

**Kmetijski inštitut Slovenije**  
**Agricultural Institute of Slovenia**  
1001 Ljubljana, Hacquetova 17, SLOVENIJA  
Tel. +386 1 / 28 05 262, p.p. 2553  
Telefax +386 1 / 28 05 255

## **POROČILO O IZVEDENEM UKREPU**

# **SPREMLJANJE KVALITETE VZREJENIH ČEBELJIH MATIC** *(Apis mellifera carnica)*

**Junij, 2007**

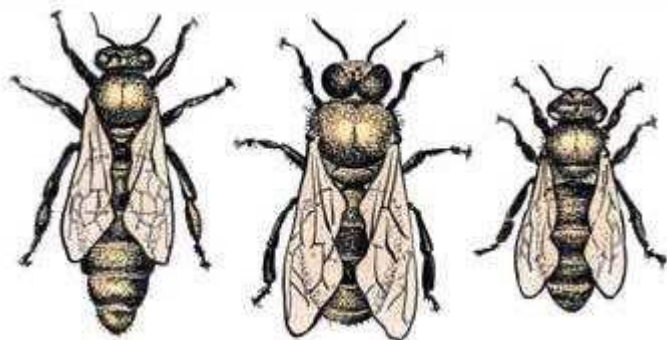
## UVOD

### Kranjska čebela

Ozemlje sedanje Slovenije je izvirno območje kranjice, imenovane tudi Kranjska sivka – *Apis mellifera carnica*. Na oprsju ima rjavkastosive dlačice, zadkovi obročki so temni s svetlejšimi pegami na prvem in drugem obročku. Morfološka lastnost je tudi značilen kubitalni indeks.

Za kranjsko čebelo je značilna skromna poraba zimske zaloge hrane. Prezimuje v manjši skupnosti. Spomladi je razvoj buren in je družina hitro toliko razvita, da je sposobna za izkoriščanje paše. Na zmanjšanje paše v naravi se prilagodi z zmanjšanjem obsega zaleganja. Za našo čebelo je tudi značilna večja sposobnost orientacije, ki jo je domnevno pridobila zaradi čebelarjenja v manjših panjih, zloženih v skladovnici. Je tudi dobra graditeljica satja in ni znana po intenzivnem propoliziranju, kot nekatere druge rase čebel. V sodobnem čebelarjenju nezaželena nagnjenost k rojenju je izrazitejša kot pri drugih rasah. Ta se kaže v daljšem rojilnem obdobju in v večjem številu rojev v sezoni. Z ustrezno čebelarsko tehnologijo je mogoče zmanjšati pogostnost rojenja in tako povečati uspešnost čebelarjenja. Posebna prednost kranjske sivke je tudi mirnost, ki se odraža v mirnem sedenju čebel na zaleženem satju.

Kranjska čebela je v Sloveniji zaščitena rasa in čebelarjem ni dovoljeno vnašati drugih čebel. V okviru Kmetijskega inštituta Slovenije potekajo tudi raziskave morfoloških in gospodarskih lastnosti kranjice. Od leta 2004 vodimo izvorno rodovniško knjigo za plemenske kranjske čebele, v katero so lahko vpisane le čebele na osnovi ugotovljenih navedenih značilnosti in lastnosti.



Slika 1: Matica, trot in delavka

### Opis morfološke značilnosti:

Matica:

- svetlo rjava, usnjato rjava ali temno obarvana
- dobro razvito, čvrsto oprsje in dolg, zašiljen zadek

Čebela delavka:

- srednje velika, vitka, splošna barva je siva, noge so dolge
- zadek je zašiljen, temen, na prvem širokem obročku bočno se lahko pojavljajo usnjeno rjave pike ali lise, prvi obroček je lahko v celoti usnjeno rjav
- dlačice na obročkih zadka so sive do rumenkastosive in predstavljajo pas - toment, ki je širok in vpadljiv
- dlačice 5. zadkovega obročka so goste in kratke (0.25 – 0.35 mm)
- kubitalni indeks (razmerje odsekov spodnje žile tretje kubitalne celice prednjega krila) je 2.7 (2.4 – 3.0).
- rilček je dolg 6.4 – 6.8 mm

**Etološke značilnosti:**

- zelo mirna, redko pika
- mirno sedi na satju
- odlikuje se po donosu
- se ne zaleta v tuje panje
- prezimuje v razmeroma majhnih družinah in porabi zmerne zaloge hrane
- izrazito intenziven spomladanski razvoj, dobro zalega
- nagnjena k rojenju

V izvorno rodovniško knjigo za plemenske kranjske čebele so lahko vpisane le čebele na osnovi ugotovljenih navedenih značilnosti in lastnosti.

**Matica**

Funkciji matice sta zaleganje jajčec in izločanje feromonov. Novo izležena matica po nekaj dneh zleti na praho. Leti v bližino zbirališča trotov. Iz panja izleti večkrat in se pari z več troti. Po paritvenem obdobju matica praviloma ne zapušča družine.

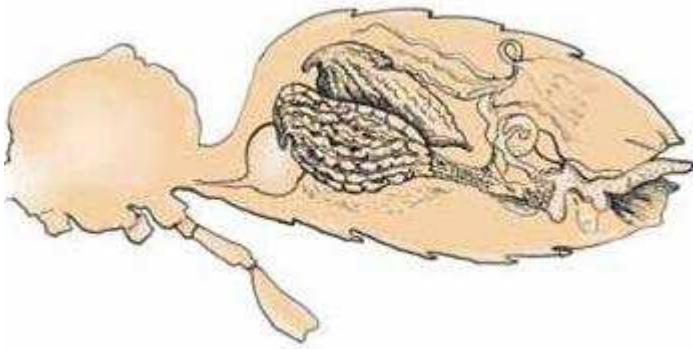
Spermiji vseh trotov se uskladiščijo v semenski mošnjici matice. Skupaj jih je okrog 6 milijonov. Od tam se postopno sproščajo in oplajajo jajčeca, ki se razvijejo v ovarijih. Zaloga spermijev služi za celotno življenjsko obdobje matice, ta pa letno zaleže od 175.000 do 200.000 jajčec. Matica je mati vseh osebkov v družini in lahko živi več let. Telo matice je prilagojeno za intenzivno zaleganje, ne skrbi pa za svojo zalego. Nima žlez za izločanje matičnega mlečka, prav tako noge niso prilagojene za nabiranje in transport cvetnega prahu. Matica le skupaj z delavkami omogoča optimalen razvoj čebelje družine. V čebelji družini so spolno razvite samice matice, samci pa so troti.

**Spolni organi matice**

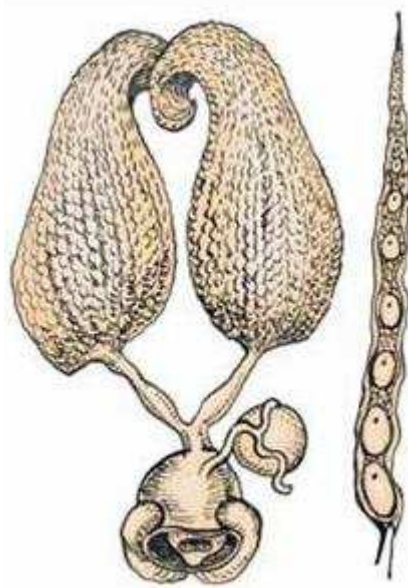
Spolni žlezi matice sta jajčnika. Po opraitvi napolnjujeta pretežni del zadka. Pri neoprašeni matici je zadek manjši in manj napet kot pri opraiteni, ki intenzivno zalega. Posamezni jajčnik sestavlja 160 do 180 jajčnih cevok. Te so na notranji strani prekrivane z zarodnim epitelijem, kjer se razvijajo jajčne celice. Jajčne cevke prehajajo v jajčno vodnico. Jajčni vodnici obeh jajčnikov se združita v srednjo jajčno vodnico in v nožnico. Zadnji konec nožnice zapira horizontalno potekajoča guba, ki je ostanek 8. trebušnega dela zadkovega obročka ali membrane med 8. in 9. trebušnim delom zadkovega obročka. Nožnica prehaja v nožnično preddverje, to pa v spolno odprtino. V vsaki jajčni cevki dozori okrog 8 jajčec na dan. V vseh cevkah obeh jajčnikov lahko torej dnevno dozori okrog 2000, pri zelo rodovitnih maticah do 3.000 jajčec. Matica letno zaleže okrog 200.000 jajčec. Jajčece je cilindrične oblike, na koncih zaobljeno in po vzdolžni osi ukrivljeno. Je sivkasto bele barve, dolžina pa niha od 1,53 do 1,63 mm.

Matica se pari z več troti, ki napolnijo njeno semensko mošnjico. V nekaj urah, ko se matica vrne s svatbenega leta, spermiji preidejo iz jajčnih vodnic po tanki cevki, semenovodu v semensko mošnjico. Ta se napolni s spermiji in ima premer okrog 1 mm. Na njeni zgornji steni se nahaja cevasto zvita žleza semenske mošnjice. Ta ima domnevno vlogo pri polnjenju semenske mošnjice s spermiji in izloča hranilne snovi, ki omogočajo življenje shranjenim spermijem in uspešno oploditev jajčnih celic.

Semenčice potujejo po tanki cevki iz semenske mošnjice proti nožnici. Za zaklopnico, ki se dviga iz dna nožnice, se jajčece ustavi in semenčica ga tam oplodi. Prav od oploditve je odvisno, ali se bo razvila čebela delavka oz. matica ali trot.



Slika 2: Notranji organi matice



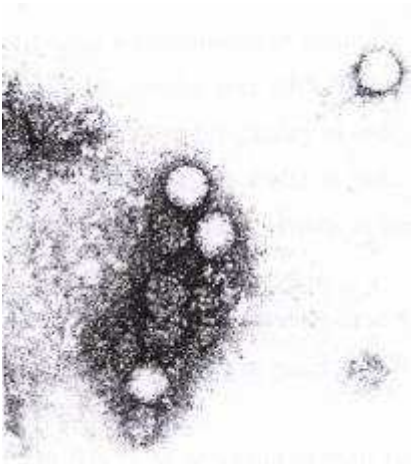
Slika 3: Zgradba ženskih spolnih organov

### **Virusne okužbe pri čebelah**

Virusi, ki povzročajo infekcije pri čebelah, so uvrščeni v naddružino *Picornaviridae*. Zanje je značilno, da so brez ovojnice, so okroglaste oblike, premera 22 - 33 nm in ikozaedrične simetrije. Virusi nevretenčarjev, morfološko in fizikalno-kemično podobni pikornavirusom, so bili prvotno dokazani pri medonosni čebeli (*Apis mellifera*) v letih 1963, 1964 (Bailey in sod., 1964).

### **Virus akutne paralize čebel**

Virus akutne paralize čebel (angl. acute bee paralysis virus - ABPV) so odkrili med preiskovanjem virusa kronične paralize čebel leta 1963 v Angliji. Nadaljnje raziskave so pokazale, da se virus pogosto pojavlja pri navidezno zdravih čebelah, predvsem v aktivni sezoni, vendar virus nikoli ni bil povezan z obolenjem oziroma umrljivostjo čebel v naravi. ABPV se pojavlja pogosto tudi ob subletalnih infekcijah pri navidezno zdravih čebelah. Virus se širi z izločki slinskih žlez odraslih čebel in z zalog hrane v katerih so ti izločki (pelod) (Ball, 1985). Če preide virus v hemolimfo, se razvije bolezen, ki je lahko smrtna (Bailey in Gibbs, 1964).



Slika 4: Virus akutne paralize čebel, povečava = 300 000.  
(<http://members.tripod.com/f.k.ruzicka/id3t.htm.6.05.2004>)

Odrasla čebela, v kateri se je virus aktiviral ali pa ga je v čebelo vnesla pršica, inficira mlade ličinke, verjetno z izločki iz slinskih žlez. Ličinke, ki zaužijejo dovolj veliko količino virusa, odmrejo še preden jih čebele pokrijejo. Ličinke, ki preživijo, se razvijajo naprej, vendar se lahko razvijejo v inaparentno inficirane odrasle osebkke (Bailey in Ball, 1991).

### **Virus deformiranih kril**

Virus s premerom 30 nm, ikozaedrične oblike, ki so ga poimenovali virus deformiranih kril (angl. deformed wing virus - DWV), so izolirali pri odraslem osebkku *A. mellifera*. V večini dežel povezujejo DWV pri oboleli zalegi, mrtvicah in deformiranih novo izleglih čebelah s prisotnostjo *Varroa destructor*. Laboratorijske in terenske raziskave kažejo, da pršica prenaša DWV na isti način kot prenaša virus akutne paralize čebel. DWV se počasi pomnožuje. Buba, ki se inficira v fazi belih oči, se sicer izleže, vendar ima deformirana ali slabo razvita krila in kmalu odmre.

Raziskave so pokazale, da virus DWV, ki se prenese v bubo s hrano, poveča umrljivost bub in skrajša življenjsko dobo odrasle čebele, ki se razvije iz okužene bube. Življenjska doba delavk, ki so bile okužene po stadiju bube, ni prizadeta. Vse inficirane čebele so rezervoar virusa do konca svojega življenja. Virus prenaša med čebeljimi družinami tudi odrasla inficirana čebela, varoja ali pa ga prenaša čebelar pri svojem delu (premiki pokrite zalege ali odraslih čebel) (Stephen, 2001).

### **Virus mešičkaste zalege čebel**

"Filterabilni" virus (virus, ki prehaja skozi filter), ki je bil kasneje poimenovan kot Sacbrood virus (SBV), so izolirali leta 1913 pri čebeli *A. mellifera* (White, 1917), vendar so šele leta 1964 odkrili njegove pikornavirusom podobne značilnosti. Virus je razširjen po celem svetu. SBV je eden od mnogih virusov insektov, ki jih na podlagi biofizikalnih lastnosti in genoma RNA uvrščamo med pikornavirusom podobne viruse. Klinični znaki mešičkaste zalege so specifični. Zdrave ličinke se zabubijo četrty dan po pokritju celic, ličinke obolele za SBV, pa se ne uspejo zabubiti in ostanejo stegnjene kot zdrave predbube na svojih hrbtih z glavami, ki gledajo proti vrhu celice. Virus se razmnožuje tudi v odraslih čebelah in trojih. Mlade odrasle čebele se okužijo *per os*, kot možni vektor SBV pa se omenja tudi *Varroa destructor* (Kraus in sod., 1986). Ličinke starejše od dveh dni, preživijo infekcijo s SBV in ko odrastejo, postanejo nekatere inaparentno inficirane.

Mešičkasta zalega je dolgotrajna in zelo pogosta holezen, kljub navidezni ozdravitvi v poletnem času, padcu infektivnosti virusa in odsotnosti ličink v zimskem obdobju (Bailey in Ball, 1991).

### **Diagnostične metode za dokazovanje virusnih infekcij**

Med sodobnimi molekularnimi metodami za določanje nukleinskih kislin v vzorcu se je v zadnjem času najbolj uveljavila metoda polimerazne verižne reakcije (angl. polymerase chain reaction - PCR).

Polimerazna verižna reakcija je relativno nova metoda za sintezo nukleinskih kislin *in vitro* s katero lahko v kratkem času pomnožimo specifično DNA v velikem številu kopij. Dokazovanje virusov z metodo PCR temelji na *in vitro* pomnoževanju specifičnega odseka dednega materiala določenega virusa. Glavni predpogoj za uspešno pomnoževanje je predhodno poznavanje nukleotidnega zaporedja vsaj enega dela virusnega genoma (Remick in sod., 1990), kar nam omogoči pravilno izbiro dveh kratkih odsekov, t. i. začetnih oligonukleotidov, komplementarnih z mejnima deloma specifičnega odseka virusnega genoma, ki ga želimo pomnožiti. Začetna oligonukleotida se spajata z nasprotno ležečo vijačnico tarčnega odseka virusne DNA in sta usmerjena tako, da poteka sinteza nove DNA v prostoru med njima. PCR poteka v ciklikih in vsak cikel teoretično podvoji število tarčnih molekul DNA, ki pri tem eksponentno narašča. PCR s predhodno reverzno transkripcijo oziroma RT-PCR se lahko izvaja v enem koraku, kjer se uporabi encima za reverzno transkripcijo in PCR v isti epruveti z eno pufersko raztopino in neprekinjenimi temperaturnimi cikliki (Mulder in sod., 1994).

### **Metode dokazovanja produktov PCR**

Rezultat produkta reakcije je pozitiven, ko pokažemo pomnoženi odsek virusne nukleinske kisline. Za dokazovanje produkta PCR uporabljamo metodo ločevanja DNA po velikosti z elektroforezo v agaroznem gelu. Fragmente DNA v gelu dokažemo z etidijevim bromidom, ki se vgrajuje v dvojno vijačnico, tako da le-ta po osvetlitvi z UV svetlobo fluorescira. S to metodo določimo približno velikost produkta PCR tako, da primerjamo njegovo velikost z velikostjo standardnih delcev DNA (marker velikosti), ločenih z elektroforezo pod enakimi pogoji. Metoda je razmeroma zanesljiva in hitro izvedljiva.

## OPIS OPRAVLJENIH NALOG

### MATERIALI IN METODE

#### Zbiranje vzorcev matic

V okviru izvajanja programa smo v letu 2006 iz 27 vzrejališč čebeljih matic v Sloveniji pridobili 324 oprasnih čebeljih matic. Matice so iz posameznega vzrejališča izvirale od istega matičarja in so bile oprasene istočasno na istem plemenišču. Vzorci matic so bili zbrani v vseh geografskih območjih Slovenije, od večine priznanih vzrejališč. Zbrane vzorce matic smo v laboratoriju pripravili za nadaljnje raziskave. Po tri matice iz vsakega vzrejališča smo shranili za virološke preiskave. Po devet matic pa smo preparirali in jim odvzeli posamezne organske sisteme za nadaljnje raziskave. Matice smo tehtali in secirali s pomočjo mikroskopa. Izolirali in tehtali smo ovarije, ter shranili spermateko in prebavila. Krila, glavo, spermateko in prebavila smo shranili na  $-20^{\circ}\text{C}$ , ovarije pa smo fiksirali in zalili v parafin.

Posamezne dele telesa (krila in glava) smo v nadaljevanju programa laboratorijsko obdelali. Krila in glavo smo rabili za morfološke preiskave. Ovarije smo fiksirali v 10 % formalinu, dehidrirali v alkoholu ter jih zalili v parafinu. Parafinske bloke z zalitim materialom smo shranili na sobni temperaturi. Spermateko smo shranili v insekt ringerju v mikrotubicah na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ugotavljali smo število spermijev skladiščenih v spermateki. V insekt ringerju smo shranili tudi srednje črevo matice, in ga pregledali na prisotnost spor *Nosema sp.*

V okviru programa naloge je bila izvedena tudi nabava opreme za izvedbo posameznih nalog. Za te naloge je bila s strani Čebelarske zveze Slovenije nabavljena potrebna oprema. Za izvedbo morfoloških in histoloških preiskav, ter preiskav prisotnosti infektov je bil nabavljen mikroskop, za izvedbo preiskav na prisotnost virusov pa naprave za izvebo polimerazne verižne reakcije (PCR). Oprema bo namenjena nadaljevanju izvajanja programa.

#### Izvedena opravila:

- pridobitev čebeljih matic
- sekcija matic: tehtanje matice, shranitev kril, glave,
- izolacija in tehtanje ovarijev, fiksacija, dehidracija in zalitje v parafinu,
- izolacija spermateke in prebavil in shranjevanje na  $-20^{\circ}\text{C}$ ,
- shranjevanje treh matic na  $-20^{\circ}\text{C}$  za virološke preiskave,

Od vsakega vzrejevalca smo po 3 matice shranili ločeno pri  $-20^{\circ}\text{C}$  za pregled na viruse, pri preostalih 9 maticah pa smo opravili naslednje meritve: tehtanje matic in ovarijev, štetje ovarialnih cevok, štetje semenčic v spermatekah, pregled prebavil na prisotnost spor *Nosema sp.* ter meritve kril in glav.

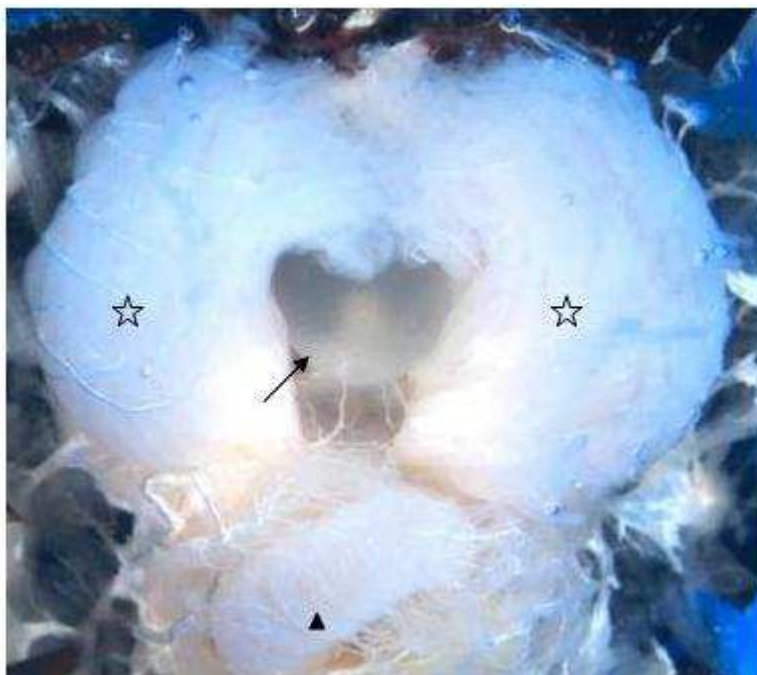
Tabela 1. Pregled vzrejevalcev matic, od katerih smo dobili matice v testiranje.

Ime in priimek	Naslov	Pošta	Št. matic
Avgust Bučar	Bratov Učakar 100	1000 Ljubljana	12
Ivan Dremelj	Dragovšek 13	1275 Šmartno pri Litiji	12
Janez Dremelj	Dragovšek 13	1275 Šmartno pri Litiji	12
Darko Grm	Hude Ravne 1	1273 Dole pri Litiji	12
Jože Sever	Stara cesta 12	8333 Semič	12
Janez Kropivšek	Jeronim 32	3305 Vransko	12
Viktor Gaber	Novačanova 3	3202 Ljubečna	12
Julij Pokorni	Gačnik 3	2211 Pesnica	12
Janko Pislak	Apače 303	2325 Kidričevo	12
Jože Jakšič	Kapca, Glavna ulica 21	9220 Lendava	12
Bojan Donko	Dolga vas, Glavna ulica 94	9220 Lendava	12
Jožef in Jožica Tratnjek	Žižki 93	9232 Črenšovci	12
Milena Kavaš	Ribiška 8	9233 Odranci	12
Jože Herbaj	Nedeljica 29	9224 Turnišče	12
Čebelarstvo Kapun	Mirna 14	9000 Murska Sobota	12
Ervin Ficko	Mlajtinci 37 a	9226 Moravske toplice	12
Jože Andrejč	Murski Petrovci 1a	9251 Tišina	12
Stanislav Čiček	Ivanci 39	9222 Bogojina	12
Mirko Jurinec	Ključarevci 74	9242 Križevci	12
Janko Bukovšek	Golo Brdo 19	1215 Medvode	12
Gregor Mlakar	Cankarjeva c. 18	1240 Kamnik	10
Franc Šolar	Podnart 12	4244 Podnart	12
Janez Luznar	Begunje na Gorenjskem 170	4275 Begunje na Gorenjskem	12
Darko Magdič (Završnica)	Rožna dolina 40	4248 Lesce	12
Vasja Jug	Grant 1e	5242 Grahovo ob Bači	12
Čebelarstvo Lucka	Sužid 41	5222 Kobarid	12
Ladislav Vozelj	Dragovšek 18		15
SKUPNO			324

### Tehtanje matic in ovarijev

Matice smo do tehtanja hranili pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Po tehtanju smo vsaki matici odstranili desno krilo in ga shranili v označeno tubico Eppendorf. Prav tako smo odstranili glavo in jo shranili v ločeno tubico. Pri vsaki matici smo izvedli sekcijo tako, da smo telo pritrdili na mehko podlago z etomološkimi iglami in prelili z Hyesovo raztopino. Previdno smo odstranili oba ovarija (slika 5) in ju takoj položili na tehtnico (tehtali smo v Hyesovi raztopini). Ovarija smo nato položili v označeno penicilinko, v katero smo nalili nekaj mililitrov 10% formalina. Stehtali smo 243 matic in toliko parov ovarijev (levi in desni skupaj). Iz matice smo odstranili tudi spermateko. Vseh 243 spermatek smo do štetja semenčic hranili v označenih tubicah Eppendorf, v 100  $\mu\text{l}$  PBS.





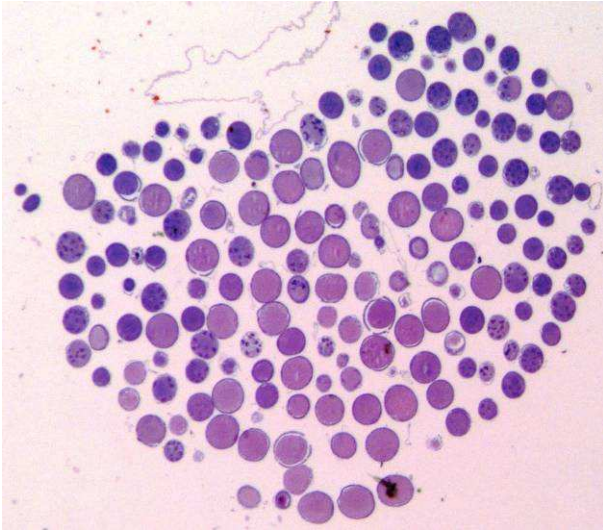
Slika 5. Levi in desni ovarij (☆), medni želodček (→), srednje črevo (▲).

### Fiksacija in zalitje ovarijev

Ovariji so bili 24 ur v 10% formalinu, nato po 24 ur v sledečih pripravljenih raztopinah: 70%, 90%, 100%, 100% alkohol, nato pa ksilen. Sterilizator smo segreli na 65°C in pripravili banjice s sledečim razmerjem parafina in ksilena: 1:3, 1:1 in 3:1, v četrto in peto banjico smo raztalili 100% parafin. Vzorce smo v vsaki raztopini pustili po 24 ur. Na koncu smo vsak ovarij posebej namestili v ustrezen položaj in ga zalili v parafinu. Parafinske bloke z zalitim materialom smo hranili na sobni temperaturi do nadaljnje obdelave. S pomočjo mikrotoma Leica smo prečno narezali 7 µm tanke rezine vzorca in jih namestili na objektna stekelca. Pripravljene histološke rezine smo deparafinizirali 3x v ksilenu in 3x v 100% alkoholu. Vzorce smo rehidrirali v destilirani vodi, nato pa jih obarvali najprej z barvilom hematoksilin in nato z eosinom. Obarvane histološke rezine smo prekrili s pokrovnim stekelcem.

### Štetje ovarialnih cevčk

S pomočjo stereomikroskopa in kamere smo naredili posnetke prečnih prereзов ovarijev (slika 6) in nato prešteli število ovarialnih cevčk. Meritve smo izvedli naključno na enem od obeh ovarijev. Ovarialne cevčke 240 ovarijev smo prešteli s pomočjo računalniškega programa Lucia.Net.



Slika 6: Histološka rezina ovarija, prečni prerez.

### **Priprava prebavil za pregled na spore *Nosema***

Pri sekciji matice smo odstranili prebavila v obsegu mednega želodčka, srednjega črevesa in rektuma. Prebavno cev smo shranili v označeno majhno tubo Eppendorf in vzorce postavili na -20°C. Kasneje smo posameznemu vzorcu dodali 1ml vode in pripravili homogenat. Kapljico homogenizirane raztopine smo kanili na objektno steklo in prekrili s pokrovnim stekelcem. Pod mikroskopom 400x povečave smo vsebino črevesa pregledali na prisotnost spor *Nosema*. Pregledali smo 243 čreves čebeljih matic. Prvotno predvidenega pregleda čebel delak na nose mavost nismo izvedli, ker čebele delavke ki so bile v transportnih matičnicah niso nujno izvira le iz plemenilnikov, kjer so se plemenile matice. Ker so bile vse matice na nose mavost negativne ni mogoče sklepati na vpliv morebitne okužbe čebel delavk v matičnicah. Zato bi bili rezultati pregleda čebel delavk za določanje stanja matic manj pomembni.

### **Priprava semena in štetje semenčic**

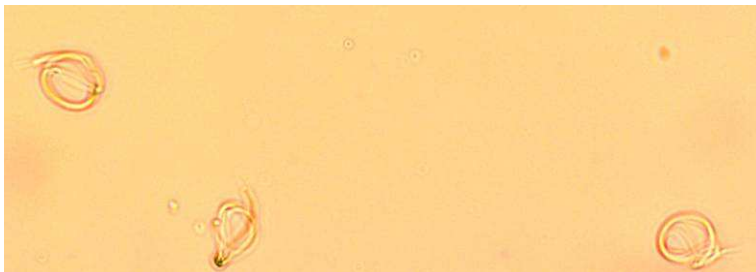
S pomočjo stereomikroskopa smo pri 15-kratni povečavi vsaki spermateki previdno odstranili ovojnico ki jo sestavljajo traheje (slika 7). Nato smo steno spermateke nežno prebodli in iztisnili seme. Spermateka je morala biti pri tem navlažena, da smo preprečili njeno izsušitev (Harizanis, 1983).



Slika 7. Semenska mošnjica z odstranjeno ovojnico iz trahej.

Seme smo razpršili v 0,5 ml Hyesove raztopine. To je potrebno narediti čimbolj nežno, da ne pride do frakcij semenčic. Nato smo dodali še 4,5 ml destilirane vode (Koeniger, G. in sod, 2005). Tako pripravljen vzorec smo prešteli s pomočjo Bürkerjevega hemocitometra, pri 400x povečavi (slika 8). Pri vsakem vzorcu smo prešteli 80 polj (slika 9).

Seme smo prešteli v 239 spermatekah, v štirih spermatekah pri preiskavi nismo uspeli prešteti spermije.



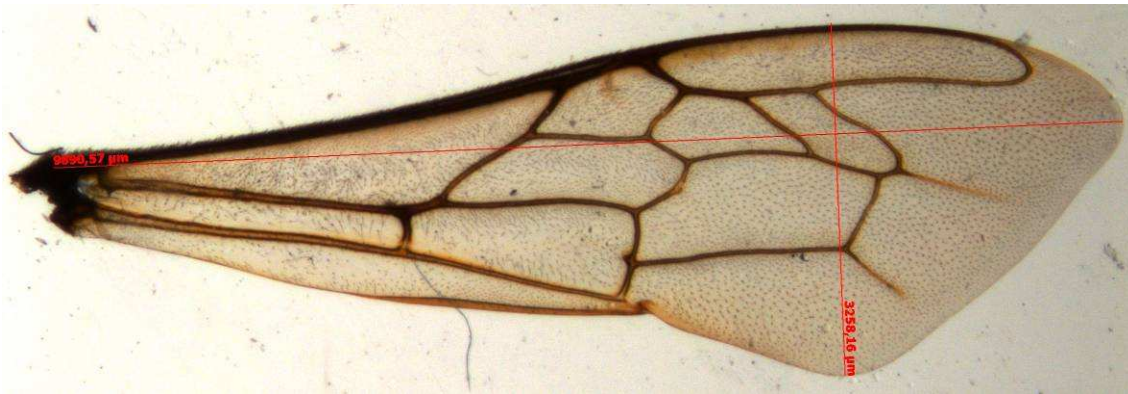
Slika 8. Zavite semenčice. 400x mikroskopska povečava.

zgoraj	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
12												
11												
10												
9												
8												
7												
6												
5												
4												
3												
2												
spodaj/ 1												

Slika 9. Mreža Bürkerjevega hemocitometra: osenčena polja preštejemo (80 polj).

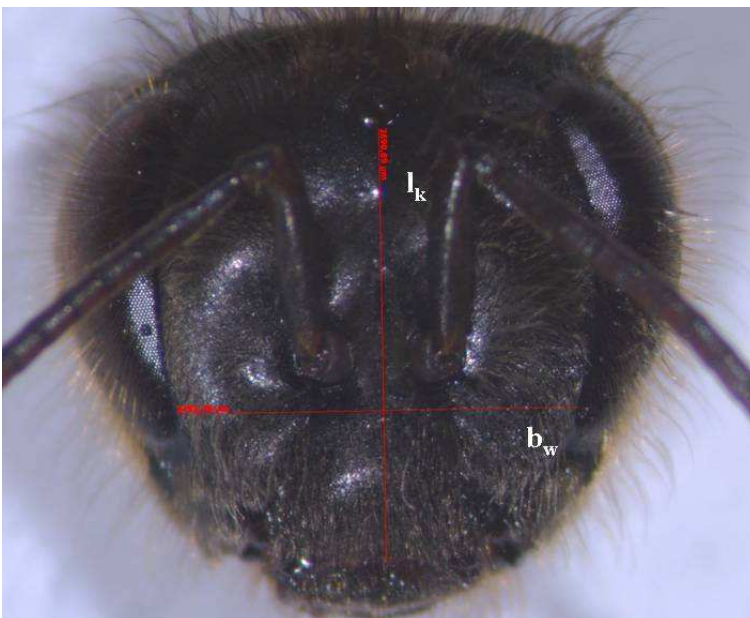
### Meritve krila in glave

Krila smo s pomočjo stereomikroskopa in kamere pri 8x povečavi posneli na računalnik, kjer smo jim s programom AxioVision 4.6 izmerili dolžino in širino (slika 10). Meritve smo opravili na 240 desnih krilih matic. 3 krila pa so bila poškodovana in na njih ni bilo možno izvesti meritev.



Slika 10. Meritve kril pri matici.

Glave matic smo na računalnik posneli pri 16 do 17x povečavi. Izmerili smo jim dolžino od srednjega pikčastega očesa do ustnice in razdaljo med obema sestavljenima očesoma ter izračunali obrazni (facialni) indeks (Ruttner, 1983; slika 11). Meritve smo opravili na 243 vzorcih.



Slika 11. Meritve glave.

$$\text{obrazni indeks} = l_k / b_w$$

$l_k$  = dolžina od srednjega pikčastega očesa do ustnice

$b_w$  = razdalja med obema sestavljenima očesoma

## Virološke preiskave

### Priprava vzorcev za izolacijo RNA

Čebelje matice smo posamezno strli v tubicah z dodatkom PBS. Suspenzijo smo prenesli v plastične epruvetke. Virusno RNA smo izolirali s pomočjo QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) v skladu z navodilom.

V preiskavo je bilo vključeno 80 čebeljih matic preiskave smo iz predvidenih treh virusov zaradi aktualnosti problematike razširili na štiri viruse. Virus akutne paralize čebel (ABPV), virus deformiranih kril (DWV), virus meščkaste zalege (SBV) in virus črnih matičnikov (BQCV).

Pomnoževanje RNA z metodo RT-PCR

Tabela 2: Zaporedje začetnih oligonukleotidov in njihovo mesto v genomu (Bereńny in sod., 2006).

Virus	začetni oligonukleotidi	sekvenca (5'→3')	mesto v genomu	velikost produkta PCR (bp)
ABPV	ABPV 1f	CATATTGGCGAGCCACTATG	8107-8126	498
	ABPV 2r	CCACTTCCACACAACACTATCG	8585-8604	
BQCV	BQCV 3f	AGTAGTTGCGATCTACTTCC	2559-2578	472
	BQCV 4r	CTTAGTCTTACTCGCCACTT	3011-3030	
DWV	DWV 2345f	ATTGTGCCAGATTGGACTAC	2345-2364	435
	DWV 2779r	AGATGCAATGGAGGATACAG	2760-2779	
SBV	SBV 1f	ACCAACCGATTCCTCAGTAG	221-240	469
	SBV 2r	CCTTGGAACTCTGCTGTGTA	670-689	

Potek dela reverzne transkripcije virusne RNA in sledeče pomnoževanje cDNA.

V 1,5 ml epruveti smo pripravili reakcijsko zmes z dodajanjem posameznih reakcijskih komponent za izbrani par začetnih oligonukleotidov. Pripravili smo reakcijsko mešanico in dodali po 4 µl izolirane RNA ali negativno kontrolo (dd H<sub>2</sub>O). Epruvete z reakcijsko mešanico smo vstavili v termopomnoževalnik in vključili program avtomatskega spreminjanja temperatur.

Produkte RT-PCR smo analizirali in dokazali z elektroforezo v 1,2 % agaroznem gelu. DNA v agaroznem gelu smo analizirali z UV transiluminatorjem. Uporabili smo 2 µl standarda velikosti DNA (GeneRuler™ 100bp DNA ladder molecule size marker (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania).

## REZULTATI IN SKLEPNE UGOTOVITVE

### Teže matic in ovarijev ter število ovarialnih cevk

Telesne mase matic so prikazane v tabeli. Matice so v povprečju tehtale 208,37 mg. Najtežje matice so tehtale 229,1 mg ( $\pm 15,6$ ), najlažje pa 187,0 mg ( $\pm 15,0$ ). Povprečna masa ovarijev je bila 69,78 mg. Najtežji ovariji so tehtali 89,1 mg ( $\pm 13,6$ ), najlažji pa 43,4 mg ( $\pm 8,8$ ).

Tabela 3: Masa matic in ovarijev v miligramih.

Vzrejevalec	Masa matic (mg)	SD
Mlakar	229,1	15,6
Vozelj	220,4	7,0
Grm	218,0	9,5
Sever	216,4	11,0
Tratnjek	216,2	26,4
Gaber	214,8	20,0
Jug	213,8	11,4
Kropivšek	213,6	29,4
Kavaš	213,1	12,7
Kapun	211,3	20,6
Herbaj	210,4	17,7
Bučar	209,3	16,2
Magdič	209,1	24,5
Janez Dremelj	208,2	13,1
Pislak	207,6	8,9
Jakšič	207,0	6,3
Čiček	206,7	15,8
Ficko	206,3	17,6
Bukovšek	206,2	6,7
Pokorni	204,9	20,7
Andrejč	204,4	23,5
Čebelarstvo Lucka	202,8	8,8
Ivan Dremelj	198,7	13,3
Jurinec	198,4	11,9
Luznar	196,9	13,0
Donko	196,3	16,8
Šolar	187,0	15,0

Vzrejevalec	Masa ovarijev (mg)	SD
Mlakar	89,1	13,6
Kavaš	87,7	13,2
Kapun	87,4	10,6
Kropivšek	80,4	11,1
Herbaj	78,6	15,6
Vozelj	77,7	7,1
Magdič	77,4	9,0
Tratnjek	76,4	12,6
Jug	72,8	6,4
Sever	72,7	8,4
Grm	72,3	12,2
Pokorni	71,9	9,7
Bukovšek	71,7	7,8
Gaber	71,1	20,4
Luznar	69,9	10,6
Bučar	69,3	11,1
Čebelarstvo Lucka	69,3	7,4
Jurinec	69,1	15,6
Šolar	65,6	9,6
Čiček	64,6	10,8
Andrejč	63,9	9,3
Ivan Dremelj	63,3	13,8
Jakšič	60,9	8,8
Janez Dremelj	53,9	16,7
Ficko	53,0	9,4
Pislak	52,0	9,6
Donko	43,4	8,8



Tabela 4. Statistične značilnosti vrednotenja mase telesa matic in mase ovarijev.

<b>Masa matic</b>		<b>Masa ovarijev</b>		<b>Razmerje: masa matic/ovariji</b>	
Mean	208,3745	Mean	69,78600823	Mean	33,42506
Standard Error	1,13108	Standard Error	0,980881005	Standard Error	0,410104
Median	209	Median	70	Median	33,98058
Mode	209	Mode	80	Mode	33,33333
Standard Deviation	17,63178	Standard Deviation	15,29042163	Standard Deviation	6,392885
Range	133	Range	86	Range	39,79991
Minimum	149	Minimum	29	Minimum	12,23629
Maximum	282	Maximum	115	Maximum	52,0362
Sum	50635	Sum	16958	Sum	8122,291
Count	243	Count	243	Count	243
Largest(1)	282	Largest(1)	115	Largest(1)	52,0362
Smallest(1)	149	Smallest(1)	29	Smallest(1)	12,23629

Tabela 5: Razmerje med maso ovarijev in telesno maso matic.

<b>Vzrejevalec</b>	<b>Masa matic (mg)</b>	<b>Masa ovarijev (mg)</b>	<b>Razmerje mase: ovarij/telesna masa (%)</b>
Kapun	211	87,4	41,5
Kavaš	213	87,7	41,1
Mlakar	229	89,1	38,8
Kropivšek	214	80,4	37,7
Magdič	209	77,4	37,2
Herbaj	210	78,6	37,0
Tratnjek	216	76,4	36,0
Luznar	197	69,9	35,4
Vozelj	220	77,7	35,3
Pokorni	205	71,9	35,1
Šolar	187	65,6	35,0
Bukovšek	206	71,7	34,8
Jurinec	198	69,1	34,6
Jug	214	72,8	34,1
Sever	216	72,7	33,5
Bučar	209	69,3	33,2
Grm	218	72,3	33,1
Čebelarstvo Lucka	203	69,3	33,0
Gaber	215	71,1	32,7
Dremelj Ivan	199	63,3	31,8
Andrejč	204	63,9	31,4
Čiček	207	64,6	31,2
Jakšič	207	60,9	29,4
Dremelj Janez	208	53,9	26,1
Ficko	206	53,0	25,6
Pislak	208	52,0	25,0
Donko	196	43,4	22,0

Ruttner (1983) in Woyke (1971) navajata, da je število ovarialnih cevk tesno povezano s starostjo presajenih ličink. Z naraščajočo starostjo ličink pri presajanju število ovariol upada. Pri matici, ki je bila vzrejena iz enodnevnih ličink, je v povprečju preštel 154 ovariol/ovarij, pri dvodnevnih 146 in pri maticah vzrejenih iz trodnevnih ličink 136 ovarialnih cevk/ovarij. Orosi-Pal (navajano pri Ruttner, 1983) predlaga 150 ovarialnih cevk/ovarij kot standard za matico dobre kvalitete

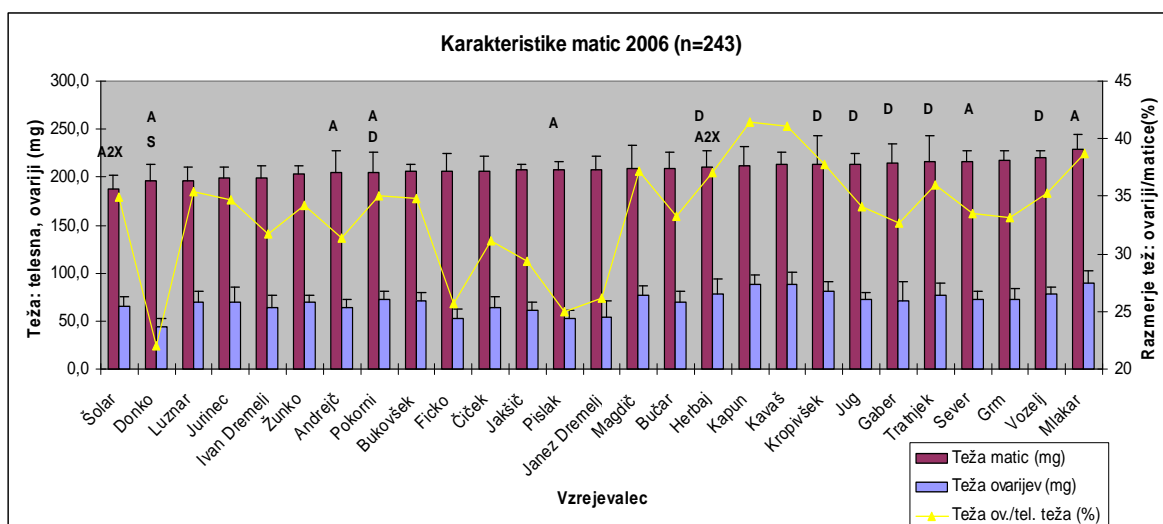
Tabela 6: Število ovarialnih cevk pri maticah.

Vzrejevalec	Št. ovariol			
	Povp.	Min.	Max.	SD
Magdič	182	160	194	9,95
Ficko	174	155	188	9,89
Šolar	172	139	191	16,99
Dremelj Ivan	170	157	193	11,67
Čebelarstvo Lucka	168	108	199	26,68
Herbaj	168	127	198	21,34
Kropivšek	168	150	182	12,97
Bučar	166	142	199	16,22
Čiček	165	149	194	14,73
Bukovšek	165	154	176	8,31
Kapun	164	140	180	14,73
Luznar	163	125	207	22,7
Mlakar	162	147	176	10,20
Grm	162	141	187	14,75
Jug	162	150	174	8,08
Dremelj Janez	160	144	183	14,59
Sever	160	146	182	11,76
Kavaš	158	134	189	17,99
Jurinec	157	142	168	9,28
Vozelj	157	138	178	15,41
Andrejč	157	131	171	12,55
Gaber	156	110	186	23,0
Pokorni	156	143	168	9,78
Donko	154	137	170	9,04
Pislak	153	122	169	14,42
Tratnjek	143	128	155	9,98
Jakšič	141	107	163	22,15

Pri mikroskopski preiskavi ovarijev smo prešteli število ovarialnih cevk. Rezultati so prikazani v tabeli 6. Korelacija med težo matic in težo ovarijev  $r^2 = 0,4830$ ; korelacija med težo ovarijev in številom ovariol ni bila ugotovljena ( $r^2 = 0,1423$ ), prav tako ni bila ugotovljena korelacija med številom ovariol in razmerjem teže ovariji/telesna teža ( $r^2 = 0,2270$ ).

V grafu 1 so prikazane telesne mase stehanih matic in mase ovarijev, ter razmerje med maso ovarijev in maso matic z vezano črto. Nad stolpci je prikazana prisotnost virusov (A- ABPV, S- SBV, D-DWV, BQCV ni bil ugotovljen).





Graf 1. Telesna masa matic in ovarijev in razmerje med njima. Prisotnost virusov.

### Število semenčic v spermateki matic:

Razvrstitev je prikazana po povprečnem številu semenčic/spermateko matice pri posameznem vzrejevalcu.

Tabela 7: Število semenčic v spermatekah matic.

Vzrejevalec	Št. vzorcev	Število semenčic / spermateko (* 10 <sup>-6</sup> )			
		Povp.	Min.	Max.	SD
Vozelj	10	4,9	2,9	7,6	1,56
Šolar	9	4,5	0,7	6,7	2,05
Grm	9	4,2	0,3	7,2	2,04
Bukovšek	9	4,2	1,1	6,9	2,15
Jug	9	4,2	0,6	6,6	1,55
Andrejč	9	4,0	0,8	7,2	2,24
Magdič	9	3,9	1,8	6,5	1,59
Pokorni	8	3,9	2,1	5,6	1,31
Ficko	9	3,8	1,6	5,5	1,21
Pislak	8	3,7	1,1	5,0	1,28
Sever	9	3,7	0,6	7,6	2,20
Dremelj Janez	7	3,6	0,4	6,0	1,72
Tratnjek	9	3,5	2,1	5,2	1,00
Donko	9	3,4	1,1	7,0	1,89
Luznar	9	3,4	1,1	5,6	1,33
Jakšič	9	3,3	1,1	6,2	1,94
Čiček	9	3,2	0,4	6,0	1,82
Kropivšek	9	3,2	0,8	7,7	2,33
Kavaš	9	3,1	1,8	4,1	0,82
Herbaj	9	2,8	0,7	4,3	1,13
Bučar	9	2,7	0,3	4,3	1,07
Kapun	9	2,7	0,1	5,8	1,93
Mlakar	8	2,7	0,6	4,1	1,13
Jurinec	9	2,6	0,3	5,9	1,77
Čebelarstvo Lucka	9	2,6	0,6	7,1	2,07
Gaber	9	2,4	1,4	3,5	0,79
Dremelj Ivan	9	2,4	0,6	5,2	1,47

## Meritve kril

Tabela 8: Dolžina in širina kril.

Vzrejevalec	Dolžina krila ( $\mu\text{m}$ )				Širina krila ( $\mu\text{m}$ )			
	Povp.	Min.	Max.	SD	Povp.	Min.	Max.	SD
Jug	10169,1	9765,4	10612,3	280,53	3241,3	3073,2	3340,6	102,77
Sever	10142,6	9779,3	10751,2	289,11	3231,5	3085,6	3370,4	107,77
Luznar	10047,3	9694,2	10432,6	270,87	3204,4	3072,5	3312,2	87,43
Magdič	10027,5	9569,5	10353,4	253,71	3310,4	3141,9	3456,3	99,24
Vozelj	10015,6	9684,2	10485,8	226,49	3306,0	3253,1	3400,0	43,69
Gaber	10015,2	9599,4	10392,9	311,51	3353,3	3289,0	3389,2	37,55
Bučar	9977,9	9513,4	10610,2	407,19	3272,3	3120,9	3405,1	94,48
Dremelj Janez	9968,8	9328,5	10719,0	404,01	3284,1	3187,8	3370,4	60,60
Pokorni	9958,3	9762,9	10394,2	204,34	3348,6	3296,5	3418,9	39,91
Mlakar	9925,2	9573,3	10366,1	232,27	3229,4	3125,0	3293,8	61,59
Herbaj	9910,7	9581,0	10167,6	216,08	3322,3	3167,9	3433,2	81,40
Kavaš	9903,7	9209,7	10249,5	300,36	3308,5	3068,5	3461,0	111,63
Andrejč	9859,8	9479,5	10238,3	253,19	3283,5	3113,6	3400,5	120,52
Čiček	9822,7	9143,4	10683,6	590,07	3330,4	3123,8	3413,2	87,78
Bukovšek	9816,8	9691,4	9923,8	77,81	3261,2	3202,8	3339,0	51,48
Kropivšek	9807,0	9237,8	10315,1	326,33	3220,8	2911,3	3383,2	147,35
Tratnjek	9797,1	9364,4	10477,6	373,30	3289,0	3157,8	3448,7	110,73
Pislak	9762,6	9087,1	10116,4	336,33	3254,6	3148,2	3357,6	71,43
Čebelarstvo Lucka	9761,7	9167,3	10239,3	356,91	3276,7	3089,5	3397,7	132,97
Ficko	9707,3	9117,3	10349,1	403,09	3246,8	3073,2	3414,5	115,43
Donko	9693,8	9085,1	10255,8	355,76	3281,9	3113,8	3489,6	98,50
Dremelj Ivan	9685,4	9146,4	10212,5	293,58	3161,2	3036,5	3298,3	91,24
Kapun	9675,3	8884,9	10014,	328,27	3207,9	2989,4	3383,3	127,88
Šolar	9666,4	8960,0	10075,4	316,16	3073,1	2808,8	3186,5	110,13
Jakšič	9613,0	8765,3	10360,1	531,31	3342,2	3242,9	3444,0	85,72
Jurinec	9612,0	8866,4	10461,4	513,56	3155,7	3011,3	3285,5	106,03
Grm	9316,8	8347,8	9890,6	479,07	3261,5	3142,4	3422,6	81,69

Korelacija med dolžino in širino obraznega dela glave je 0,8925, med dolžino in širino kril 0,44971934, med težo matic in širino kril je 0,3982.

## Meritve glav

Med mnogimi razlikami, ki jih najdemo med čebelami delavkami in matico, jih je največ na glavi. Med drugim je glava čebele delavke bolj trikotne oblike in ima daljši rilček. Glava matice pa je bolj okrogle oblike, s krajšim rilčkom. Iz izmerjenih dolžin od srednjega pikčastega očesa do ustnice ter razdalje med obema sestavljenima očesoma smo izračunali obrazni indeks, ki po Ruttnerju (1983) za čebele delavke znaša 1,27, za matice pa 1,07. V tabeli 9 so prikazane vrednosti, ki smo jih dobili pri meritvah matic in se ujemajo z ugotovitvami Ruttnerja.

Tabela 9. Dolžina in širina glave pri maticah.

Vzrejevalec	Dolžina ( $\mu\text{m}$ )	Širina ( $\mu\text{m}$ )	Obrazni indeks
Kavaš	2728,1	2515,9	1,09
Tratnjek	2700,1	2490,2	1,08
Dremelj Janez	2687,7	2518,0	1,07
Bučar	2670,9	2527,7	1,06
Jurinec	2658,9	2478,7	1,07
Donko	2675,1	2516,5	1,06
Čiček	2684,0	2519,6	1,07
Jakšič	2725,2	2547,9	1,07
Gaber	2733,0	2522,8	1,08
Čebelarstvo Lucka	2611,8	2467,3	1,06
Dremelj Ivan	2507,2	2331,2	1,08
Herbaj	2470,8	2303,1	1,07
Kapun	2382,0	2233,0	1,07
Pislak	2429,3	2300,7	1,06
Mlakar	2382,9	2281,4	1,04
Grm	2428,6	2286,0	1,06
Vozelj	2430,1	2308,4	1,05
Bukovšek	2415,1	2298,2	1,05
Šolar	2386,7	2233,7	1,07
Jug	2434,9	2299,5	1,06
Luznar	2383,3	2261,8	1,05
Sever	2424,0	2302,4	1,05
Ficko	2472,6	2310,5	1,07
Andrejč	2391,2	2241,7	1,07
Kropivšek	2663,0	2500,0	1,07
Magdič	2620,8	2526,8	1,04
Pokorni	2666,8	2481,1	1,08

### Dokazovanje virusne RNA z metodo RT-PCR

Čebelje matice, ki so bile pripravljene na analize prisotnosti virusov, so služile za izolacijo RNA. V vzorcu je bilo 80 matic, ki so bile analizirane na 4 viruse. Skupno je bilo opravljenih 320 analiz. Začetne oligonukleotide za metodo RT-PCR smo izbrali na osnovi objavljenih nukleotidnih zaporedij genomov virusov ABPV, DWV, SBV in BQCV. Z izbranimi začetnimi oligonukleotidi smo izolirano virusno RNA prevedli v cDNA in slednjo pomnožili s PCR.

Tabela 10: Rezultati RT-PCR za viruse: ABPV, SBV, BQCV in DWV pri vzorcih čebeljih matic

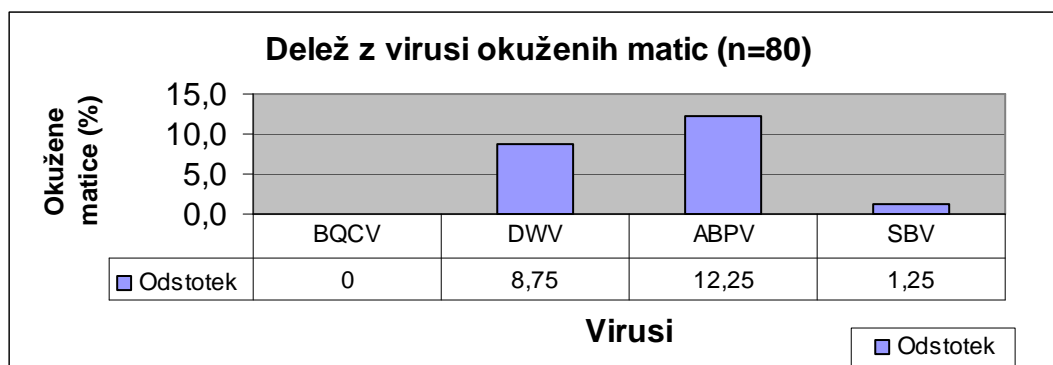
<b>Ime</b>	<b>Prisotnost virusa</b>
Kavaš	neg.
Kavaš	neg.
Kavaš	neg.
Tratnjek	<b>DWV</b>
Tratnjek	neg.
Tratnjek	neg.
Janez Dremelj	neg.
Janez Dremelj	neg.
Janez Dremelj	neg.
Bučar	neg.
Bučar	neg.
Bučar	neg.
Jurinec	neg.
Jurinec	neg.
Jurinec	neg.
Donko	<b>ABPV, SBV</b>
Donko	neg.
Donko	neg.
Čiček	neg.
Čiček	neg.
Čiček	neg.
Jakšič	neg.
Jakšič	neg.
Jakšič	neg.
Gaber	neg.
Gaber	neg.
Gaber	<b>DWV</b>
Čebelarstvo Lucka	neg.
Čebelarstvo Lucka	neg.
Čebelarstvo Lucka	neg.
Ivan Dremelj	neg.
Ivan Dremelj	neg.
Ivan Dremelj	neg.
Herbaj	<b>DWV</b>
Herbaj	<b>ABPV</b>
Herbaj	<b>ABPV</b>
Kapun	neg.
Kapun	neg.
Kapun	neg.
Pislak	<b>ABPV</b>
Pislak	neg.
Pislak	neg.
Mlakar	<b>ABPV</b>
Mlakar	neg.
Grm	neg.
Grm	neg.
Grm	neg.

Ime	Prisotnost virusa
Vozelj	neg.
Vozelj	<b>DWV</b>
Vozelj	neg.
Bukovšek	neg.
Bukovšek	neg.
Bukovšek	neg.
Šolar	<b>ABPV</b>
Šolar	neg.
Šolar	<b>ABPV</b>
Jug	<b>DWV</b>
Jug	neg.
Jug	neg.
Luznar	neg.
Luznar	neg.
Luznar	neg.
Sever	neg.
Sever	<b>ABPV</b>
Sever	neg.
Ficko	neg.
Ficko	neg.
Ficko	neg.
Andrejč	neg.
Andrejč	<b>ABPV</b>
Andrejč	neg.
Kropivšek	neg.
Kropivšek	neg.
Kropivšek	<b>DWV</b>
Magdič	neg.
Magdič	neg.
Magdič	neg.
Pokorni	<b>ABPV</b>
Pokorni	<b>DWV</b>
Pokorni	neg.

Legenda:

Oznaka virusa: pozitiven rezultat

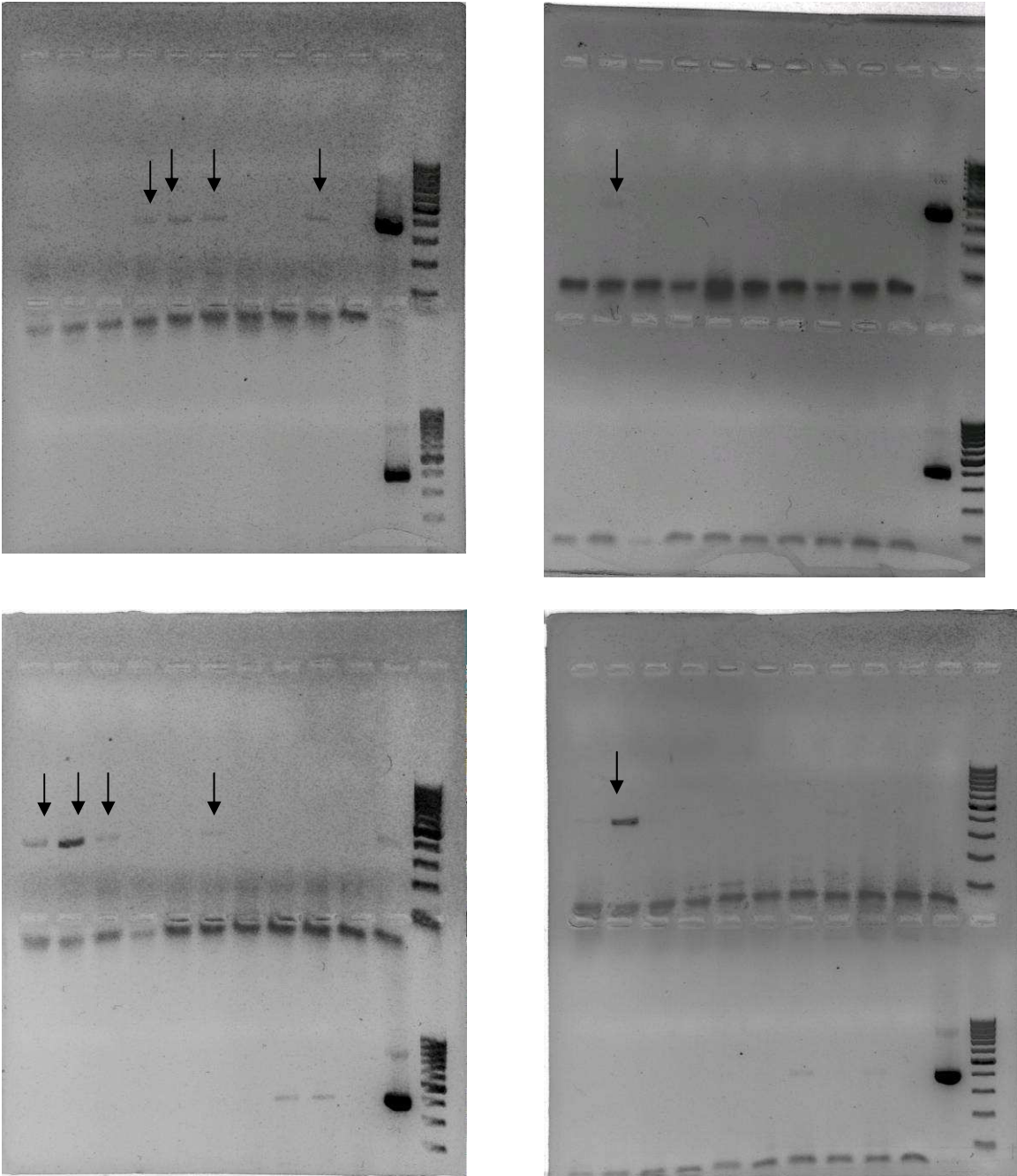
neg : negativen rezultat



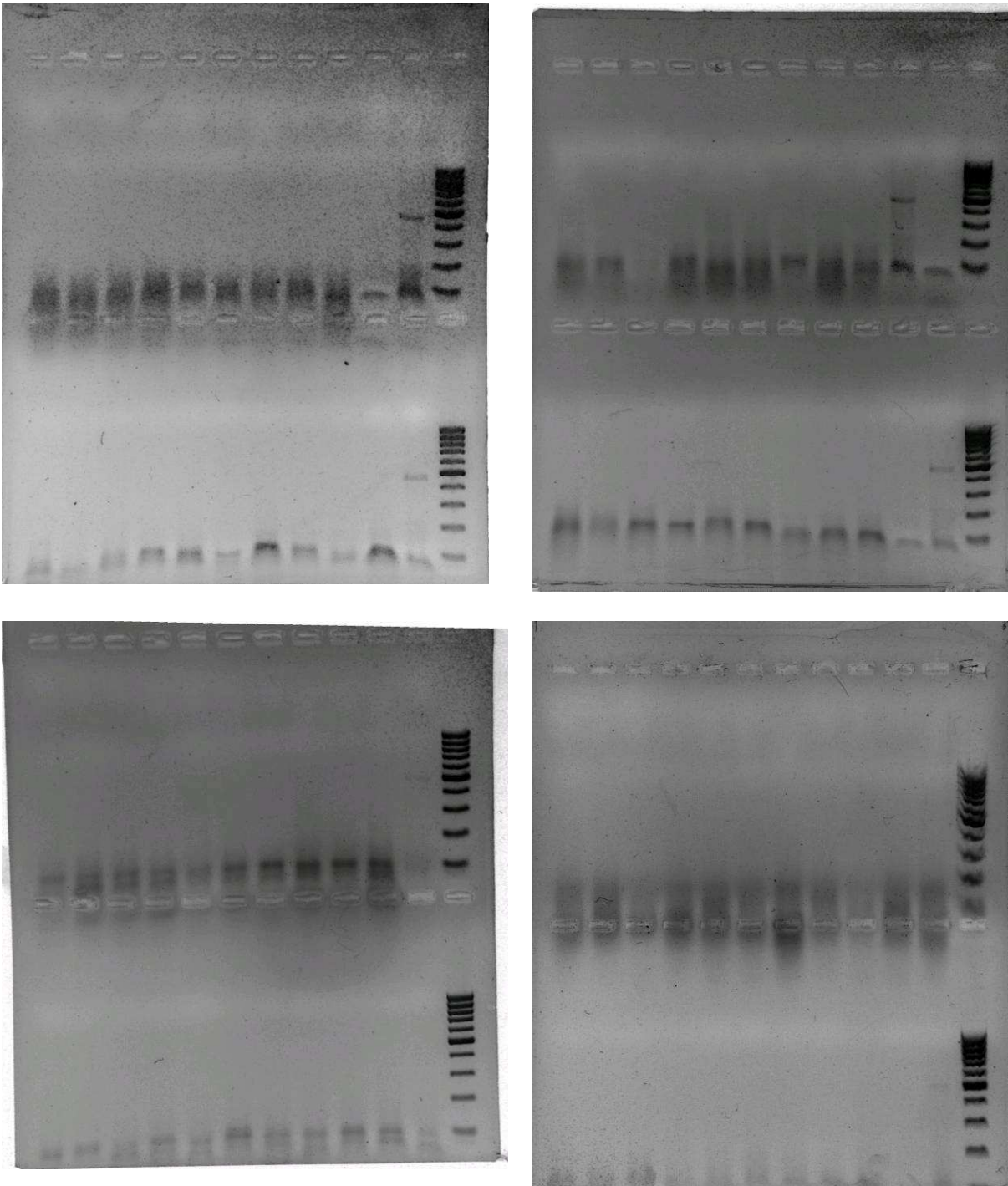
Graf 2: Pojavljanje posameznih virusov pri vseh preiskanih maticah.

Odstotek pozitivnih vzorcev na preiskovane viruse v celotnem vzorcu 80 preiskanih matic: 12,25 % matic je bilo pozitivnih na ABPV, 8,75 % matic na DWV, 1,25 % na SBV. BQCV pri preiskanih vzorcih matic nismo ugotovili.

Slike prikazujejo rezultate pomnoževanja preiskovanih vzorcev matic z metodo RT-PCR v agaroznem gelu.

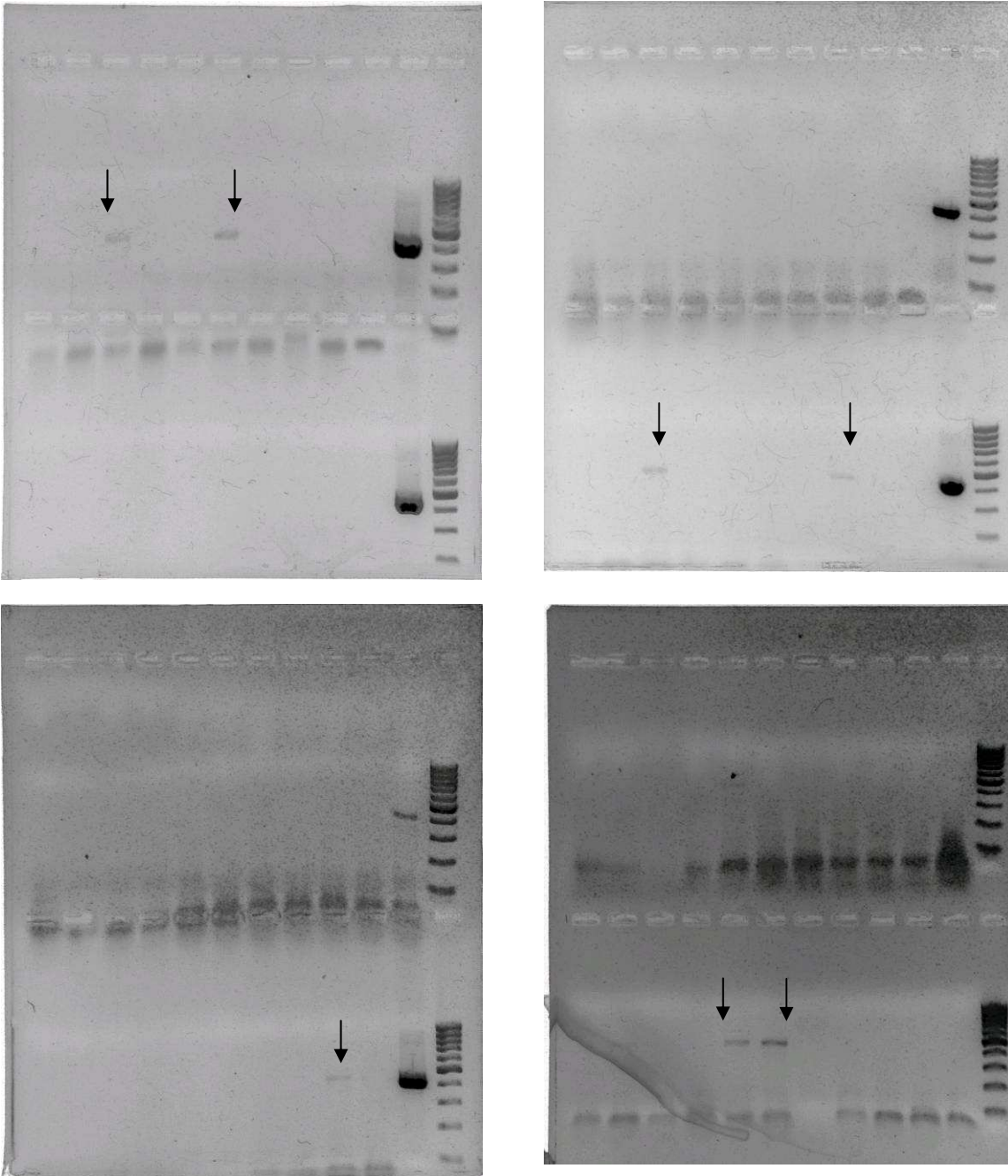


Slika 12. Rezultati pomnoževanja virusa ABPV z metodo RT-PCR z zunanji in notranji začetnimi oligonukleotidi iz RNA, izolirane iz vzorcev matic.



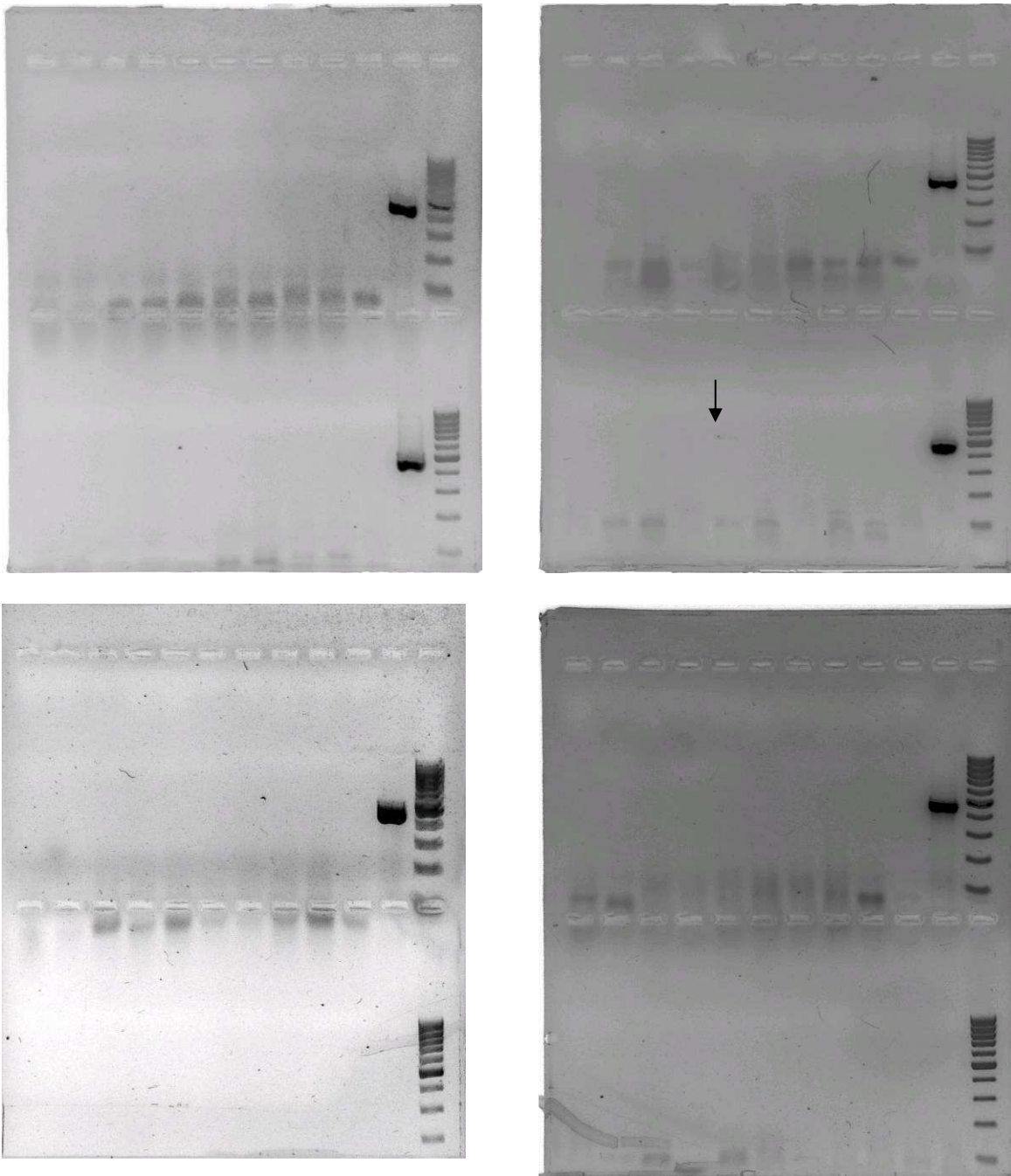
Slika 13. Rezultati pomnoževanja virusa BQCV z metodo RT-PCR z zunanjsimi in notranjsimi začetnimi oligonukleotidi iz RNA, izolirane iz vzorcev matic.





Slika 14. Rezultati pomnoževanja virusa DWV z metodo RT-PCR z zunanji in notranji začetnimi oligonukleotidi iz RNA, izolirane iz vzorcev matic.





Slika 15. Rezultati pomnoževanja virusa SBV z metodo RT-PCR z zunanjimi in notranjimi začetnimi oligonukleotidi iz RNA, izolirane iz vzorcev matic.

## **REZULTATI PRENOSOV V ČEBELARSKO PRAKSO USPOSABLJANJE ČEBELARJEV IN DELAVNICE**

Rezultati naloge so analizirani in so bili posredovani domači in mednarodni čebelarji javnosti. Rezultate smo posredovali na predavanjih in delavnicah za čebelarje, ki se usposablajo za vzrejo matic. Predavanja so bila v Novem mestu, Krškem in v Izobraževalnem centru na Zelenici. Predstavljeni so bili na mednarodni konferenci v Franciji v okviru skupine Eurbee (april 2007) in na konferenci v organizaciji IBRA in Univerze v Helsinkih (junij 2007).

Rezultati bodo v nadaljevanju spremljanja lastnosti v prihodnjem obdobju omogočili določiti pomen spremljanja posameznih morfoloških, fizioloških in patogenih karakteristik z namenom določiti parametre kvalitete vzrejenih matic. Vzoredne raziskave, ki potekajo na Kmetijskem Inštitutu Slovenije z namenom ugotoviti vplive ugotovljenih karakteristik čebeljih matic (teža telesa, ovarijev, količina semena, okužba z virusi) na fiziološke in reproduktivne sposobnosti matic dopolnjujejo pomen izvedbe te naloge. Rezultati opravljene naloge bodo služili svetovanju vzrejevalcem čebeljih matic pri izbiri ustrezne tehnologije vzreje in pri zagotavljanju optimalne opravitve čebeljih matic.

Izvedena naloga predstavlja dobro izhodišče za nadaljevanje izvajanja spremljanja lastnosti vzrejenih čebeljih matic in izboljševanja pogojev vzreje in doseganje še boljših vzrejnih rezultatov.

Rezultati naloge predstavljajo tudi pomemben prispevek k spremljanju lastnosti čebeljih matic, ki se pojavljajo na trgu in bodo omogočale nove možnosti trženja matic v prihodnjem obdobju.

#### Seznam sodelujočih v projektu

1. Prof. dr. Aleš Gregorc, vodja projekta
2. Mag. Veronika Kmecl, vodja laboratorija za med – analitik
3. Maja Smodiš Škerl, dr. vet. med., sodelavka
4. Lucija Poljanšek, dr. vet. med., sodelavka
5. Dr. Drago Babnik, sodelavec
6. Mag. Blaž Šegula, sodelavec
7. Vesna Lokar, univ. dipl. inž. kmet., sodelavka
8. Marinka Kregar, univ. dipl. ing. kmet., analitik
9. Mag. Romana Rutar, analitik

Poročilo pripravil  
Dr. Aleš Gregorc

## Uporabljena literatura:

- Bailey, L., Ball, B.V. (1991), Honey bee pathology. 2nd ed. London: Academic Press, 10- 34.
- Bailey, L, Gibbs, A.J., Woods, R.D. (1964). Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.). *Virology* 23: 425- 9.
- Ball, B.V. (1985). Acute paralysis virus isolated from honeybee colonies infected with *Varroa jacobsoni*. *J Apic Res* 24: 115- 9.
- Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., Nowotny, N. (2006). Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Applied and environmental microbiology*, Apr. 2414–2420
- Czekonska, K. 2000 The influence of *Nosema apis* on young honey bee queens and transmission of the disease from queens to workers, *Apidologie*, 31, 701-706.
- Collins, A.M. 2000. Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie* 31, 421-429.
- Gregorc, A. (2005). Vzreja čebeljih matic (*Apis mellifera carnica*). Žirovnica: Čebelarska zveza Zgornje Gorenjske, 48 str.
- Gregorc, A., Poklukar, J., Perko, M., Babnik, D. Incidence of nosema disease in queen-rearing (*Apis mellifera* Pollm.) apiaries in Slovenia. *Zb. Vet. fak. - Univ. Ljubl.* [Slovenska izd.], 1991, let. 28, št. 1, str. 19-24.
- Gregorc, A., Fijan, N., Poklukar, J. (1992) The effect of *Apis mellifera carnica* Polm. worker bee source for populating mating nuclei on degree of infection by *Nosema apis* Zander. *Apidologie*, 23, str. 241-244.
- 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. 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.
- Koeniger, G., N. Koeniger, S. Tingek, and M. Phiancharoen. 2005. Variance in spermatozoa number among *Apis dorsata* drones and among *Apis mellifera* drones. *Apidologie*, no. 36:279-284.
- Kraus, B, Koeniger, N, Fuchs, S. (1986). Unterscheidung zwischen Bienen verschiedenen Alters-durch *Varroa jacobsoni* oud. und Bevorzugung von Ammenbienen in Sommerbienenvolk. *Apidologie* 17: 257- 66.
- Remick, D.O., Kunkel, S.L., Holbrook, E.A., Hanson, C.A. (1990). Theory and applications of the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 93, (Suppl. 1): 49- 54.
- Rhodes, J.W., Somerville, D.C. and Harden, S. (2004). Queen honey bee introduction and early survival - effects of queen age at introduction *Apidologie* 35, 383-388.
- Ruttner, F. 1983. Queen rearing, Apimondia Publishing House, Bucharest.

Schäfer, M.O., Dietemann, V., Pirk, C.W.W., Neumann, P., Crewe, R.M., Hepburn, H.R., Tautz, J. and Crailsheim, K. (2006). Individual versus social pathway to honeybee worker reproduction (*Apis mellifera*): pollen or jelly as protein source for oogenesis?" *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*.

Stephen, J.Mm (2001). The role of varroa and viral pathogens in the collapse of honeybee colonies: a modelling approach. *J Appl Eco*1 38: 1082- 93.

Tarpy, David R., Shanti Hatch and David J. C. Fletcher, 2000. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. *Animal behaviour*, 2000, 59, 97–101.

White, G.F. (1917). *Sacbrood*. Washington: U. S. Department of Agriculture, 55 str.

Woyke, J. 1971. Correlations between the age at which honey bee brood was grafted, characteristics of the resultant queens, and results of insemination, *Journal of Apicultural research*, 10 (1), 45-55.