30	1233 Dob	✓	✓	✓
25	Novak Miha	Zg. Slivnica 17	1293 Šmarje-Sap	✓	✓	✓
26	Petelin Irma	Pliskovica 102	6221 Dutovlje	✓	✓	✓
27	Pokorni Julij	Gačnik 3	2211 Pesnica	✓	✓	✓
28	Poslek Boris	Mariborska 45	2314 Zgornja Polskava	✓	✓	✓
29	Tomažič Matevž	Visole 19	2310 Slovenska Bistrica	✓		
30	Tratnjek Jožef	Žižki 93	9232 Črenšovci	✓		✓
31	Vidovič Jože	Apače 300	2324 Lovrenc na Dr. Polju	✓	✓	✓
32	Vozelj Ladislav	Dragovšek 18	1275 Šmartno pri Litiji	✓	✓	✓
33	Zaletelj Henrik	Fužina 59	1303 Zagradec	✓	✓	✓
34	Zemljič Andrej	Boračeva	9252 Radenci	✓	✓	✓

Zabeležili smo podatke na matičnicah (rodovniška številka, številka matice), vrsto matičnice in število čebel spremljevalk ter morebitne poškodbe matic. Po pet matic iz vsakega vzrejališča smo uspavali z ogljikovim dioksidom (CO₂) skupaj s spremljevalkami; vsako matico smo stehali z analitsko tehtnico (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 podvzorcu matic opravili še morfološko preiskavo. 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. Odstranili in stehali smo ovarije ter prešteli število ovariol v enem ovariju. Odstranili smo spermateko, s pomočjo stereomikroskopa odstranili ovoj iz trahej in 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 preparat črevesa vsake od matic v disekciji. Po eno nogo vsake matice smo shranili za ekstrakcijo DNA in določanje mitohondrijske linije z molekulsko metodo PCR.

2.1.1 Tehtanje ovarijev in štetje ovariol

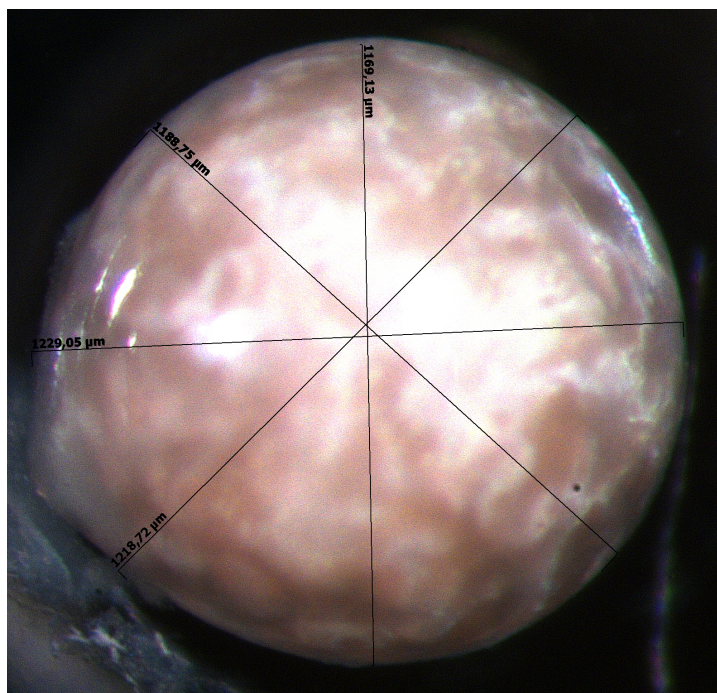
Odstranjena ovarija smo skupaj stehali z analitsko tehtnico (Mettler Toledo). Po tehtanju smo ovarije fiksirali v 1 ml 10 % raztopini formalina in shranili na 4°C do štetja. Število ovariol smo določili s štetjem posameznih ovariol pod lupo ter izračunali povprečno število ovariol.

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 1; d), ki smo jih potem izpovprečili ($\bar{d}$). Na podlagi povprečnega premera smo izračunali volumen spermateke (Enačba 1).

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

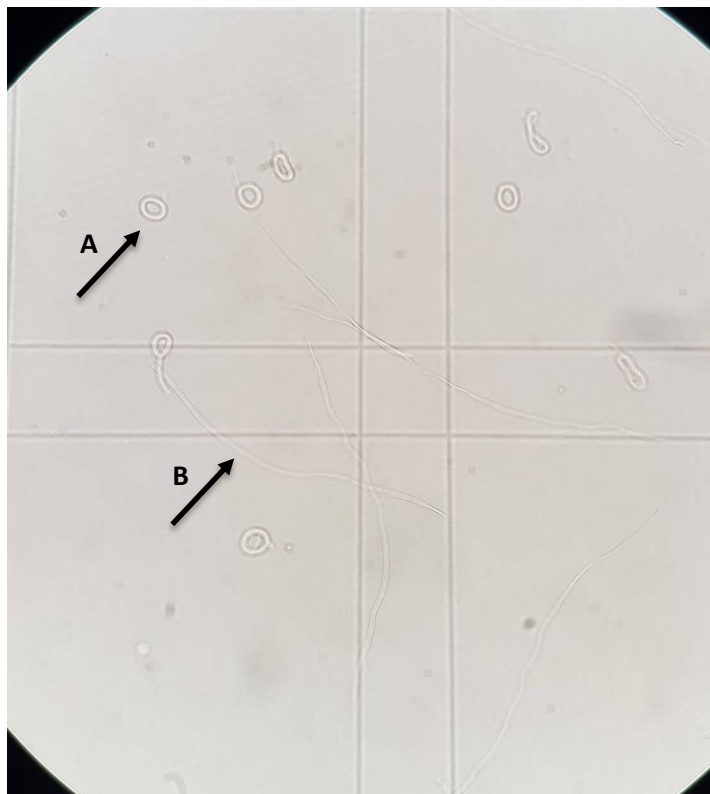
Enačba 1. Izračun volumna



Slika 1. 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 Bürkerjev hemocitometer rahlo pretresli, da so se spermatozoidi enakomerno razporedili. Nato smo s pipeto nanесли kapljico suspenzije v »V« utor hemocitometra ob robu krovnega stekelca in napolnili površino kamrice brez preplavljanja. Pred štetjem smo nekaj minut počakali, da so se spermatozoidi umirili na dnu. Spermatozoide smo prešteli pod svetlobnim mikroskopom v 80 kvadratih 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 preštetihih zvitihi in iztegnjenih spermatozoidov smo izračunali delež živih spermatozoidov v spermateki.



Slika 2. 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 skupno v letih 2020 do 2022 pregledali 543 vzorcev iztrebkov. Pri maticah, ki smo jih uporabili v disekciji, smo za prisotnost spor pregledali poleg vzorcev iztrebkov tudi 86 vzorcev homogeniziranih zadkov čebel spremljevalk ter 86 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 80 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. Odvzem smo izvedli vsako leto (2020, 2021 in 2022).

2.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV

Analizirali smo rezultate direktnega testa, ki so ga v letih 2020, 2021 in 2022 opravljali vzrejevalci čebeljih matic v svojih selekcijskih čebelnjakih. Vsako vzrejališče gospodarskih matic testira dvajset družin iz svojega selekcijskega čebelnjaka. Vzrejališče 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. V letu 2021 je rezultate testiranja do vključno 28. 7. 2021 oddalo 20 vzrejevalcev s 404 čebeljimi družinami. V letu 2022 pa je rezultate testiranja do vključno 26. 7. 2022 oddalo 24 vzrejevalcev s 486 čebeljimi družinami. Navodila za izvajanje direktnega testa so v prilogi 1.

Kot v letih 2020 in 2021, smo tudi v letu 2022 rezultate, ki so jih poslali posamezni vzrejevalci, analizirali in pripravili priporočila za odbiro. Priporočila bomo v začetku septembra vzrejevalcem poslali po pošti, skupaj s potrdilom o številu matic, ki so bile v letu 2022 vpisane v rodovniško knjigo. Na podlagi pravilno izvedenega direktnega testa bomo pridali tudi potrdilo o pravilni izvedbi direktnega testa. Splošne rezultate direktnega testiranja za leta 2020, 2021 in 2022 podajamo v poglavju 3.4 tega poročila.

2.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE

Mitohondrijska DNA se deduje izključno po materini liniji, torej imajo vse delavke, ki so potomke iste matice, enak genetski zapis mitohondrijske DNA. Mitohondrijsko linijo določamo genetsko z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) s pomnoževanjem specifičnega mitohondrijskega fragmenta, ki je uporaben kot pokazatelj 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 pa smo dodatno izbrali še en mitohondrijski označevalec, COI (citokrom oksidaza 1).

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 pomnoževali 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, ZDA), Veriti (Applied Biosystems, ZDA), ali T1 Thermocycler (Biometra, Nemčija). Specifični začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili, in vir so navedeni v preglednici (Tabela 2).

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

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

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 ekstrakt DNA, pri katerem smo predhodno že uspešno pomnožili in prebrali specifična nukleotidna zaporedja.

Po 5 µl pomnoženega produkta smo nanegli v jamice v 1 % agaroznem gelu z dodatkom EtBr (etidijevga bromida) v 0,5 x pufru TBE na horizontalni elektroforezi. Za oceno dolžine fragmenta smo uporabili standardno lestvico GeneRuler™ 100 bp DNA (ThermoScientific, ZDA), ki smo jo sočasno z vzorci nanegli 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.

Posamezne haplotipe na podlagi poravnanih homolognih zaporedij smo določili z R paketom "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.

2.5.1 Leto 2020

V letu 2020 smo poleg označevalcev t-RNA_{leu}-Cox2 in COI preverili uporabnost označevalca ND2, ki se je izkazal pri razločevanju nekaterih populacij znotraj linije M, za linijo C pa podatkov še ni bilo (Henriques et al., 2019). Skupno smo pripravili 30 ekstraktov. Vzorci so služili za preliminarni vpogled v stanje mitohondrijske linije in za optimizacijo metode.

2.5.2 Leto 2021

V letu 2021 smo za vsak kandidatni matičar pripravili ekstrakt DNA enega vzorca delavke, skupno smo analizirali 257 vzorcev. Celokupno DNA smo ekstrahirali iz celotnih prsnih delov čebel delavk. Rezultati spremljanja mitohondrijske linije kandidatnih matičarjev so bili znani v januarju 2021.

2.5.3 Leto 2022

V letu 2022 smo za vsak kandidatni matičar pripravili ekstrakt DNA enega vzorca delavke, skupno smo analizirali 284 vzorcev. Celokupno DNA smo ekstrahirali iz celotnih prsnih delov čebel delavk. Pomnoževali smo mitohondrijski regiji t-RNA_{leu}-Cox2 in COI. Rezultati spremljanja mitohondrijske linije kandidatnih matičarjev so bili znani v februarju 2022.

Dodatno smo preverili haplotip mitohondrijske regije t-RNA_{leu}-Cox2 pri nekaterih kandidatnih matičarjih (izbor) z vzorčenjem aprila 2022 – vzorec je bil 1 buba delavke. Skupno smo v aprilu 2022 vzorčili po 1 do 2 bubi čebel delavk pri enem ali dveh od izbranih matičarjev pri 29 vzrejevalcih.

2.6 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC

2.6.1 Poizkus 2020 - 2021

V letu 2020 so priprave na proučitev vpliva prezimovanja čebeljih matic 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.

2.6.2 Poizkus 2021 - 2022

Za preizkus prezimljanja matic v banki matic v sezoni 2021 smo se glede na rezultate odločili, da spremenimo nekatere parametre preizkusa: transportne matičnice, ki smo jih za prezimljanje matic uporabljali v lanski sezoni, smo zamenjali z lesenimi (Zandrove) matičnicami; hkrati smo spremljali in beležili temperaturo in vlago v banki matic. Temperatura v zatemnjeni klimatizirani komori v času prezimovanja matic je bila 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).

2.6.3 Preverba kakovosti teh čebeljih matic

Preživele matice iz banke smo vstavili v gospodarske družine in jih spremljali. Del matic (1) smo secirali, izmerili maso ovarijev ter razmerje živi : mrtvi spermatozoidi v spermateki. Spremljali smo tudi velikost in kvaliteto zalege v družini.

2.6.4 Proučitev ekonomske zanimivosti prezimovanja čebeljih matic

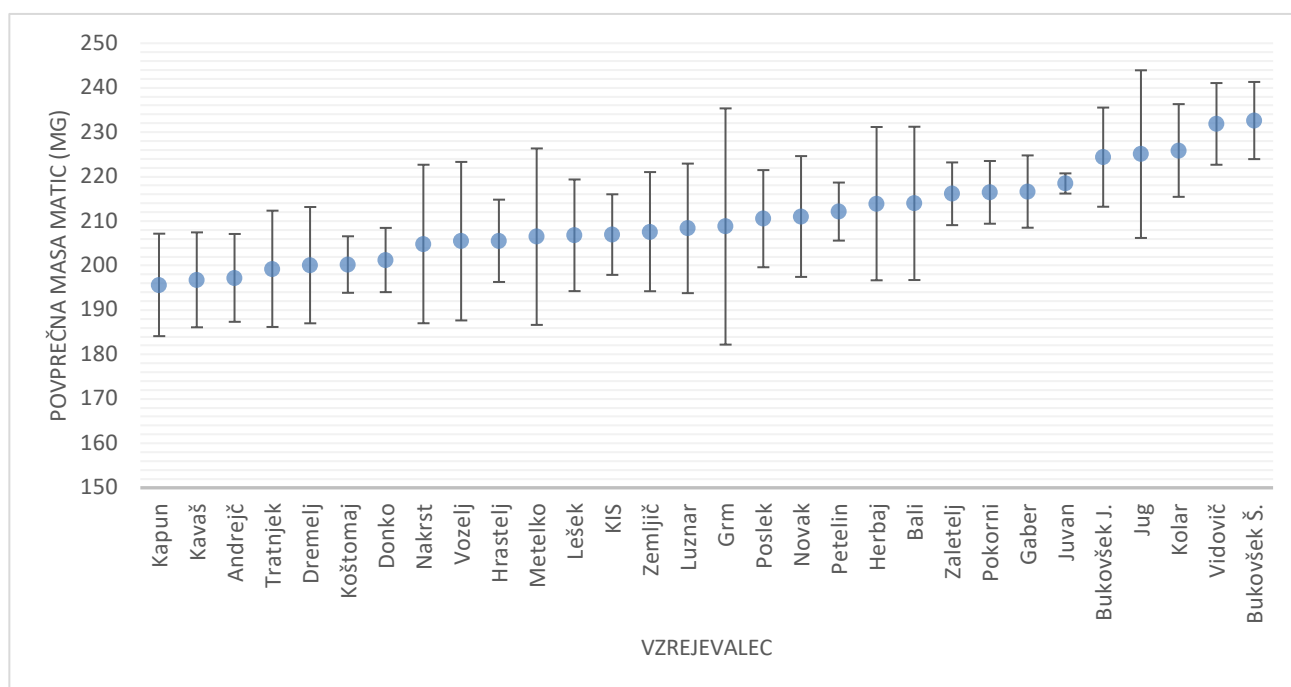
Pregledali smo ponudbo gospodarskih in rodovniških matic ter prezimljenih gospodarskih matic na slovenskem in nekaterih tujih trgih. Cene smo primerjali s cenami prezimljenih čebeljih družin in opravili pregled načinov prezimovanja matic v različnih čebelarstvih. Nadalje smo pregledali ponudbo gospodarskih in rodovniških matic ter prezimljenih gospodarskih matic na slovenskem in nekaterih tujih trgih. Cene smo primerjali s cenami prezimljenih čebeljih družin. Cene, ki smo jih zbrali, so vezane na evropsko tržišče.

3 REZULTATI

3.1 SPREMLJANJE MORFOLOŠKIH IN FIZIOLOŠKIH PARAMETROV ČEBELJIH MATIC

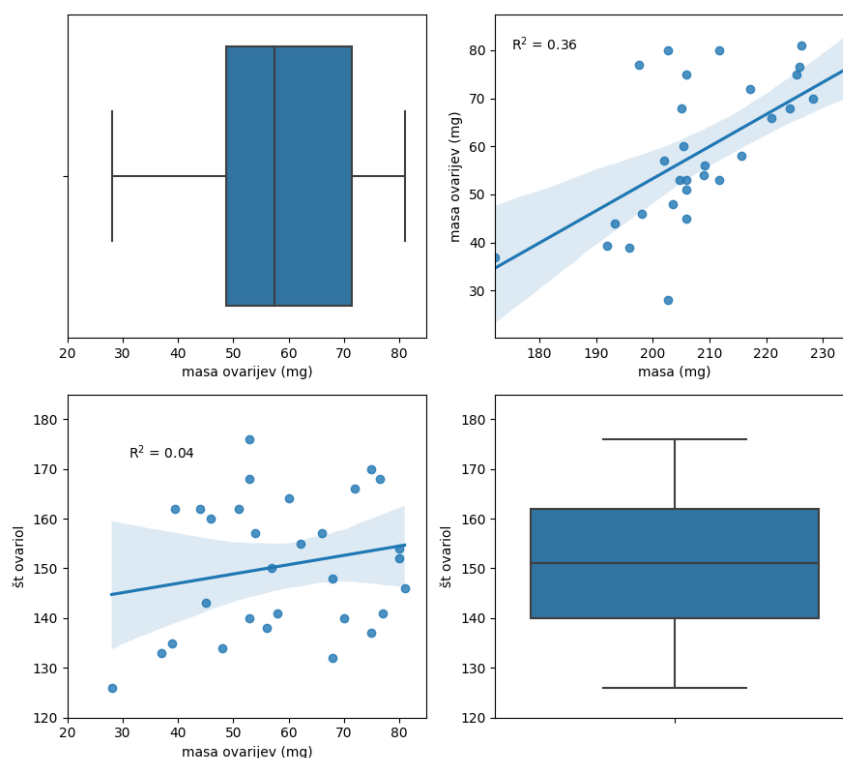
3.1.1 Leto 2020

V 2020 je bilo vključenih v testiranje 180 matic. Po posameznem vzrejališču smo tehtali po pet matic in izračunali povprečne vrednosti po vzrejališču (Slika 3). Največja povprečna masa v letu 2020 je bila 232.62 mg in najmanjša 195.64 mg, povprečje pa je bilo pri 210.1 ± 15.43 matic je imelo maso pod 200 mg. Na osmih vzrejališčih so imele vse matice maso, višjo od 200 mg.

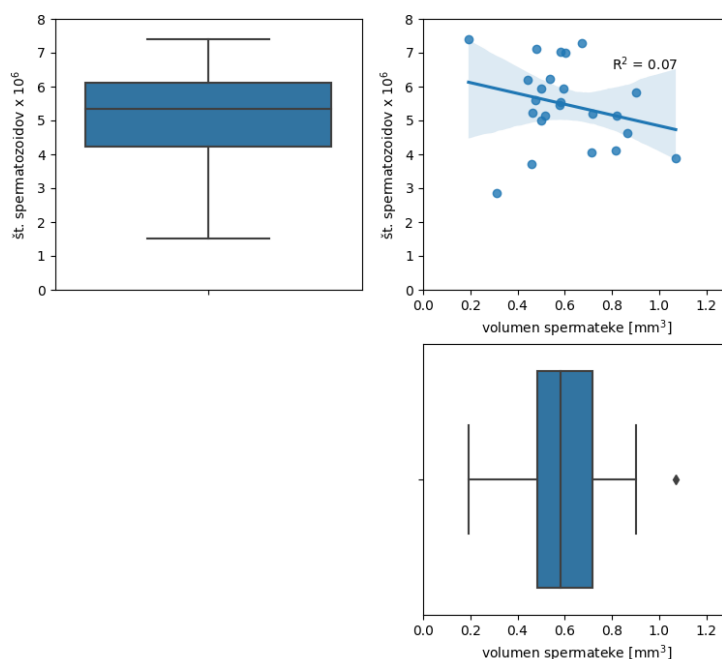


Slika 3. Povprečna masa matic iz vzrejališč v letu 2020. Zadnjih sedem (Gaber - Bukovšek Š.) je v prvem kvartilu.

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 ± 13.5 . Korelacija med eno in drugo spremenljivko je bila šibka, $R^2 = 0.04$; korelacija med maso matic in maso ovarijev pa $R^2 = 0.36$ (Slika 4). Nadalje smo vsaki matici odstranili spermateko, ter le-tej pod lupo odstranili trahealno ovojnico, izmerili njen premer s programom AxioVision ter izračunali povprečni volumen: $0.61 \pm 0.19 \text{ mm}^3$. 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 5). Pri štirih maticah števila spermatozoidov ni bilo možno določiti zaradi poškodb spermateke med odstranjevanjem trahealne ovojnice.



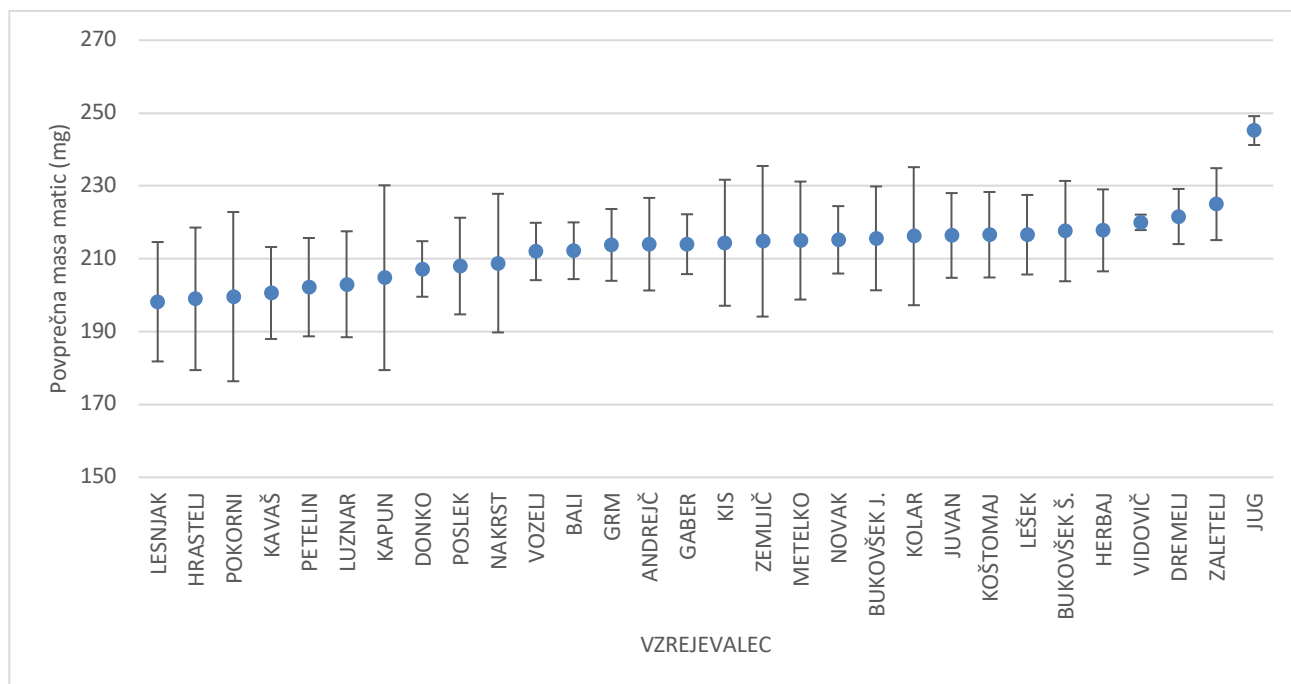
Slika 4. Masa ovarijev (levo zgoraj) in število ovariol (desno spodaj) v letu 2020. Odnos med maso ovarijev ter številom ovariol (levo spodaj) ter odnos med maso matic in maso ovariol (desno zgoraj).



Slika 5. Število spermatozoidov (zgoraj levo), volumen spermateke (spodaj desno) in odnos med volumnom spermateke ter številom spermatozoidov (zgoraj desno) v letu 2020.

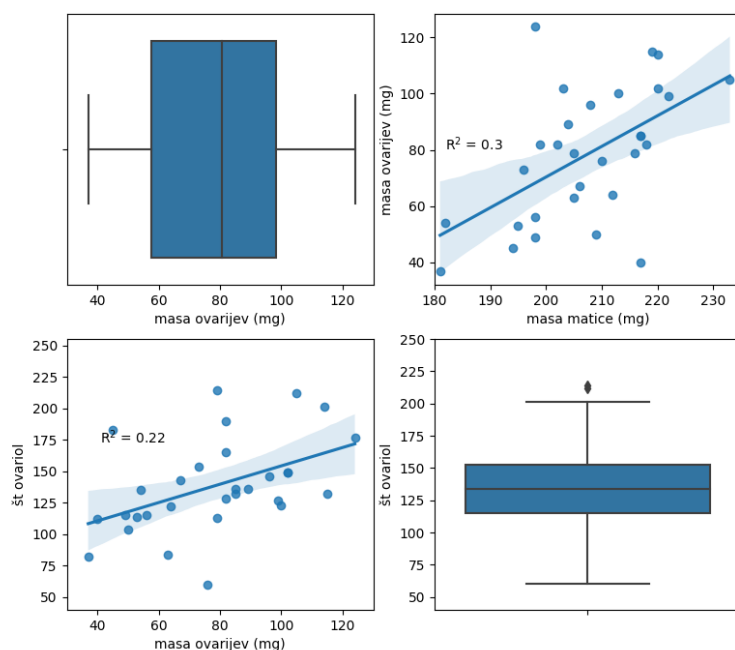
3.1.2 Leto 2021

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 6). Največja povprečna masa v letu 2021 je bila 250 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.

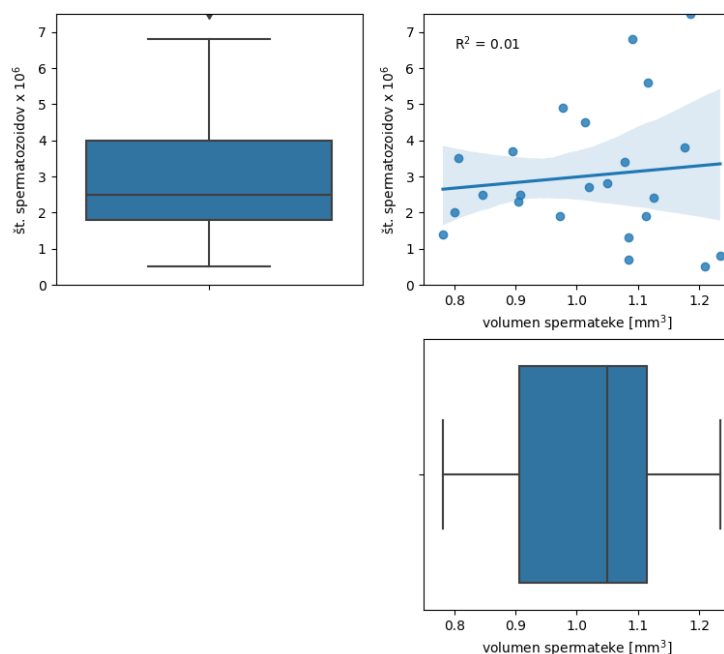


Slika 6. Povprečna masa matic iz vzrejališč. Zadnjih sedem (Lešek – Jug) je v prvem kvartilu.

Na deležu vzorčene populacije (30 matic s treh vzrejališč) smo z disekcijo abdomna odstranili ovarije, jih tehtali 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 7). Določili smo povprečni volumen spermatek in sicer $1.02 \pm 0.13 \text{ mm}^3$. Prešteli smo tudi spermatozoide v posamezni spermateki, povprečno število je $2.98 \pm 1.85 \times 10^6$. Korelacija med eno in drugo količino je zelo šibka, $R^2 = 0.01$ (Slika 8). Pri sedmih maticah ni bilo mogoče oceniti velikosti spermateke in določiti števila spermatozoidov zaradi poškodbe spermateke med odstranjevanjem trahealne ovojnice. Ocenili smo delež živih spermatozoidov v vzorcih: v povprečju je bil delež živih spermatozoidov v vzorcu $0,83 \pm 0,14$; minimalni delež je bil 0,31, maksimalni delež živih spermatozoidov pa 0,98.



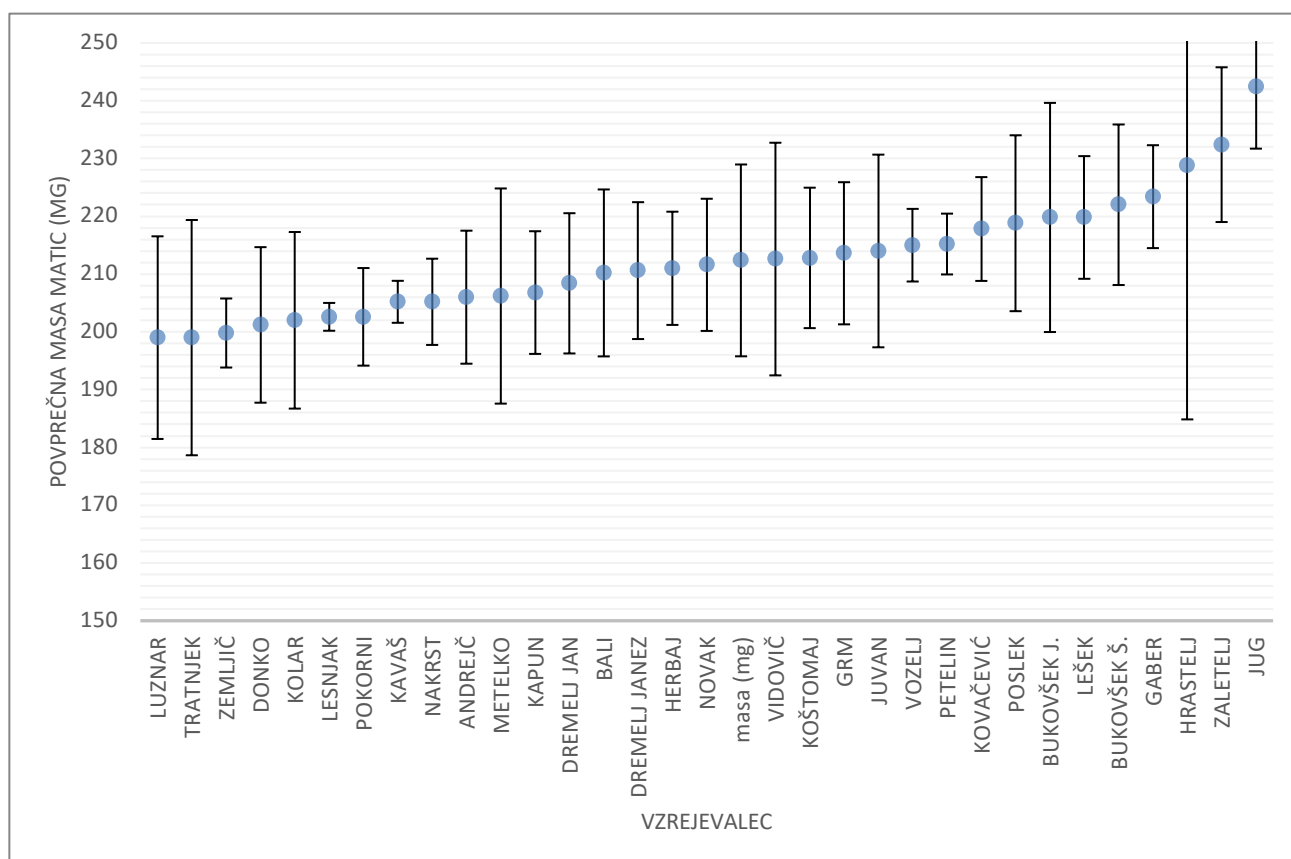
Slika 7. Masa ovarijev (zgoraj levo) in število ovariol (spodaj desno). Odnos med maso matic in maso ovarijev (desno zgoraj) ter med maso ovarijev in številom ovariol (spodaj levo).



Slika 8. Število spermatozoidov (zgoraj levo), volumen spermateke (spodaj desno) in odnos med volumenom spermateke ter številom spermatozoidov (zgoraj desno) v letu 2021.

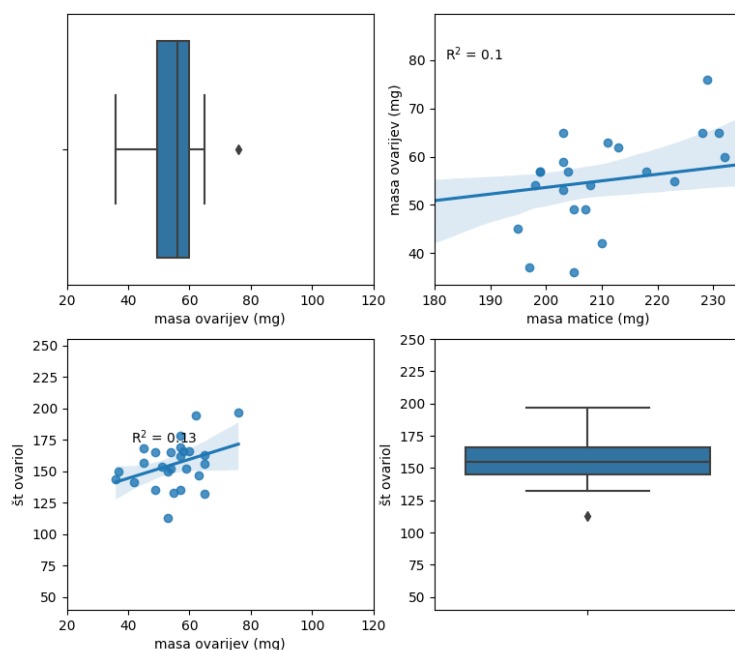
3.1.3 Leto 2022

V letu 2022 je bilo vključenih v merjenje mase 186 matic. Po posameznem vzrejališču smo tehtali po pet matic, na enem deset in na treh po dvanajst matic. Zračnili smo povprečne vrednosti po vzrejališču (Slika 9). Največja povprečna masa v letu 2022 je bila 305 mg in najmanjša 163 mg; povprečje je bilo pri 211.8 ± 17.3 mg. 35 matic je imelo maso nižjo od 200 mg, na 13 vzrejališčih so imele vse matice maso enako ali višjo 200 mg.

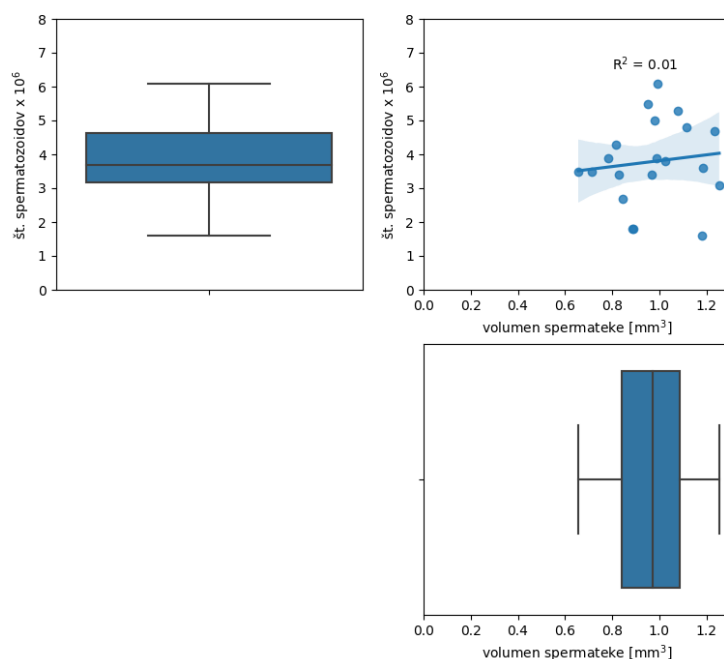


Slika 9. Povprečna masa matic iz vzrejališč v letu 2022. Zadnjih sedem (Poslek - Jug) je v prvem kvartilu.

Na deležu vzorčene populacije (26 matic s štirih vzrejališč) smo določili povprečno maso ovarijev $54,8 \pm 9,1$ mg in povprečno število ovariol $155,5 \pm 18,7$. Korelacija med obema merjenima parametrom je bila šibka, $R^2 = 0.13$; korelacija med maso matic in maso ovarijev pa še šibkejša, $R^2 = 0.1$ (Slika 10). Povprečni volumen spermatek v letu 2022 je bil $0,97 \pm 0,17 \text{ mm}^3$; povprečni število spermatozoidov v spermateki pa je bilo $3,76 \pm 1,2 \times 10^6$. Korelacija med eno in drugo količino je bila šibka, $R^2 = 0.01$ (Slika 11). Ocenili smo tudi delež živih spermatozoidov v vzorcu. V povprečju je bilo živih $0,79 \pm 0,18$; minimalni delež živih je bil 0,16 in maksimalni 0,96.



Slika 10. Masa ovarijev (zgoraj levo) in število ovariol (spodaj desno) v letu 2022. Odnos med maso matic in maso ovarijev (desno zgoraj) ter med maso ovarijev in številom ovariol (spodaj levo).



Slika 11. Število spermatozoidov (zgoraj levo), volumen spermateke (spodaj desno) in odnos med volumnom spermateke ter številom spermatozoidov (zgoraj desno).

3.2 DIAGNOSTIKA – PRISOTNOST SPOR *NOSEMA* SPP.

Rezultati pregleda iztrebkov na prisotnost spor *Nosema* spp. za let 2020, 2021 in 2022 so predstavljeni v preglednici (Tabela 3), iz katere je razvidna stopnja okuženosti čebeljih matic ter primerjava s prejšnjimi leti.

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

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

3.2.1 Leto 2020

Nosema smo zaznali na štirih vzrejališčih in sicer v iztrebkih devetih matic. Ugotovili smo, da je bilo v letu 2020 s sporami okuženih 5 % matic. To je več kot v letih 2018 in 2019 in manj kot v letu 2016. Pri spremljevalkah matic iz 5 vzrejališč, ki smo jih uporabili za disekcijo, smo zaznali prisotnost spor *Nosema* spp. pri 23 vzorcih od 30.

3.2.2 Leto 2021

Nosema smo zaznali v iztrebkih enaintridesetih matic z 19 vzrejališč. Ugotovili smo, da je bilo v letu 2021 s sporami okuženih 20,6 % matic. To je več kot v letih 2016 - 2020. V vseh vzorcih spremljevalk matic – z izjemo enega – ki smo jih uporabili za disekcijo, smo zaznali prisotnost spor *Nosema* spp. (29/30). Pri pregledu preparatov iz črevesa pri 30 maticah v sekciji smo zaznali prisotnost spor *Nosema* spp. pri 9 maticah (30 %).

3.2.3 Leto 2022

Nosema smo zaznali v iztrebkih sedemnajstih matic z 13 vzrejališč. Ugotovili smo, da je bilo v letu 2022 s sporami okuženih 9,1 % matic. To je več kot v letih 2017 – 2020 in manj kot v letih 2016 in 2021. Pri spremljevalkah matic iz 4 vzrejališč, ki smo jih uporabili za disekcijo, smo prisotnost spor *Nosema* spp. zaznali v 22 od 26 vzorcev.

3.3 DOLGOROČNO SHRANJEVANJE GENSKEGA MATERIALA

3.3.1 Leto 2020

V letu 2020 smo za krioprezervacijo trotovskega semena izbrali sestrške matice, potomke matere R510. Njihove rodovniške številke so: 30622-2018, 30623-2018, 30624-2018 in 30625-2018. 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. Zbrano je bilo približno 20 μ L semena, ki je bilo združeno ter shranjeno v zamrzovalno skrinjo na -80°C .

3.3.2 Leto 2021

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 μ L semena, ki smo ga shranili v zamrzovalni skrinji na -80°C .

3.3.3 Leto 2022

V letu 2022 smo za krioprezervacijo trotovskega semena izbrali matico z rodovniško številko 60258-2021. Troti, potomci teh matic, so bili nabrani v kletke in njihovo seme zbrano v laboratoriju. Zbrano je bilo približno dvakrat po 30 μ L semena, ki smo ga shranili v zamrzovalni skrinji na -140°C , kamor smo prestavili tudi vzorce prejšnjih let (Slika 12: Zbrano trotovsko seme (levo – letošnje, sredina – letošnje in od prejšnjih let) smo shranili na -140°C).



Slika 12: Zbrano trotovsko seme (levo – letošnje, sredina – letošnje in od prejšnjih let) smo shranili na -140°C

3.4 OBDELAVA PODATKOV ZBRANIH V OKVIRU DIREKTNEGA TESTIRANJA VZREJEVALCEV

Direktni test so izvajali vzrejevalci v selekcijskih čebelnjakih, in sicer trikrat letno. Ocenjevali so v maju, juniju in juliju, v obdobju najpogostejših paš in hitrega razvoja čebeljih družin. V tem obdobju so ocenili rasne karakteristike, rojivost, živalnost in mirnost. Enkrat na sezono so ocenili tudi naravni odpad varoj in opravili standardni pin test za določanje čistilne sposobnosti. Ob koncu čebelarke sezone so še stekali pridelek medu. V letu 2020 je rezultate direktnega testiranja oddalo 21 vzrejevalcev s 442 čebeljimi družinami (Tabela 4), v letu 2021 20 vzrejevalcev s 404 čebeljimi družinami (Tabela 5) in v letu 2022 pa 24 vzrejevalcev, ki so skupno testirali 486 družin oz. 20.3 družine na vzrejevalca (Tabela 6).

Tabela 4. Seznam vzrejevalcev, ki so v letu 2020 opravili direktni test in so oddali rezultate do 20. 8. 2020.

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

Tabela 5. 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 Zemljič	SI334080	20	20	-	da
KIS	SI340788	20	16	4	da

Tabela 6. Seznam vzrejevalcev, ki so v letu 2022 opravliali direktni test in oddali rezultate do 27. 7. 2022.

Vzrejevalec	Čebeljak	Število testiranih družin	Vse ocene	Del ocen	Čistilna sposobnost
Andrejč Jože	SI328698	20	da	ne	da
Bukovšek Štefan	SI324751	20	da	da	da
Donko Bojan	SI194204	20	da	ne	da
Dremelj Jan	SI388759	20	da	da	da
Dremelj Janez	SI320784	20	da	da	da
Gaber Viktor	SI266129	20	da	da	da
Grm Darko	SI154525	20	da	da	da
Herbaj Jožef	SI206172	21	da	da	da
Hrastelj Marko	SI368540	20	da	da	da
Kapun Erik	SI144355	20	da	da	da
Koštomaj Matija	SI304467	20	da	da	da
Lesnjak Tomaž	SI354361	31	da	da	da
Lešek Venčeslav	SI341028	20	da	da	da
Luznar Erik	SI104201	20	da	da	da
Nakrst Mitja	SI351494	20	da	da	da
Novak Miha	SI348605	20	da	da	da
Petelin Irma	SI210322	21	da	da	da
Pislak Bali Robert	SI101871	20	da	da	da
Poslek Boris	SI348937	20	da	da	da
Vidovič Jože	SI338158	20	da	da	da
Vozelj Ladislav	SI154075	20	da	da	da

Vzrejevalec	Čebelnjak	Število testiranih družin	Vse ocene	Del ocen	Čistilna sposobnost
Zaletelj Henrik	SI291402	20	da	da	da
Zemljč Andrej	SI334080	20	da	da	da
KIS	SI340788	13	ne	da	da

V prvi fazi analize smo izračunali povprečne vrednosti posameznih ocen in meritev, ki jih ločeno prikazujemo za vsako leto posebej (2020: Tabela 7, 2021:

Tabela 8; za 2022: Tabela 9).

Tabela 7. Povprečne vrednosti posameznih ocen in meritev za leto 2020.

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	3.40		3.42	442
Odpad varoj			5.92	402
Pridelek medu			13.8	441
Čistilna sposobnost			69.2	441

Tabela 8. Povprečne vrednosti posameznih ocen in meritev za leto 2021.

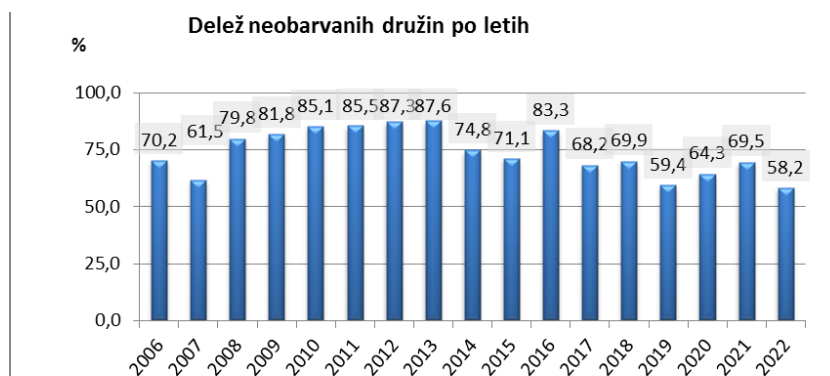
Lastnost	maj	junij	julij	N meritev
Obarvanost	3.74	3.72	3.73	400
Mirnost	3.37	3.41	3.44	399
Rojivost		3.46		383
Živalnost	3.27		3.42	401
Odpad varoj			0.78	362
Pridelek medu			5.1	380
Čistilna sposobnost			73.9	383

Tabela 9. Povprečne vrednosti posameznih ocen in meritev za leto 2022.

Lastnost	maj	junij	julij	N meritev
Obarvanost	3.69	3.74	3.74	486
Mirnost	3.39	3.38	3.42	486
Rojivost		3.36		485
Živalnost	3.38		3.44	486
Odpad varoj			5.56	473
Pridelek medu			22.6	453
Čistilna sposobnost			70.94	483

3.4.1 Rasne karakteristike – obarvanost obročkov zadka

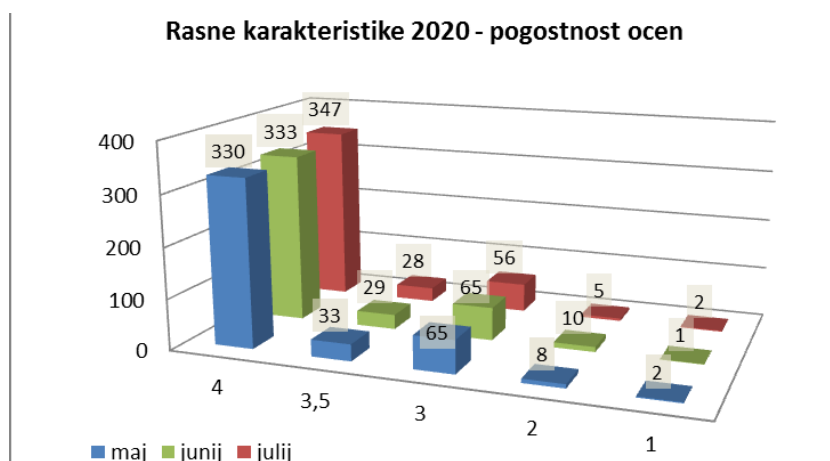
Delež neobarvanih družin v letu 2022 je bil le 58,2 % (slika 13). Osem družin (1,6 %) je vsaj enkrat dobilo oceno 1 ali 2, kar pomeni, da bi matice teh družin morale zamenjati z bolj ustreznimi. V letih 2020 je bil delež neobarvanih družin 64,3 %, v letu 2021 pa 69,5 %.



Slika 13. Delež družin brez obarvanih čebel po letih direktnega testiranja.

3.4.1.1 Leto 2020

Obarvanost zadkov, s katero poskušamo oceniti pasemsko čistost čebeljih družin, je bila v letu 2020 ocenjena v vseh treh ocenjevanjih, v maju, juniju in juliju. Povprečna obarvanost za to leto je okoli 3.75. Ob koncu sezone je bil delež obarvanih družin najvišji (Slika 14). Delež neobarvanih družin je bil 64,3 % (Slika 13). 16 družin (3,7 %) je vsaj enkrat dobilo oceno 1 ali 2, kar pomeni, da bi morali matice teh družin zamenjati z bolj ustreznimi.

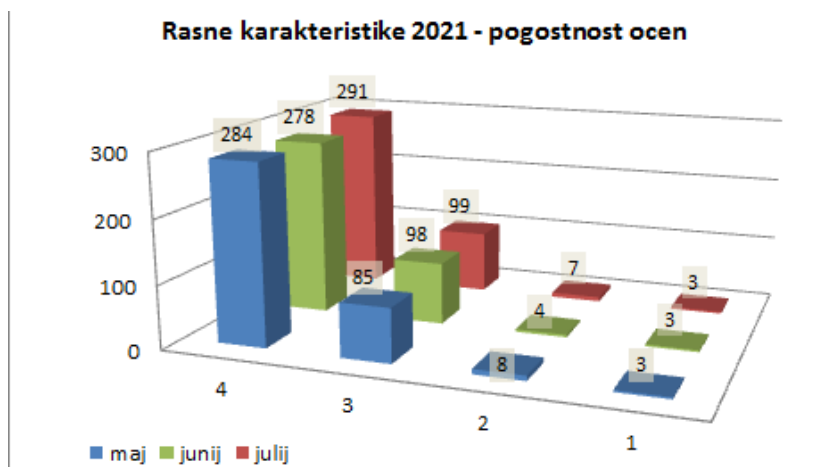


Slika 14. Pogostost posameznih ocen obarvanosti v letu 2020.

3.4.1.2 Leto 2021

Obarvanost zadkov v letu 2021 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 15).

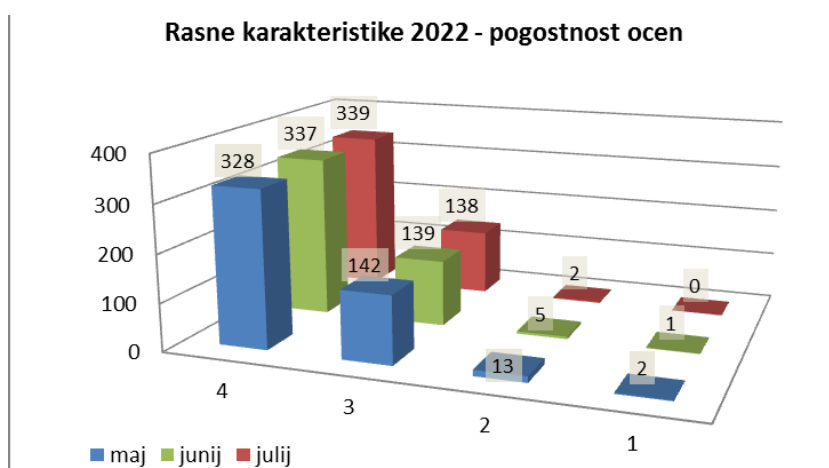
Delež neobarvanih družin v letu 2021 je bil 69.5 % (Slika 13). 16 družin (3.7 %) je vsaj enkrat dobilo oceno 1 ali 2.



Slika 15. Pogostnost posameznih ocen obarvanosti v letu 2021.

3.4.1.3 Leto 2022

Obarvanost zadkov, s katero poskušamo oceniti pasemsko čistost čebeljih družin, je bila tudi v 2022 ocenjena v vseh treh ocenjevanjih, v maju, juniju in juliju. Povprečna obarvanost se ni spremenila in je bila okoli 3.73 (Slika 16), čeprav so bile ocene v maju malenkost nižje od preteklih let (3.69, Slika 13).

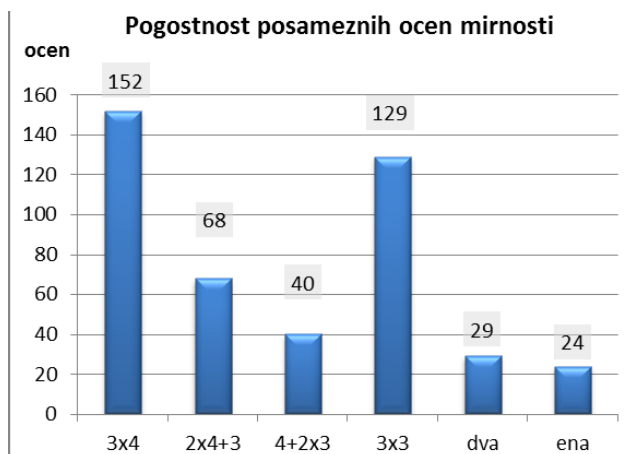


Slika 16. Pogostnost posameznih ocen obarvanosti v letu 2022.

3.4.2 Mirnost ali obnašanje

3.4.2.1 Leto 2020

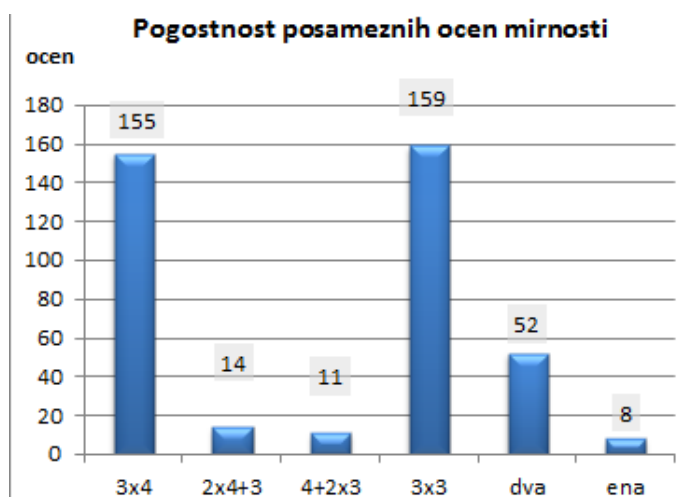
Vsaka družina je bila trikrat ocenjena na mirnost. V maju smo ocenili 441 družin, v juniju in juliju 442. 151 družin je dobilo oceno 4, kar zanaša 34 % družin. Oceno 2 ali manj je dobilo 53 družin ali 12 % (Slika 17). Povprečna mirnost družin je prikazana 17. V maju in juniju je znašala 3.76 ter v juliju 3.79.



Slika 17. Pogostost posameznih ocen mirnosti v letu 2020. Prvi trije stolpci prikazujejo, kolikokrat je bila ista družina ocenjena z najvišjo oceno 4.

3.4.2.2 Leto 2021

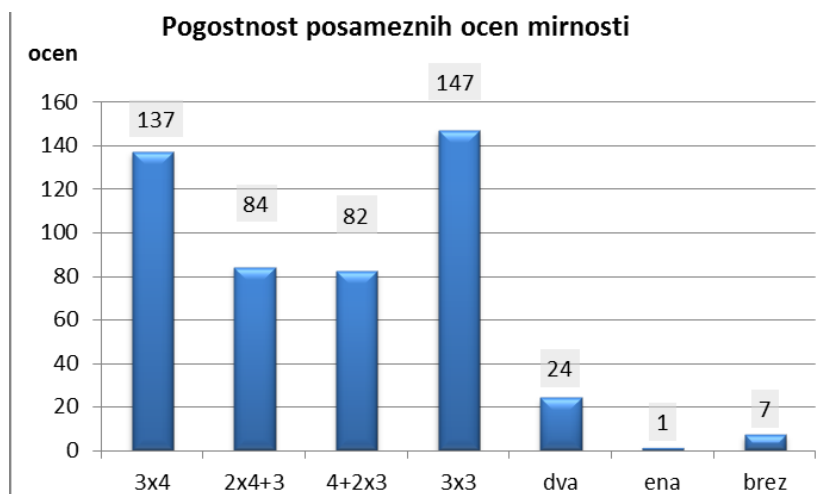
V letu 2021 smo ocenili 380 družin v maju, 383 družin v juniju ter 399 družin v juliju. Povprečna ocena mirnosti v posameznih mesecih je prikazana na sliki (Slika 18) in znaša 3.73. Le okoli 39 % družin je vedno dobilo oceno 4. Oceno 2 ali manj je dobilo 60 družin ali 15 % (Slika 18).



Slika 18. Pogostost posameznih ocen mirnosti v letu 2021. Prvi trije stolpci prikazujejo, kolikokrat je bila ista družina ocenjena z najvišjo oceno 4.

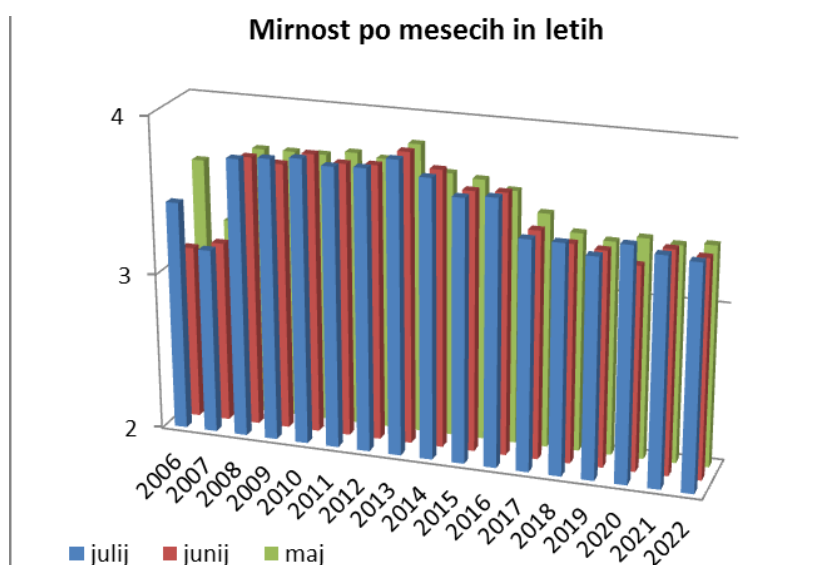
3.4.2.3 Leto 2022

Vsaka družina je bila trikrat ocenjena na mirnost: v maju 486, v juniju 482 in v juliju 479 družin. Povprečna ocena mirnosti v posameznih mesecih je prikazana v tabeli 2. Le okoli 28 % družin je vedno dobilo oceno 4. Oceno 2 ali manj je dobilo 8 družin ali 5.1 % (Slika 19).



Slika 19. Pogostnost posameznih ocen mirnost v letu 2022. Prvi trije stolpci prikazujejo, kolikokrat je bila ista družina ocenjena z najvišjo oceno 4.

Testiranja zadnjih let prikazujejo trend zmanjševanja mirnosti čebeljih družin. V zadnjem obdobju imajo vzrejevalci navodila, da so pri ocenjevanju lastnosti v direktnem testu bolj strogi. S tem želimo premakniti razporeditev ocen proti sredini skale. Zelo dobre družine pri tem načinu bolj pridejo do izraza. Ta navodila se odražajo v znižanju povprečju, ki pa se je sedaj ustalilo (Slika 20).



Slika 20. Povprečna mirnost po mesecih in letih testiranja.

3.4.3 Rojivost

3.4.3.1 Leto 2020

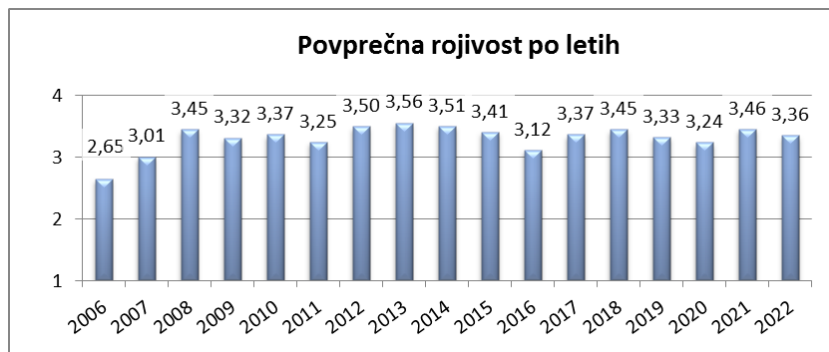
Ocenjevanje rojivosti se izvaja v juniju, v času najintenzivnejšega razvoja čebeljih družin. Ocenjenih je bilo 442 družin. Le 52.9 % družin ni poskusilo rojiti, pri 29.7 % so čebele same podrle matičnjake. V 11.1 % družin je čebelar s trdom preprečil rojenje in kar 6.1 % družin je izrojilo. Leto 2020 je bilo eno izmed bolj rojivih let (Slika 21).

3.4.3.2 Leto 2021

Ocenjevanje rojivosti se je prav tako izvajalo v juniju. 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 trdom preprečil rojenje in le 2.6 % družin je izrojilo. Presenetljivo je leto 2021 eno najmanj rojivih let (Slika 21).

3.4.3.3 Leto 2022

Ocenjevanje rojivosti je v juniju, v času najintenzivnejšega razvoja čebeljih družin. Ocenjenih je bilo 486 družin. 57.1 % družin ni poskusilo rojiti, pri 30.3 % so čebele same podrle matičnjake. V 8.9 % družin je čebelar s trdom preprečil rojenje in 3.7 % družin je izrojilo. Leto 2022 je srednje rojivo leto (Slika 21).



Slika 21. Povprečna ocena rojivosti po mesecih in letih testiranja.

3.4.4 Živalnost

3.4.4.1 Leto 2020

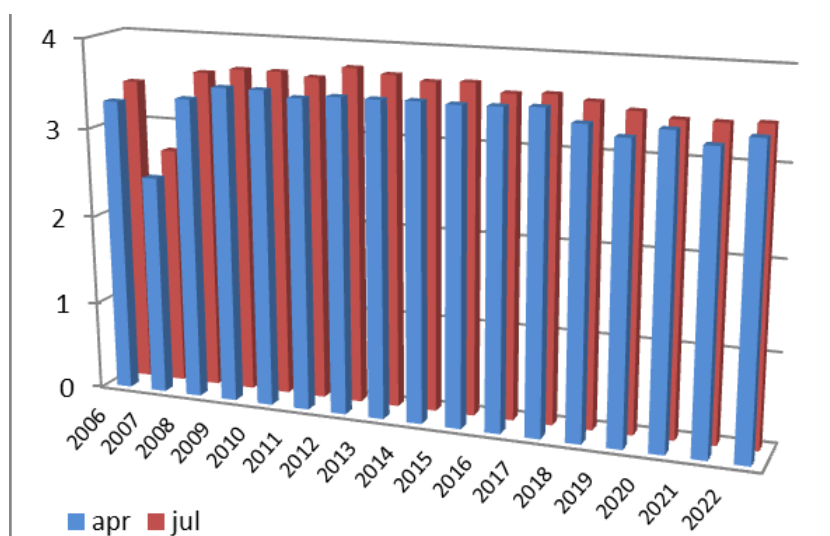
V maju in juniju je bilo ocenjenih 442 družin. Povprečna ocena v maju je bila 3.40 in v juliju 3.42 (Slika 22). Majska povprečna ocena je pričakovana nižja od julijske, saj je takrat prisotnih več pašnih čebel.

3.4.4.2 Leto 2021

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 (Slika 22). Prav tako kot v prejšnjem letu je po pričakovanjih majska povprečna ocena nižja od julijske (Tabela 8).

3.4.4.3 Leto 2022

V maju je bilo ocenjenih 486 in v juliju 473 družin. Povprečna ocena v maju je bila 3.38 in v juliju 3.44 (Tabela 9). Majska povprečna ocena je pričakovano nižja od julijske, saj je takrat prisotnih več pašnih čebel (Slika 22).

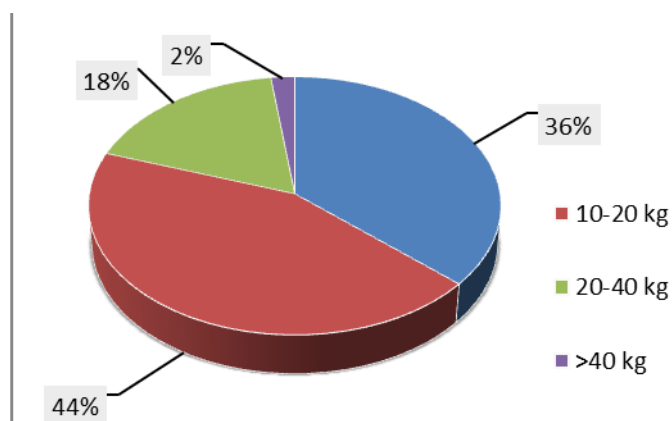


Slika 22. Povprečna ocena živalnosti po mesecih in letih testiranja.

3.4.5 Donos medu

3.4.5.1 Leto 2020

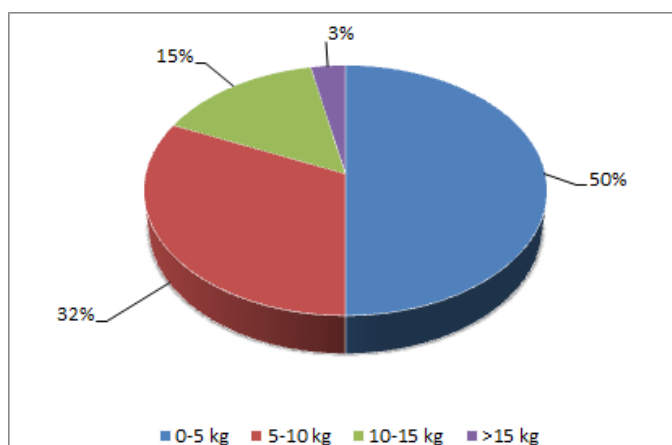
Skupni donosi medu v letu 2020 so bili med 3 in 50 kilogrami na panj. Skupno je bil donos medu izmerjen pri 441 družinah. Povprečni pridelek medu v letu 2020 je nizek in sicer znaša 13.8 kg na panj (Slika 23).



Slika 23. Delež posameznih kategorij pridelka medu v letu 2020.

3.4.5.2 Leto 2021

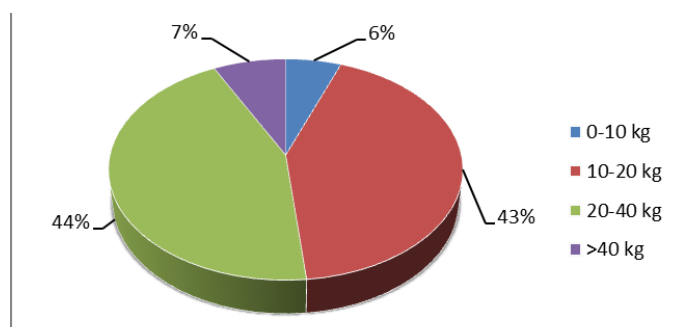
Skupni donosi medu v letu 2021 so bili med 0 in 22 kilogrami na panj. Skupno je bil donos medu izmerjen pri 380 družinah (Slika 24). Povprečni pridelek medu v letu 2021 je zaradi izredno hladne pomladi in suhega začetka poletja rekordno nizek, in sicer le 5.1 kg na panj (Slika 26).



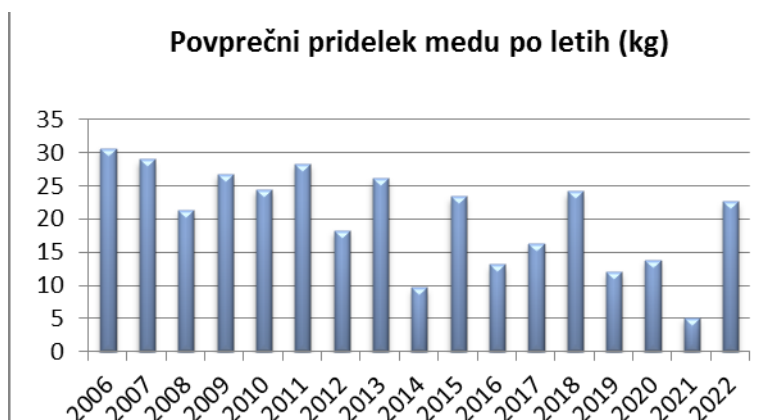
Slika 24. Delež posameznih kategorij pridelka medu v letu 2021.

3.4.5.3 Leto 2022

Skupni donosi medu v letu 2022 so bili med 3 in 43 kilogrami na panj. Skupno je bil donos medu izmerjen pri 453 družinah. Povprečni pridelek medu v letu 2022 po nekaj letih ponovno pričakovan, in sicer 22.6 kg na dan (Slika 26).



Slika 25. Delež posameznih kategorij pridelka medu v letu 2022.



Slika 26. Povprečni pridelek medu po letih.

3.4.6 Odpad varoj in čistilna sposobnost

3.4.6.1 Leto 2020

V letu 2020 je bila čistilna sposobnost pravilno izmerjena pri 441 družinah. Vse družine so bile pred in po testu tudi fotografirane. 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 28). Za vzrejo priporočamo družine, ki imajo čistilno sposobnost vsaj 90 % ali pa družine izmed najboljše tretjine v čebelnjaku.

Naravni odpad varoj je bil preverjen 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. 12.9 % družin ni imelo naravnega odpada varoj.

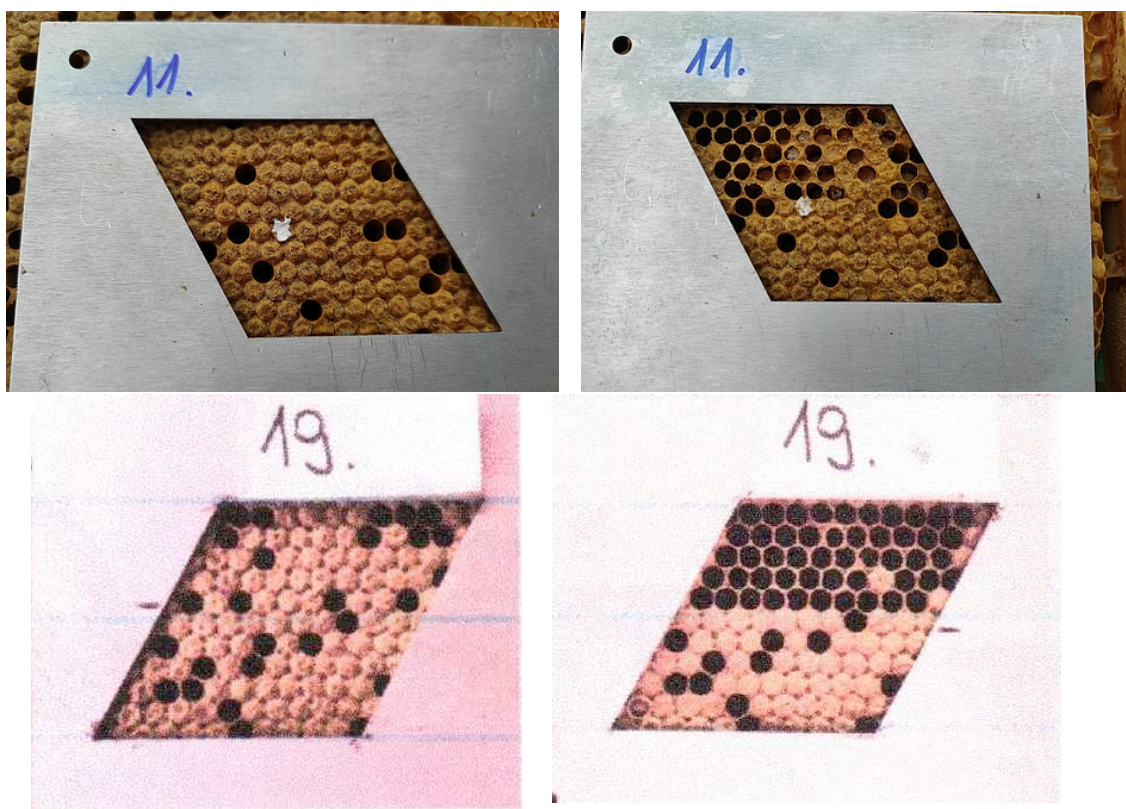
3.4.6.2 Leto 2021

V letu 2021 je bila čistilna sposobnost pravilno izmerjena pri 383 družinah. Vse družine so bile pred in po testu tudi fotografirane (Slika 27). Izmerjene vrednosti so bile med 0 in 100 % (10.7 % družin, Slika 28).

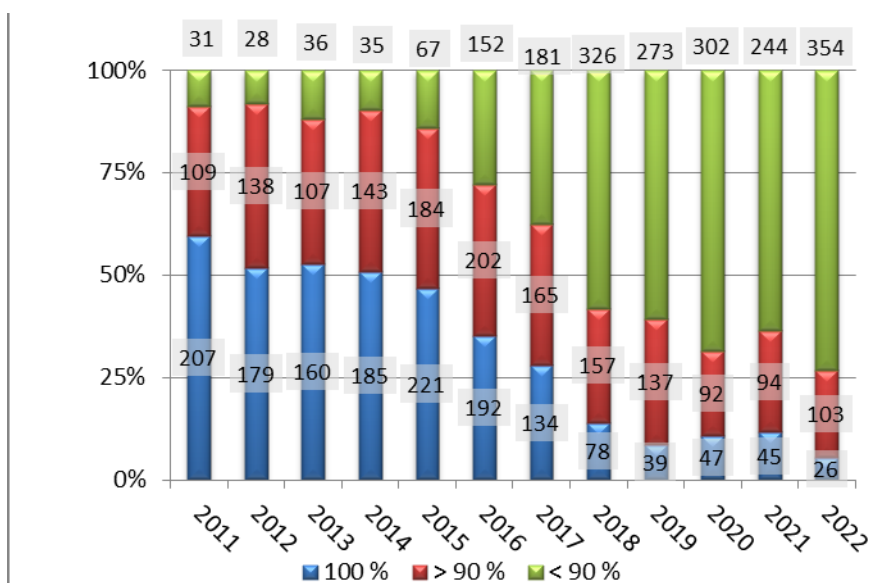
Naravni odpad varoj je bil preverjen pri 361 družinah in se je gibal med 0 in 7 varojami povprečno na dan, v povprečju pa 0.78 pršice na družino na dan. Vzrejevalci pri 12.7 % družin sploh niso zabeležili naravnega odpada varoj.

3.4.7 Leto 2022

V letu 2022 je bila čistilna sposobnost pravilno izmerjena pri 483 družinah. Naravni odpad varoj je bil preverjen pri 473 družinah in se je gibal med 0 in 43 varojami povprečno na dan, v povprečju pa 5.56 pršice na družino na dan. Kar 19 % družin sploh ni imelo naravnega odpada varoj. Spremenjena navodila za testiranje so bistveno spremenila razporeditev ocen čistilne sposobnosti. Zaradi krajšega časa testiranja so razlike med družinami bistveno večje. Izmerjene vrednosti bile med 0 in 100 % (10.7 % družin, Slika 28). Za vzrejo priporočamo družine, ki imajo čistilno sposobnost vsaj 90 % ali pa družine izmed najboljše tretjine v čebelnjaku.



Slika 27. Ocenjevanje čistilne sposobnosti. Levo sat s petdesetimi prebodenimi celicami in desno sat po 8 urah.

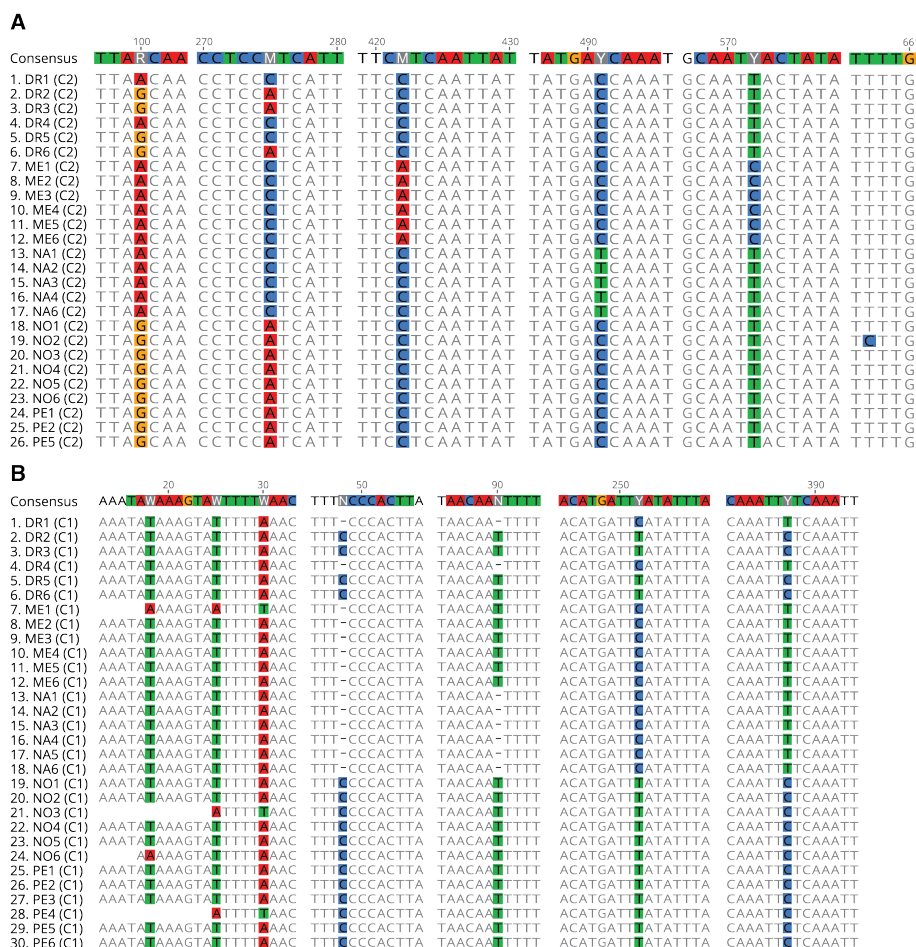


Slika 28. Razporeditev družin po oceni čistilne sposobnosti in po letih.

3.5 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE

3.5.1 Leto 2020

Z molekulsko metodo 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 29. 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).

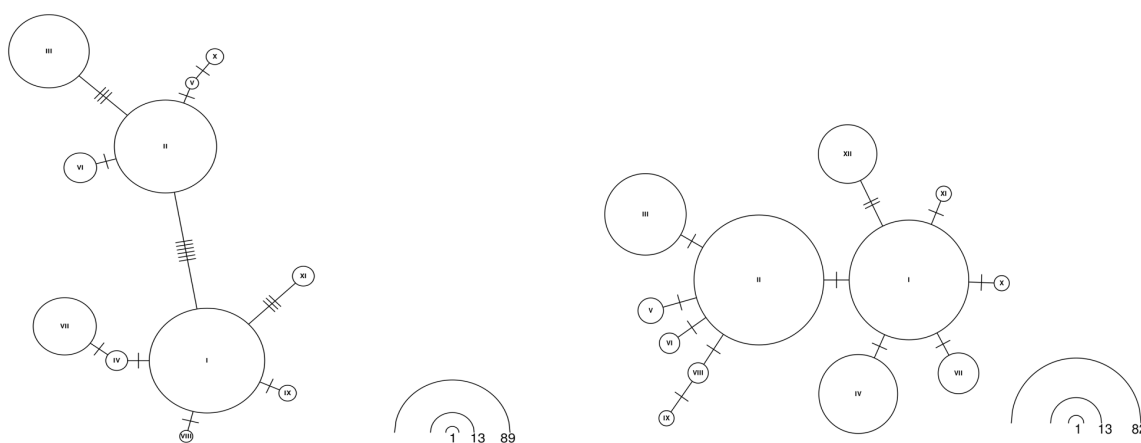
Uspešno smo pridobili nukleotidna zaporedja za markerje tRNA-Leu (30 vzorcev), COI (26 vzorcev), ND2 (26 vzorcev). Poravnana nukleotidna zaporedja za vsak marker za vse uspešno testirane vzorce so prikazana na Slika 29. Z markerjem tRNA-Leu, ki je uveljavljen pokazatelj mitohondrijske linije, smo uspešno določili mitohondrijsko linijo pri vseh vzorcih. Vsi vzorci pripadajo mitohondrijski liniji C, kar je v skladu z standardnimi metodami uvrščanja podvrst medonosne čebele in 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).

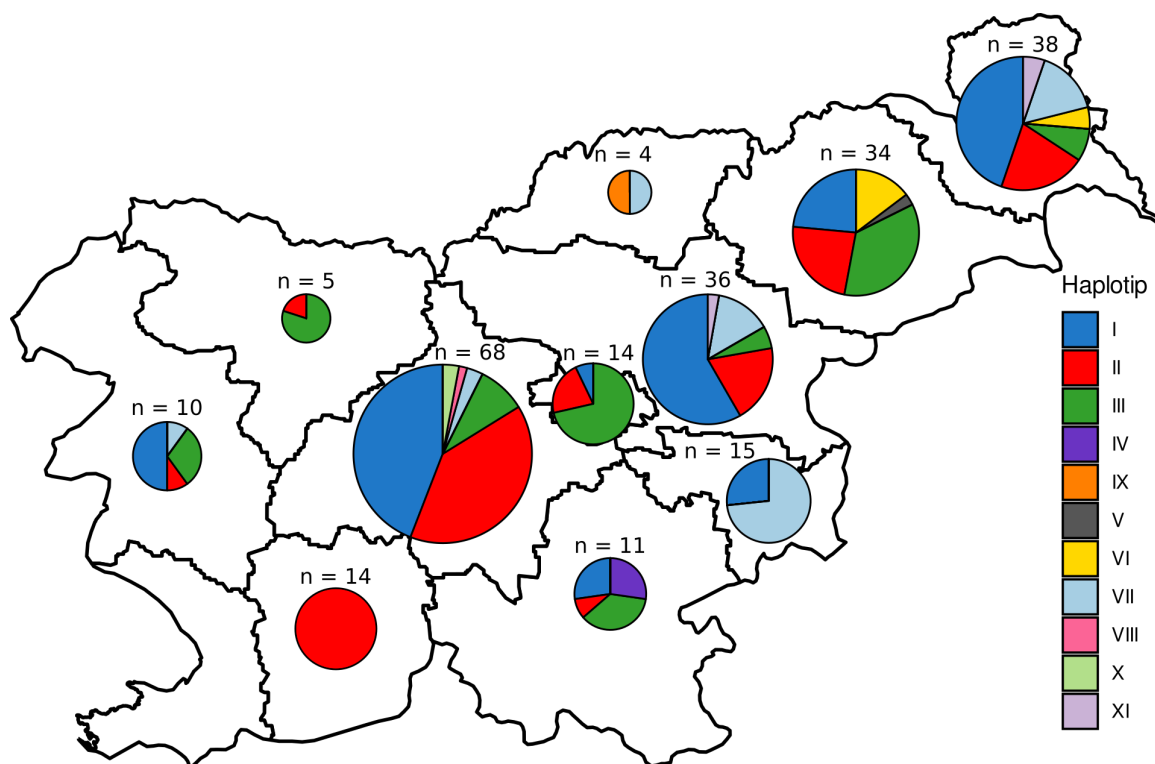
3.5.2 Leto 2021

Skupno smo pri 257 vzorcih uspešno pridobili nukleotidna zaporedja za tRNA-Leu pri 249 vzorcih in za COI pri 249 vzorcih. Vsi analizirani vzorci so pripadali mitohondrijski liniji C, kar je v skladu s standardnimi metodami uvrstitve kranjske čebele in ne odstopajo od te temeljne genetske značilnosti. Genetska osnova kandidatnih matičarjev je bila ustrezna. Med vzorci smo določili 11 različnih haplotipov za označevalec tRNA-Leu. Poravnava zaporedij tRNA-Leu je vsebovala 19 variabilnih mest.

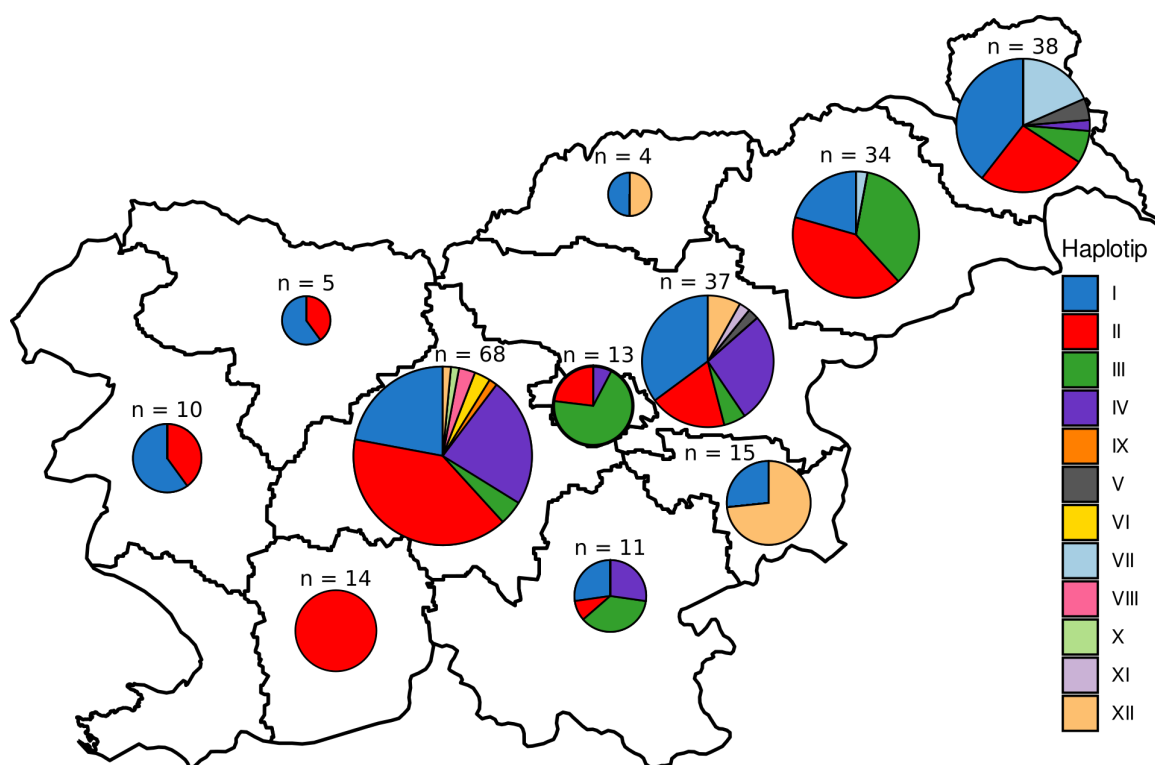
Označevalec COI je uveljavljen v sistematiki kot »barcode« za določanje vrst, pri medonosni čebeli pa manj pogosto uporabljen (Syromyatnikov in sod., 2018; Bubnič in sod., 2020). Naši preliminarni rezultati iz leta 2020 so pokazali znatno variabilnost in s tem uporabnost tega označevalca. Za označevalec COI smo določili 12 različnih haplotipov. Poravnava zaporedij COI vsebuje 10 variabilnih mest. Slika 30 prikazuje haplotipske mreže za posamezen označevalec, deleži posameznih haplotipov po statističnih regijah pa so ravno tako prikazani na slikah (Slika 31 in Slika 32).



Slika 30. 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 mutacij.



Slika 31. Zastopanost haplotipov tRNA-Leu po regijah. Velikost krogov je sorazmerna številu vzorcev.



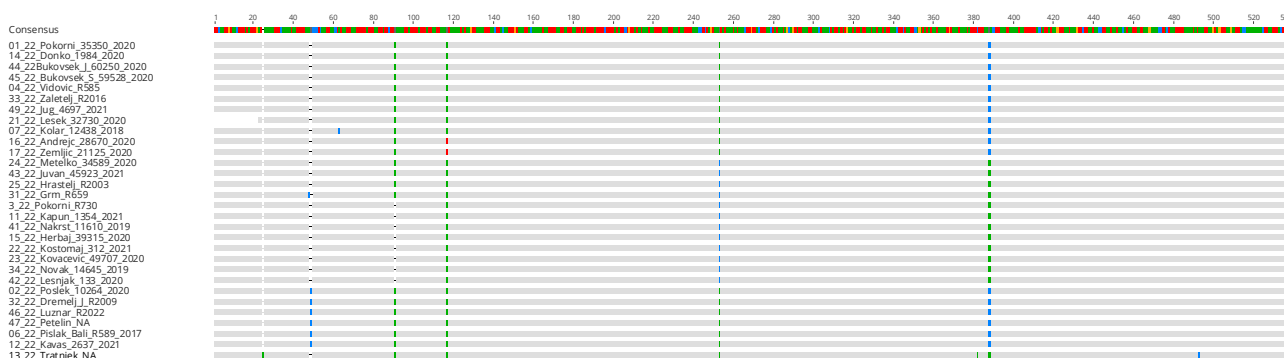
Slika 32. Zastopanost haplotipov COI po regijah. Velikost krogov je sorazmerna številu vzorcev.

3.5.3 Leto 2022

V Letu 2022 smo analizo napram letu 2021 še dodatno razširili. Jeseni smo vzorčili 284 družin pri 31 vzrejevalcih. Zaporedje tRNA_{Leu}-Cox2 smo uspešno pomnožili in ga določili pri 280 vzorcih. Zaradi razlik v kakovosti in dolžini pridobljenih zaporedij smo za nadaljnje analize po poravnavi uporabili zaporedja 277 vzorcev, ki so bila zadosti zanesljiva in dovolj dolga.

Vsi analizirani vzorci so **pripadali mitohondrijski liniji C**, kar je v skladu s standardnimi metodami uvrstitve kranjske čebele ter ne odstopajo od te temeljne genetske značilnosti. Genetska osnova vseh analiziranih kandidatnih matičarjev je bila ustrezna. Med vzorci smo določili 11 različnih haplotipov zaporedij označevalca tRNA-Leu.

Za označevalec COI smo določili 244 zaporedij, med katerimi smo identificirali 10 haplotipov. Dodatno smo v aprilu 2022 vzorčili po 1 bubo čebele delavke pri enem od izbranih matičarjev pri 29 vzrejevalcih in preverjali ustreznost mitohondrijske linije z zaporedjem tRNA_{Leu}-Cox2. Skupno smo imeli 30 vzorcev (2 vzorca sta pripadala matičarjem istega vzrejevalca), vsi analizirani vzorci so **pripadali mitohondrijski liniji C**.



Slika 22. Regija tRNA_{Leu}-Cox2 pri izbranih vzorcih matičarjev, vzorčenih v aprilu 2022. Siva barva označuje enako zaporedje, modra, zelena in rdeča pa označujejo mesta z razlikami v nukleotidnem zaporedju.

Med 29 vzorci smo določili 8 haplotipov mitohondrijske regije tRNA_{Leu}-Cox2.

3.6 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC

3.6.1 Poizkus 2020 - 2021

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 33).



Slika 33. 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 kateri 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 preverjali 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.

3.6.2 Poizkus 2021 - 2022

Poskus smo zopet zastavili v dveh paralelkah: prezimovanje z uporabo banke matic z več matičnicami in prezimovanje z nizkovolumskimi plemenilniki. V bankah smo namesto transportnih matičnic uporabili Zandrove (lesene) matičnice; vzpostavili smo štiri banke - družine brez lastne matice - v temperiranem kontejnerju (16°C) in štiri kontrole (s po eno matico) v istem prostoru. Vsem smo naknadno omogočili iztrebljanje preko cevi skozi steno. Banke in kontrole smo pregledovali ob primernem vremenu. Vse štiri kontrole so prezimile z izjemo ene, ki je izgubila matico. Propad matic v bankah 1, 2 in 3 je bil ugotovljen 9. 2. 2022. Ena od matic B4 je bila uporabljena za revitalizacijo kontrolne družine, ki je izgubila matico, druga je bila izpuščena iz kletke v banko kot normalna matica družine. Obe matici sta bili sprejeti in sta uspešno zalegali do menjave.

Tabela 10. Število preživelih matic v bankah preko zime 2021 - 2022.

	B1	B2	B3	B4
03/09/2021	44	40	40	40
06/09/2021	40	36	40	37
10/09/2021	35	36	39	35
14/09/2021	31	35	39	35
23/09/2021	28	35	39	35
29/09/2021	28	35	39	35
08/10/2021	5	29	38	24
11/10/2021	4	21	36	23
09/02/2022	0	0	0	2

Nizkovolumske plemenilnike (Kieler) smo za namen prezimovanja opremili z nakladnicami za dodatno zalego in hrano. V poskus so šli plemenilčki različnih volumnov (1 x 4 dodatne naklade, 11 x 2 dodatni nakladi in 4 x 1 dodatna naklada). Nekatere smo namestili v temperirani kontejner (16°C) brez možnosti izleta, druge smo namestili na odprto mesto pred KIS.

Propadli so vsi poskusi prezimovanja matic v plemenilčkih v temperiranem kontejnerju. Plemenilniki niso imeli možnosti iztrebljanja, in predvidevamo, da je bil to glavni razlog za propad. V plemenilnikih, ki so bili nameščeni izven kontejnerja, se je pojavila težava s količino hrane: trije, ki so preživel (oz. živeli) najdlje, so bili oskrbovani z dodatnimi sati s hrano. Matica preživelega plemenilnika je bila dodana v desetsatno družino 4. maja. Preverjanje sprejetosti in prvo ocenjevanje sta bili izvedeni 20. maja (Tabela 11), zadnje pa 14. julija, ko smo matico žrtvovali za disekcijo. Površina zalege matice je bila ustrezna. Masa matice ob žrtvovanju je

tehtala 273 mg, masa ovarijev je znašala 174 mg. Našteli smo 121 ovariol ter 4.453×10^6 spermatozoidov, od katerih je bil delež živih 0.73. Spor *Nosema* spp. v črevesju nismo zaznali.

Tabela 11. Spremljanje jakosti družine pri prezimljeni matici.

Datum	Površina zalege (dm ²)	Ocena št. čebel
20/05/2022	45.75	14920
03/06/2022	77.5	16520
27/06/2022	67	13360
14/07/2022	81	17680

3.6.3 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, saj cena gospodarske družine v letu 2021 lahko presega 125 €, medtem ko rezervne družine dosegajo cene med 8.5 € do 14 € na sat, v ceno izgube gospodarske družine pa je potrebno všteti tudi izgubo pridelka. Cene prezimljenih matic v RS se gibljejo med 70 in 90 €, v tujini pa do 100 € (VB); cena prezimljene rodovniške matice je v RS med 120 in 290 € in v tujini 160 € (ZRN). Ti podatki kažejo, da je verjetno ekonomsko upravičeno odzemanje in zgodnjepomladanska 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 (matice niso bile preležene). Prezimovanje se izvaja na temperaturi, ki je višja od temperature, pri kateri se čebele stisnejo v zimsko gručo (> 12°C). S tem se prepreči, da bi določene matice ostale izven gruč in s tem neoskrbovane. Za samo banko je potrebna namenska brezmatična družina, dobro založena s hrano in mladimi čebelami, vendar je na ta račun potrebno osiromašiti druge družine. Takšna kalkulacija se kaže ekonomsko ugodnejša in preferenčna v primerjavi s prvo opcijo, vendar ni vsakemu vzrejevalcu dostopna tehnologija v smislu klimatizirane in zračne komore. Po nekaterih virih je potrebno tudi redno dosipavanje čebel preko zime, kar podre ekonomsko kalkulacijo.

Tretja opcija je prezimljanje v nizkovolumskih plemenilčkih, ki omogočajo povečevanje prostora z nakladicami (npr. Kieler). Sam plemenilek stane pri slovenskih ponudnikih cca 21 € (2022), dodatna nakladica pa cca 15 €, odvisno od ponudnika. Če vzrejevalec sam uporablja primerne plemenilnike pri rutinski vzreji, je verjetno ekonomsko najbolj enostavno, da matice enostavno obdrži v plemenilnikih, jih ustrezno nadgradi (najmanj 3 nakladice) in krmi. Po naših izkušnjah je potrebno paziti tudi na obremenjenost z varojami in postavitve plemenilnikov v zimskih dneh, po možnosti na suhi legi.

4 INTERPRETACIJA REZULTATOV

4.1 SPREMLJANJE ČEBELJIH MATIC S FIZIOLOŠKIMI IN MORFOLOŠKIMI MERITVAMI

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: večja živa masa in masa ovarijev, večje število ovariol, zadovoljivo število spermatozoidov v spermateki, zgođen začetek zaleganja, veliko število zaleženih jajčec na dan, kvalitetno, nepresledkasto zalego ter odsotnost bolezni in škodljivcev (Hatjina in sod., 2014).

V letih od 2020 do 2022 smo spremljali matice s fiziološkimi in morfološkimi meritvami pri skupno 34 vzrejevalcih, od tega jih je 23 sodelovalo vsa tri leta. V vseh treh letih je bila povprečna masa matic med seboj primerljiva (210.1 ± 15.0 v letu 2020, 212.8 ± 9.3 mg v letu 2021 in 212.4 ± 16.6 mg v letu 2022). Razlika je v maksimalni doseženi masi, saj je v letu 2022 močno izstopala matica z maso čez 300 mg, kar je absolutni rekord.

V vseh treh letih so bili odnosi med številom ovariol in maso ovarijev pričakovani in v velikostnem redu že objavljenih rezultatov. Nasprotno je bil volumen spermateke v letu 2022 bolj podoben izmerkom iz leta 2021, kot pa tistim iz leta 2020 (0.96 ± 0.17 mm³ v letu 2022; 0.61 ± 0.19 mm³ 2020 in 1.01 ± 0.02 mm³ v 2021). Znanstvene študije poročajo, da je večji volumen spermateke eden od znakov za višjo kakovost matice (Hatjina in sod., 2014). Povprečno število spermatozoidov v letošnjem letu bilo med izmerkoma iz preteklih let: $3.76 \pm 1.2 \times 10^6$ v primerjavi z $2.98 \pm 1.85 \times 10^6$ v letu 2021 in z $5.23 \pm 1.46 \times 10^6$ v letu 2020.

4.2 DIAGNOSTIKA – PRISOTNOST SPOR *NOSEMA* SPP.

Diagnostika je pokazala prisotnost spor *Nosema* spp. v iztrebkih sedmnajstih od 186 testiranih matic, kar je 9 % in je nekje v sredini meritev, zbranih od leta 2016. Spore Noseme pri maticah (in spremljevalkah) so lahko indikator dolgoročnih težav. 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). Okužba matic kot tudi spremljevalk lahko kažeta na težavo z nose mavostjo v plemenilčkih, saj se s sporami *Nosema* spp. okužijo le odrasle čebele (White, 1919; Bailey, 1955).

4.3 DIREKTNO TESTIRANJE VZREJEVALCEV

Za vse matice velja, da za nadaljnjo vzrejo niso primerne tiste, ki so bile pri oceni rasnih karakteristik ocenjene z manj kot 4. Priporočamo tudi, da vzrejevalec matice z obarvanimi družinami odstrani iz vzrejališča in nadomesti z bolj primernimi. Neprimerne so tudi tiste, ki so v posameznih kategorijah dobile oceno 1 ali 2. Čistilna sposobnost naj bo vsaj 90 % oz. naj za vzrejo ne uporabljajo družin, ki po čistilni sposobnosti niso med tretjino najboljših. Vzrejevalci naj navedeno razvrstitev sprejmejo predvsem kot priporočilo.

Značilen padec mirnosti je bil okoli leta 2017, ko smo začeli s priporočilom 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 - leto 2022 je izjema - 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 2018 – 2021 močno popravilo. Precej manj družin je ocenjenih s 100 %, kar kaže, da več vzrejevalcev test izvaja pravilno.

4.4 SPREMLJANJE MITOHONDRIJSKE LINIJE

Z mitohondrijskimi označevalci smo spremljali mitohondrijsko linijo pri kandidatnih matičarjih. Testirali smo mitohondrijska fragmenta tRNA-Leu in COI. Vsi testirani vzorci pripadajo ustrezni mt liniji – to je linija C. 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.

4.5 PROUČITEV VPLIVA PREZIMOVANJA ČEBELJIH MATIC

Ključna motivacija za prezimovanje je povpraševanje čebelarjev iz tujine - kjer se sezona začne bolj zgodaj - po maticah. Glede na predelano literaturo, spletne vire in lastne izkušnje, je verjetno najbolj učinkovito za vzrejevalca, da poskuša izvesti prezimitev kar v plemenilnikih v smislu Kieler (z več nakladicami) ali Mini+. Uporaba specializirane banke je ekonomsko opravičljiva le, če prezimi večje število matic: zahtevana pa je seveda ustrezna oprema, ki preprečuje zbiranje čebel v zimsko gručo. Pojavljajo se tudi pomisleki s stališča biologije same podvrste, saj naj bi bile nekatere bolj nagnjene k oblikovanju gruče. Prezimovanje v plemenilnikih je tehnično manj zahtevno od prezimovanja v banki: je pa potrebno redno pregledovanje ob toplih dneh, predvsem zaradi ugotavljanja zaloga hrane.

5 SPLOŠNE UGOTOVITVE

Ugotavljamo, da je vsako letno spremljanje populacije, ki je kandidat za nadaljnjo odbiro, izrednega pomena. S spremljanjem lastnosti kandidatov matičarjev in zbiranjem podatkov o kakovosti matic, ki jih vzrejevalci postavijo na tržišče, neposredno spremljamo lastnosti v populaciji kranjske sivke v Sloveniji. Informacija o obremenjenosti z *Nosema* spp. je pomembna s stališča zdravstvenega stanja družin, morfo-fiziološke lastnosti matic pa so neposredno povezane s kvaliteto in so lahko v pomoč strankam. Zbrani in obdelani podatki ter ugotovitve so 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 kubitalnega 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> $ČS = ((NC - PCO) / 50) * 100 \%$ ČS = čistilna sposobnost (%) NC = število načetih celic pri pregledu PCO = število praznih celic pred prebadanjem	<u>Izračun ČS za 100 celic:</u> $ČS = ((NC - PCO) / 100) * 100 \%$ 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).

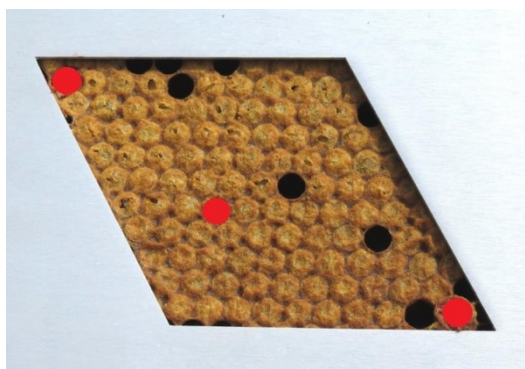
V evidenčni list se vpiše rezultate vsaj enega opravljenega PIN-testa in datum izvedbe testa. Priložiti je potrebno označene fotografije s šablono pred in po prebadanju. Pripišite podatek, po koliko urah ste opravili drugi pregled.



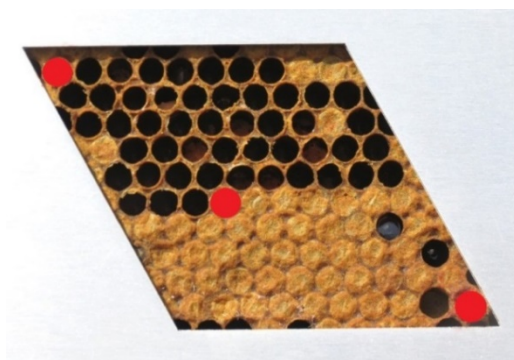
Slika 1. Primerna starost zalege je okrog 17 dni, to je stadij bube z rožnatimi do rdečimi očmi.



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.

