

UTJECAJ STAROSTI MATICA PČELA (*Apis mellifera*) NA BROJ SPERMIJA U SPERMATECI

Šurlan Spitzmuller, Ivor

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:310132>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivor Šurlan Spitzmuller

Sveučilišni diplomski studij

Smjer: Specijalna zootehnika

Utjecaj starosti matice pčela (*Apis mellifera*) na broj spermija u spermateci

Diplomski rad

Osijek, 2016.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivor Šurlan Spitzmuller

Sveučilišni diplomski studij

Smjer: Specijalna zootehnika

Utjecaj starosti matice pčela (*Apis mellifera*) na broj spermija u spermateci

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocijenu i obranu završnog rada:

1. Prof.dr.sc. Tihomir Florijančić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Zlatko puškadija, mentor
3. Izv.prof.dr.sc. Siniša Ozimec, član
4. Dr.sc. Dinko Jelkić, zamjenski član

Osijek, 2016.

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Osnovne informacije o pčelama | 1 |
| 1.2. Anatomija pčela i spolni organi matice | 4 |
| 1.3. Uvod u istraživanu temu | 6 |
| 2. PREGLED LITERATURE..... | 7 |
| 2.1. Anatomija spolnog sustava | 7 |
| 2.2. Istraživanja utjecaja starosti matice pčela na broj spermija u spermateci | 11 |
| 2.3. Mjerenje parametara u ovom istraživanju | 11 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 15 |
| 4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA | 22 |
| 5. RASPRAVA | 29 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 31 |
| 7. POPIS LITERATURE | 32 |
| 8. SAŽETAK..... | 35 |
| 9. SUMMARY | 36 |
| 10. POPIS TABLICA..... | 37 |
| 11. POPIS SLIKA..... | 38 |
| 12. POPIS GRAFIKONA | 40 |

1. UVOD

1.1. Osnovne informacije o pčelama

Pčele pripadaju skupini kukaca (*Insecta*), najbrojnijem koljenu, člankonošcima (*Arthropoda*) u redu opnokrilaca (*Hymenoptera*) podreda (*Apocrita*), grupi žalčara (*Aculeata*), porodici pčela (*Apidae*) i potporodici (*Apinae*). Tijelo pčele sastoji se od tri osnovna dijela: glave, prsa i zadka. Posjeduju dva para krila (prednja krila i stražnja krila) pomoću kojih lete, te tri para nogu koje im služe za hodanje. Nastanjuju se na livadama, pašnjacima, voćnjacima, vinogradima, oranicama i šumama. Mogu nastanjivati teže i siromašnije terene i područja kao što su stijene. Dijeluju kao oprašivači biljaka. Pelud uz nekatar prenose u košnicu gdje im služe kao izvor hrane. Pčele žive u zajednicama u kojima glavnu jedinku predstavlja matica, ujedno i jedina reproduktivno sposobna jedinka ženskog spola. Životni vijek matice je tri do četiri godine. U pčelinjoj zajednici najbrojnije jedinke su radilice. Radilice su ženske jedinke čiji je zadatak održavanje zajednice, donošenje hrane i hranjenje legla te obrana zajednice. Životni vijek radilica iznosi od nekoliko tjedana do 6 do 8 mjeseci. Trutovi su muške jedinke koje žive također 6 do 8 mjeseci. Njihova je osnovna zadaća oplodivanje matice. Nakon parenja sa maticom trutovi ugibaju. (Tucak i sur., 1999.)

Nomenklatura:

Carstvo: Animalia

Koljeno: Arthropoda

Razred: Insecta

Red: Hymenoptera

Podred: Apocrita

Nadporodica: Apoidea

Porodica: Apidae

Potporodica: Apinae

(izvor: <http://hr.wikipedia.org/wiki/P%C4%8Dele>)

ŽIVOTNI CIKLUS PČELE



Slika 1: Životni ciklus pčele

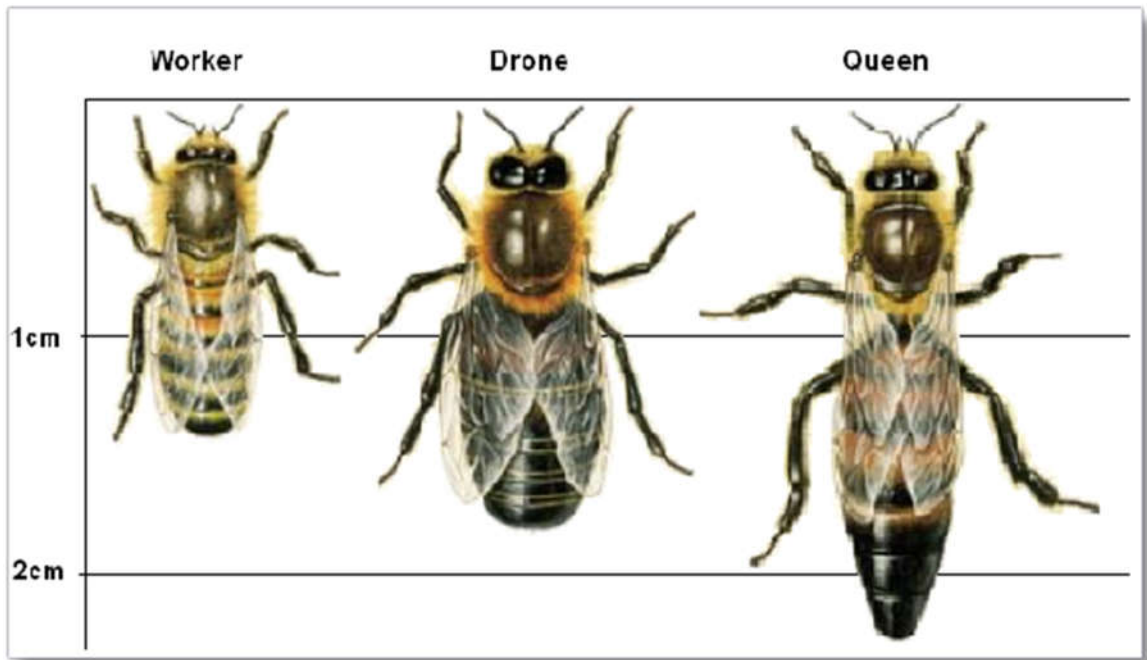
(izvor: <http://blog.dnevnik.hr/apikultura/2013/02/1631508163/zivotni-ciklus-pcele-medarice.html>)

Danas se za uzgoj pčela i dobivanje pčelinjih proizvoda najviše koristi Europsko- afrička medonosna pčela (*Apis mellifera*), koja se još naziva i domaća pčela. Sam rod *Apis* ima četiri vrste, a to su:

- *Apis dorsata* - Velika indijska pčela
- *Apis florea* - Mala indijska pčela
- *Apis indica* - Indijska pčela
- *Apis mellifera* - Europsko- afrička medonosna pčela

Medonosna pčela (*Apis Mellifera*) se nadalje dijeli na četiri rase:

- *Apis mellifera mellifera* - Sjeverno- europska pčela
- *Apis mellifera casvcasica* - Kavkavska siva pčela
- *Apis mellifera ligustica* - Talijanska pčela
- *Apis mellifera carnica* - Kranjska pčela ili Siva medonosna pčela



Slika 2: Članovi pčelinjeg društva (radilica, trut i matica)
 (izvor: http://barnsleybeekeepers.org.uk/bee_sexes.html)

Na našim prostorima se uzgaja Kranjska pčela (*Apis mellifera carnica*, Pollmann, 1879.), podrijetlom iz Slovenije. Rasprostranjena je na području: Slovenije, Austrije, Hrvatske, Mađarske, Bosne i Hercegovine, Srbije, te Rumunjske i Bugarske. Cijenjena je među pčelarima jer je otpornija na određene bolesti i nametnike, te daje visok prinos meda i nije previše agresivna. Zajednice ovih pčela brzo se razvijaju u proljeće, a također i dobro prezimljavaju.



Slika 3: *Apis mellifera carnica*, matica i radilice

(izvor: <http://apis-mellifera-carnica.eu/gallery/index.php/Authentic-Apis-mellifera-carnica>)

1.2. Anatomija pčela i spolni organi matice

Anatomsku građu kod pčela čine dva osnovna sustava. To su vanjski i unutrašnji sustav. Vanjski sustav čine kožni sustav i ekstremiteti (tri para nogu i dva para krila), dok se unutrašnji sustav sastoji od sedam sustava organa, a to su dišni sustav, krvožilni sustav, živčani sustav, spolni sustav, probavni sustav, žljezdani i osjetilni sustav. Svaki sustav odgovoran je za određene funkcije organizma.

Spolni ili reproduktivni sustav matice čine spolni organi koji su smješteni kod svih pčela u zatku. Pčele su specifične po tome što sve ženske jedinke društva (matice i radilice) nemaju reproduktivnu sposobnost niti imaju sve iste spolne organe. Spolni organi kod matice su:

- a) jajnici - ovaria
- b) jajovod - oviduct
- c) neparni jajovod - vagina
- d) spermateka - receptaculum seminis
- e) dodatne žljezde - glandulae apendiculares
- f) odvodni kanal - ductus seminalis,

dok su spolni organi kod pčela radilica:

- a) jajnici - ovaria
- b) jajovod - oviduct
- c) neparni jajovod - vagina
- d) odvodni kanal - ductus seminalis

Iz priloženog vidimo da pčele radilice u odnosu na maticu koja je reproduktivno sposobna, nemaju spermateku i dodatne žlijezde (dvije male žlijezde na vanjskoj stijenci spermateke koje služe za ishranu spermija unutar spermateke) (Tucak i sur., 1999). Kod pčela radilica vaginalno predvorje je slabije razvijeno u toku evolucije, te ne može radi toga izvršiti kopulaciju sa trutom. Odvodni kanal postoji i kod matice i kod pčela radilica, no kod pčela radilica on također nije potpuno razvijen te ima samo fizičke naznake. Jajnici su parni organi reproduktivnog sustava koji služe za proizvodnju jajnih stanica. Oni su kruškolikog oblika i u njima se nalaze jajne cjevčice, njih 120 do 200. U početnom dijelu jajnih cjevčica stvaraju se jajne zametne stanice iz kojih se razvija jaje. Jajovod je odvodni kanal za jajne stanice, koji spaja jajnike sa neparnim jajovodom ili vaginom. Odvodni kanal ili ductus seminis spaja spermateku i vaginu (Camagro i Mello, 1970).

Spermateka je organ spolnog sustava, ovalnog oblika, smješten u dorzalnem ili gornjem dijelu zatka. Unutrašnji promjer spermateke iznosi oko 1 mm (Tucak i sur., 1999.). Stjenka je s vanjske strane omeđena dušićnom ovojnicom koja omogućava spermijima koji se nalaze unutar spermateke normalne uvijete za život. Unutrašnjost spermateke građena je od jednoslojnog epitela, koji je u fazi kukuljice cilindričan, dok je kasnije kod parenih i ne parenih matice kubičan. Zadaća ovog organa je zaprimanje i čuvanje spermija dobivenih od truta pri parenju (Camargo i Mello, 1970.).



Slika 4: Spermateka matice

(izvor: <https://www.pinterest.com/strawsinthewind/honey-bee-anatomy/>)

1.3. Uvod u istraživanu temu

Cijela poljoprivreda i sve njene grane danas imaju za cilj stjecanje profita radi održivosti proizvodnje te radi same novčane dobiti koja će omogućiti određene pogodnosti u životu osobe koja se bavi poljoprivredom. U pogledu proizvodnje animalnih proizvoda, bitno je održati prinose konstantnima ili ih ovisno o uzgojnim ciljevima povećavati. Radni vijek životinja u proizvodnji je ograničen, te je pri izlasku životinja iz proizvodnje, za održivu proizvodnju potrebno imati mlade životinje koje će ih nasljediti u proizvodnom ciklusu. To se postiže putem rasploda životinja i takav se oblik zamjene naziva: „Remont“. Postoje mnogi genetski i okolišni čimbenici koji utječu na rasplod životinja. Starost jedinke u rasplodu svakako je važan čimbenik koji može pozitivno ili negativno djelovati na dobivanje novih jedinki i tako utjecati na samu održivost i daljnju kvalitetu proizvodnje.

Kod uzgoja pčela bitna je jačina zajednice. Jača zajednica bolje će prezimiti, biti će otpornija na bolesti i nametnike te će davati veći prinos proizvoda na koji cilja proizvodnja. Matica je ključna jedinka koja utječe na snagu zajednice. Starost same matice utječe na njenu sposobnost da predvodi zajednicu i daje što jače i brojnije leglo kako bi se zajednica održavala. U distalnom kraju zatka matice smještena je spermateka, organ unutar kojeg se nalaze spermiji trutova. Broj spermija u spermateci matice utječe na brojnost legla, dok starost same matice utječe na broj spermija u njenoj spermateci. Ovo istraživanje proučava utjecaj starosti matice na broj spermija u spermateci i daje uvid u korelaciju između svih mjerenih parametara. Mjereni parametri su: starost matice, težina matice, promjer spermateke i broj spermija u spermateci. Vršena je disekcija 210 matica, a izolirana je 141 spermateka, na čijim je parametrima bazirano ovo istraživanje.

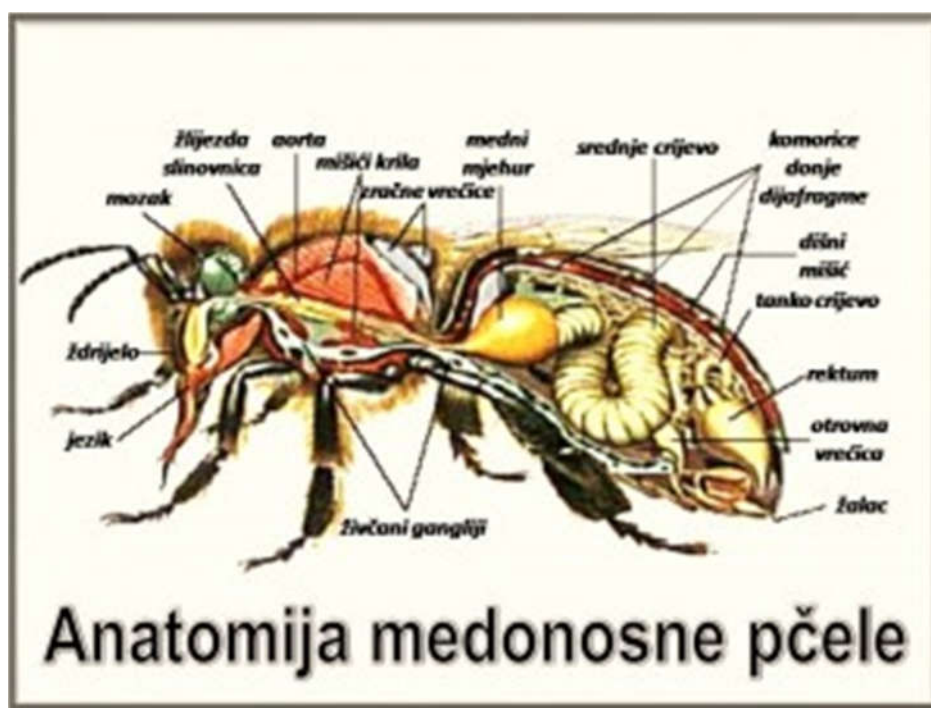
2. PREGLED LITERATURE

2.1. Anatomija spolnog sustava

Poznavanje anatomije pčela, posebno reproduktivnog sustava, je polazna točka za ovo istraživanje. Anatomija opisuje strukturne dijelove organizma, organe, koji životinji služe za održavanje njenog postojanja, te opisuje njihovu povezanost, povezanost organa u cjelinu, organizam. Tucak i suradnici (1999.) u udžbeniku: Pčelarstvo, opisuju anatomiju pčele. U anatomske građi pčela postoje dva osnovna sustava: vanjski i unutrašnji sustav.

Vanjski sustav obuhvaća kožni sustav i ekstremitete. Vanjska površina tijela pčele je pokrivena kožnim skeletom ili egzoskeletom koji ima ulogu obrane unutrašnjih organa i regulacije tjelesne temperature, te služi kao hvatište mišića i pojedinih organa. Egzoskelet je kolutičave ili segmetalne građe, a sastoji se od: vanjskog sloja ili kutikule, srednjeg sloja ili hipoderma i unutarnjeg sloja ili bazalne membrane. Ekstremiteti pčela su noge i krila. Pčele imaju tri para nogu koje služe za hodanje i slijetanje, čišćenje ticala i skupljanje cvjetnog praha. Noge se pružaju od prvog, drugog i trećeg kolutića prsa, a građene su od: kuka ili coxa, obrtača bedra ili trochantera, bedra ili femura, goljenice ili tibie i tarsusa ili stopala. Pčela ima dva para plosnatih i tankih krila, koja proizlaze iz mesotoraxa i metatoraxa i osnažena su tubularnim ojačanjima. Prednja krila su pravilnog trokutastog oblika, te su veća i snažnija od stražnjih krila koja su nepravilnog trokutastog oblika. Krila truta su duljine oko 11.5 mm, matice 9,5 mm, te radilice oko 9,2 mm. Unutrašnji sustav tijela kod pčela obuhvaća: dišni ili respiratorni sustav, krvožilni ili limfni sustav, žičani ili nervni sustav, spolni ili reproduktivni sustav, probavni ili digestivni sustav, žljezdani ili sekretorni sustav, te osjetilni sustav (Tucak i sur., 1999).

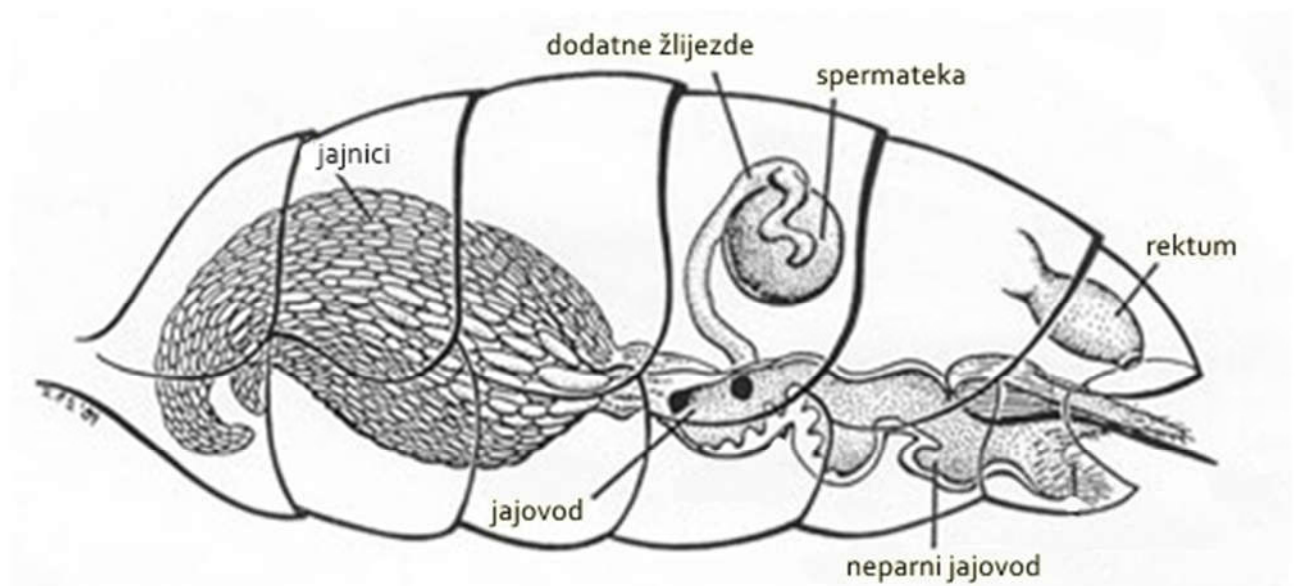
Grout i suradnici(1992) detaljnije opisuju pojedine sustave kod pčela. Reproductivni ili spolni sustav kod insekata uključuje vanjske ili eksterne i unutarnje ili interne organe. Kod pčela jedino trutovi imaju vanjski organ, penis koji izlazi iz zatka prilikom samog čina parenja. Ostali spolni organi kod svih članova pčelinjeg društva su unutarnji. Spolni organi trutova uz samu kopulacijsku cijev ili penis su: muda ili testisi, parni organi graholikog oblika u kojima se stvaraju muške spolne stanice, spermiji, zatim sjemenovod, vas deferens, zajednički kanali koji prolaze iz testisa, spolne, sluzave žlijezde, glandule mucose, koje prihvaćaju završni dio sjemenovoda, te neparni sjemenovod ili ductus ejaculatorius, koji izlazi iz glandula mucosa. Spolni organi pčela radilica nisu u punoj reproduktivnoj funkciji za razliku od spolnih organa kod matice. Spolni organi pčela radilica su: jajnici ili ovarii, jajovod ili oviduct koji je zakržljao u toku evolucije, zatim odvodni kanali ili ductus seminalis, koji je zadržao u evoluciji samo svoje fizičke naznake, te neparni jajovod ili vagina koja je slabo razvijena te se u vaginalno predvorje ne može izvršiti kopulacija sa trutom.



Slika 5: Anatomija medonosne pčele

(izvor: <http://draca.hr/pcele-2/anatomija-pcele/>)

U spolne organe matice ubrajamo: jajnike ili ovarie, jajovod ili oviduct, neparni jajovod, vaginu, spermateku ili receptaculum seminis, dodatne žlijezde, glandule apendiculares i odvodni kanal, ductus seminalis. Jajnici kod matice proizvode jajne stanice. Sami po sebi oni su parni organi kruškolikog oblika. Na jajnike se nadovezuju ovariole ili jajne cijevčice koje se spajaju u dva lateralna jajovoda, koji se udružuju u jedan zajednički jajovod ili oviduct. Jajovod se nastavlja u široki terminalni prostor, neparni jajovod ili vaginu koja se otvara na bazi žalca uz stijenku tijela. Matice i pčela radilica, obje su ženske jedinke pčelinjeg društva. Matice je za razliku od pčele radilice reproduktivno sposobna jedinka. Pčele radilice nemaju receptaculum seminis ili spermateku, te glandule apendiculares ili dodatne žlijezde. Spermateka ili receptaculum seminis je okrugli ženski spolni organ koji služi za primanje i skladištenje spermija. Nalazi se dorzalno od vagine te je spojena sa njom pomoću kratkog kanala. Distalno od kanala spermateke nalazi se par tubularnih spolnih žlijezdi, glandula apendiculares, čiji sekret služi kao hrana spermijima u spermateci (Grout i sur., 1992.).



Slika 6: Spolni sustav matice

(izvor: <http://www.glogster.com/whmshub/honey-bee-anatomy-by-anthony3/g-6jubs21f7v7gcp6auli51af>)

Sam spolni čin, parenje, odvija se u procesu koji nazivamo svadbeni let (*engl: nuptial flight*) koji vrše pčele i mravi. Mlade matice odlaze za lijepog vremena na mjesta na kojima se skupljaju trutovi (*Drone congregation areas*) te se pare s trutovima. Matica se prilikom svadbenog leta pari sa većim brojem trutova, te u prosjeku preleti 1 do 2 km kako bi stigla do “mjesta okupljanja trutova“, a svadbeni let traje u prosjeku 10 do 30 minuta (Delaney i sur., 2013.). Prilikom same kopulacije, penis truta ulazi u neparni jajovod matice, te radi kontrakcije mišića puca i ostaje u njemu. Trutovi nakon parenja ugibaju. Spermiji iz penisa pri kopulaciji prvo ulaze u jajovod matice gdje se jedno vrijeme zadržavaju. Nakon izbacivanja penisa iz neparnog jajovoda, matica kontrakcijom mišića potiskuje spermije iz jajovoda dalje u spermateku, gdje će biti pohranjeni. Woyke (1960) navodi kako tek 5% spermija se prebacuje iz jajovoda u spermateku, u zajednici, te da taj proces punjenja spermateke spermijima iz jajovoda traje više od 24 sata. Neki su autori istraživanja na temelju linija pomlatka procjenjivali da matica ulazi u 5 do 10 koplacija sa trutovima prilikom leta (Franck i sur.,2002.). Kada je jaje u jajniku zrelo, doljni dio folikula se otvara, folikul puca i jaje prolazi kroz jajovod u neparni jajovod. Folikul koji je pukao, stisne se i absorbira, a sljedeći folikul zauzima njegovo mjesto i dozrijeva novo jaje. Dolazak jaja iz jajovoda u neparni jajovod predstavlja zadnju fazu ovog ciklusa. Ovdje se događa dioba jezgre jaja, gdje jedna jezgra postaje završna, krajnja jezga dok se druga absorbira. U jezgri se nalaze kromosomi, točnije njih 32 kod ženskih jedinki pčela i 16 kod muških jedinki (Grout i sur., 1992.).



Slika 7: Svadbeni let

(izvor: <http://islamdenounceterrorism.com/en/Books/4193/the-miracle-of-the-honeybee/chapter/5024>)

2.2. Istraživanja utjecaja starosti matice pčela na broj spermija u spermateci

Postoje različiti podatci od različitih autora o broju trutova sa kojima se matica pari prilikom svadbenog leta. Neuman i suradnici (1999) navode da se matica pari sa do 24 truta u svadbenom letu, a Kraus i suradnici (2005) govore da je broj trutova od 10 do 28. Mortiz i suradnici (1996) pak navode da taj broj iznosi do 44, a Delaney i suradnici (2011) tvrde da je taj broj od 6 do 50. Roberts (1944) iznosi da matica može izvesti do 4 svadbena leta u svome životu. Boch i Jamieson (1960) su došli do zaključka kako veće matice daju značajno veće leglo od tjelesno manjih matice, dok Nelson i Gary (1983) ističu kako zajednice sa većom maticom daju veće prinose meda. Collins i Pettis (2013) iznose rad o povezanosti veličine matice i sadržaja spermateke te zaključuju kako teže matice imaju u prosjeku teže spermateke, sa većim promjerom i većim brojem spermija.

Svi do sad navedeni radovi su uglavnom iz drugih država. Na području Hrvatske također su rađeni slični radovi. Dražić i suradnici (2015) donose podatke o 211 spermateka od 232 matice. Promjer spermateke rastao je sa dobi matice, a dob matice nije značajno utjecala na broj spermija unutar spermateke. Neki autori su zaključili suprotno. Al-Lawati i suradnici (2009) su utvrdili da starije matice imaju manji broj spermija u spermateci, odnosno da broj spermija pada sa starenjem matice.

2.3. Mjerenje parametara u ovom istraživanju

Za kvalitetno obavljanje istraživačkog rada potrebno je uzeti dovoljan broj uzoraka. Za ovaj rad, uzorci su matice i spermateke. Matice je kao i ostale pčele na kojima se rade istraživanja potrebno prvo imobilizirati. Human i suradnici (2013) navode kako postoje mogućnosti kemijske i fizičke imobilizacije. U kemijsku imobilizaciju ubrajamo: korištenje ugljikovog dioksida, dietil etera, dušika i etil acetata, dok u fizičku imobilizaciju ubrajamo: hlađenje i smrzavanje.

Tablica 1: Primjeri metoda za imobilizaciju pčela ovisno o istraživanju

(izvor: Miscellaneous standard method for *Apis mellifera* research)

| Metoda | Opis metode | Istraživani dio tijela i svrha |
|----------------------|---|---|
| Toplinska | Zamrzivač, - 20°C | Razvoj jajnika radilica i istraživanje sadržaja rektuma i crijeva |
| | Zamrzivač, - 80°C | Abdomen radilica za analizu na infekciju Nosemom |
| | Zamrzivač, - 20°C | Analiza tjela pčela radilica na viruse |
| Mehanička | Evisceracija i dekapitacija | Spermateka, utroba, jajnici, glava, hemolimfa, razina virusa u evasceriranom tijelu |
| | Dekapitacija | Međustanično kretanje kalija u fotoreceptorima i glia stanicama kod trutova |
| | Dekapitacija i drobljenje prsnog koša | Izolacija spermateke kod matica |
| | Drobljenje prsnog koša | Sadržaj prsnog koša pčela radilica |
| | Drobljenje prsnog koša | Hypopharingealna žlijezda i razvoj jajnika kod pčela radilica |
| Mehanička i kemijska | Drobljenje tjela i zaranjanje u RNAlater® otopinu | Analiza tijela pčela radilica na viruse |
| Kemijska i toplinska | Polaganje na suhi led | Analiza kemijskih rezidua u tijelu pčele radilice |
| | Polaganje na suhi led | Kvanitativna analiza mikročestica polystirena u utrobi pčela radilica |
| | Uranjanje u tekući dušik | Genetska analiza odraslih pčela |
| Kemijska | Uranjanje u 95% etanol | Genetska analiza trutova |
| | Izlaganje kalijevom cijanidu | Zapremnina utrobe kod pčela radilica |

Weiser (1973.) navodi kako niske temperature mogu trenutno imobilizirati odraslu pčelu tako što smanjuju djelovanje neuronskog akcijskog potencijala. 85% pčela radilaca starih jedan dan ugibaju kada su izložene 3 minute na -20°C , dok kod starijih radilica nije uočeno ugibanje jedinki pri istom trajanju izlaganja toj temperaturi u zamrzivaču (Ebadi i sur., 1980). Human i suradnici (2013.) iznose protokol za imobiliziranje pčela zamrzavanjem u tri točke:

1. Uzimanje uzoraka pčela u plastični kavez
2. Stavljanje kaveza u zamrzivač na -20°C
3. Uzimanje kaveza sa imobiliziranom pčelom nakon 3 minute

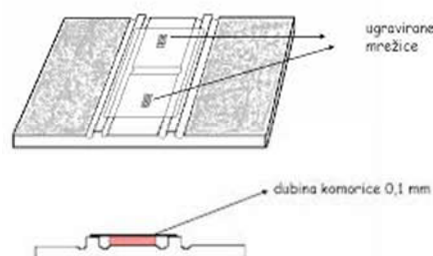
Mjerenje tjelesne mase kod pčela moguće je izvesti kako za jedinku tako i cijelu zajednicu. Mjerenje mase, osim za odrasle jedinke pčela, može se izvesti i za larve te za pojedine dijelove tijela, iznose Human i suradnici (2013). Oni također iznose i protokol za mjerenje tjelesne mase odraslih pčela vaganjem:

1. Izjednačiti balans vage sa posudom za mjerenje
2. Staviti pčelu u posudu za mjerenje unutar vage
3. Izvagati pčelu
4. Zapisati izmjerenu vrijednost

U radu o instrumentalnoj inseminaciji, Cobey i suradnici (2013) opisuju metodu disekcije matice i izolaciju spermateke. Matica je prvo zamrznuta u zamrzivaču na -20°C , 4 do 6 minuta, a zatim je izvagana te su joj izmjereni glava i prsa. Sama disekcija u njihovoj metodi podijeljena je u četiri koraka:

1. Eutanazija matice odstranjivanjem glave
2. Zarezivanje abdomena sa obje strane
3. Obuhvaćanje žalca sa pincetom i lagano pomicanje dok se ne otkriju jajnici
4. Lagano pomicati organe dok se ne otkrije spermateka te je zatim pažljivo odstraniti

Nakon što su osnovni parametri izmjereni, te nakon što je iz matice izolirana spermateka, potrebno je izbrojati spermije unutar spermateke. Neki autori (Cantwell, 1970., Human i sur., 2013., Paul, 1975.) navode kako je najbrža pouzdana metoda za brojanje spermija unutar spermateke, te za slična kvantitativna mjerenja, korištenje hemocitometra. Imade i suradnici (1993.) iznose kako je u točnosti podataka izmjerenih hemocitometrom moguće odstupanje 5%. Hemocitometar je staklena pločica se koristi za determinaciju određenih čestica koje se nalaze na istraživanom polju. On na sebi ugraviranu mrežu i komore za brojanje. Postoji nekoliko vrsta hemocitometara, a razlikuju se po veličini komore za brojanje koja ovisi o česticama koje brojimo. Svi hemocitometri posjeduju mrežu koja svojim ispreplitanjem tvori kvadrate unutar kojih brojimo čestice. Prije upotrebe hemocitometar i pokrovno stakla treba oprati steriliziranom destiliranom vodom kako bi se izbjegla mogućnost kontaminacije hemocitometra i pokrovnog stakla, a potom ih treba obrisati od vode posebnim papirom za čišćenje leća i objektiva kako se nebi oštetili. Potrebno je ranije prirediti odgovarajuću otopinu sastojaka kaja će se mikroskopirati. Otopinu koja se koristi, nanosi se na rubove hemocitometra te se hemocitometar pokriva pokrovnim staklom kako bi se napravio pritisak na mrežu hemocitometra. Nekoliko minuta pokrovno staklo treba stajati na otopini uzorka na hemocitometru kako bi se uzorak slegnuo u mrežu, te kako bi se bolje i točnije moglo pregledati istraživani uzorak. Hemocitometar se zatim mikroskopira pod odgovarajućim povećanjem. Treba paziti da se pokrovno staklo ne uništi objektivom mikroskopa. Brojimo čestice u odgovarajućim kvadratima. Mjere se četiri rubna kvadrata i centralni kvadrat na mreži hemocitometra. Potrebno je prebrojati barem 300 čestica kako bi se smanjila mogućnost grešaka pri brojanju, te se također treba držati određenih pravila prilikom brojanja. Broje se čestice koje su cijelim obujmom u kvadratu te one koje se nalaze na desnom i doljnjem rubu ili gornjem i lijevom rubu (Human i sur. 2013).



Slika 8: Hemocitometar

(izvor: <http://www.slideshare.net/AnaAnticevic/brojenje-eritrocital>)

3. MATERIJALI I METODE

Istraživanje utjecaja starosti matice pčela na broj spermija u spermateci, rađeno je u laboratoriju zavoda za lovstvo, ribarstvo i pčelarstvo na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku. S fakultetskog pčelinjaka, Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, te sa Obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva Marina Kovačića uzorkovano je ukupno 210 matice. Stavljene su u plastične kaveze i zatim zamrznute na -20°C u zamrzivaču. Matice su skupljane tijekom lipnja, srpnja i kolovoza 2015. godine. U istraživanju su korištene matice stare 0 i 1. godine. Matice stare 0 godina su mlade matice koje su tek oplodene i izvađene iz oplodnjaka. Matice stare 1. godinu su bile uzete iz košnica.



Slika 9: Disekcija matice u laboratoriju

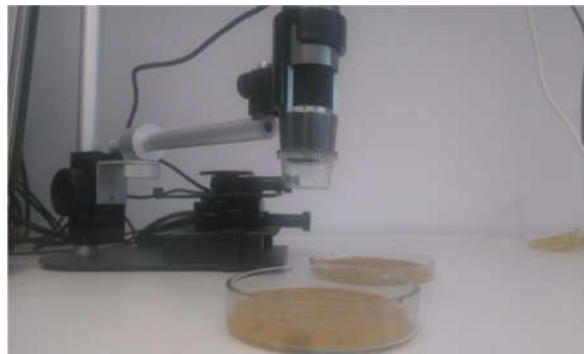
U laboratoriju je korišteno:

1. Vaga Kern Alj 250-4AM
2. Petrijeva zdjelica sa pčelinjim voskom
3. Entomološke igle
4. Laboratorijske škare
5. Skalpeli i pincete
6. Digitalna mikroskopska kamera Dino Lite 7013
7. Svjetlosni mikroskop
8. Ependorf tube

9. Hemocitometar sa odgovarajućim pokrovnim staklom



Slika 10: Vaga - Kern Alj 250-4AM



Slika 11: Dino Lite digitalna kamera

Protokol istraživanja:

1. Vaganje matice
2. Disekcija matice
3. Mjerenje promjera spermateke
4. Mjerenje broja spermija
5. Statistička obrada podataka

Uzorkovane matice prvo su vagane, te im je zapisana tjelesna masa. Nakon vagnja pristupilo se disekciji. Disekcija je obavljena na petrijevoj zdjelici ispunjenom voskom. Vosak je prethodno zagrijan do tekućeg agregatnog stanja i istočen u petrijevu zdjelicu. Istočeni vosak pušten je nekoliko minuta da se ohladi.



Slika 13: Zagrijavanje voska

Izvaganoj matici odstranjena su krila i noge, kako bi bilo lakše obaviti disekciju, te je zatim fiksirana entomološkim iglama za vosak u petrijevoj zdjelici. Korištene su dvije entomološke igle. Jedna igla je zabodena u prsište matice dok je druga igla zabodena u kraj zatka matice. Potom su lateralno na zatku napravljeni rezovi, po jedan sa svake strane kako bi se zadak otvorio. Distalno na zatku smještena je spermateka omeđena jajovodom i ovariolama koje su razmaknute pincetom kako bi se došlo do spermateke, te kako bi je zatim bilo moguće izolirati. Spermateka je vrlo osjetljive građe te je bilo potrebno djelovati vrlo pažljivo kako je se nebi oštetilo i time onemogućilo daljnje mjerenje promjera spermateke i brojanje spermija. Neke spermateke su prilikom disekcije uništene, a nekim je spermatekama oštećena samo membrana, te je radi toga bilo nemoguće odrediti promjer spermateke, no broj spermija se mogao utvrditi.

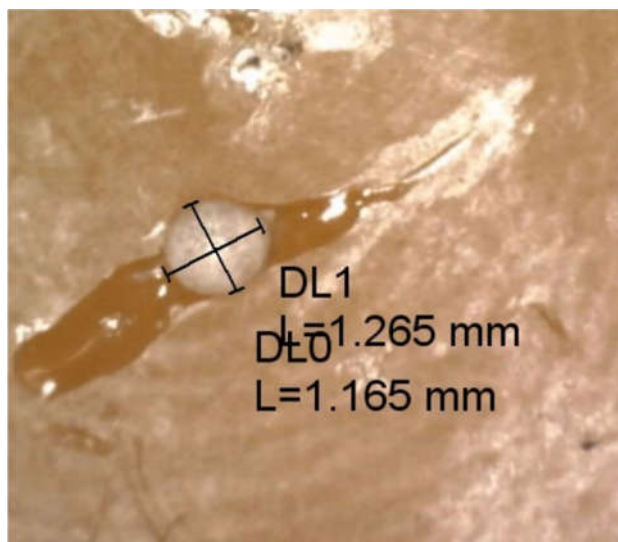


Slika 14: Matica fiksirana entomološkom iglom u petrijevoj zdjelici, spremna za disekciju

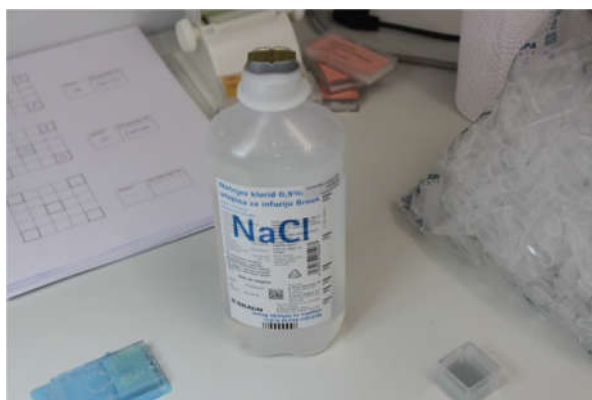


Slika 15: Matica nakon disekcije

Izolirana spermateka je prebačena pored matice na petrijevu zdjelicu te joj je pomoću Dino Lite digitalne kamere izmjeren promjer na dvije dužine. Spermateka je organ ovalnog oblika, omeđen dušićnom ovojnicom. Radi ovalnog oblika spermateke, za točnu procjenu promjera bilo je nužno uzeti dvije dužine te zatim izračunati srednju vrijednost tih dviju dužina, to jest promjer spermateke.



Slika 16: Mjerenje promjera spermateke pomoću Dino Lite digitalne kamere



Slika 17: Fiziološka otopina i ependorf tube

Izolirana spermateka je nakon mjerenja promjera stavljena u ependorf tubu u koju je prethodno pipetom unesen 1 ml fiziološke otopine. Spermateka je u ependorf tubi rastvorena kako bi svi spermiji izašli u otopinu. Otopinu smo zatim nanijeli na hemocitometar, točnije na njegovu mrežu sa komorama za brojanje, te je pokrivena pokrovnim staklom i zatim mikroskopirana.

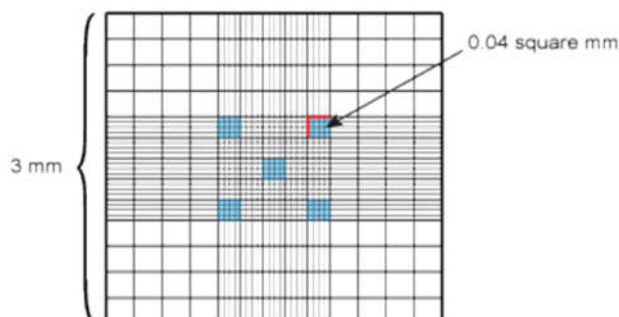


Slika 18: Dva hemocitometra korištena u ovom istraživanju

Brojanje čestica uz pomoć hemocitometra je najbrža, a pritom i pouzdana metoda (Human i sur.: 2013). Postoji mogućnost odstupanja 5 % za dobivene rezultate (Imade i sur.: 1993). Za brojanje čestica na mreži hemocitometra pod mikroskopom potrebno je pridržavati se određenih pravila koja olakšavaju brojanje radi velikog broja kvadrata u mreži i time onemogućuju da se jedna čestica broji nekoliko puta. Čestice često prelaze iz jednog kvadrata u drugi te je bitno znati koje se rubne čestice broje unutar kojeg kvadrata. Brojali smo spermije u četiri rubna kvadrata, te u centralnom kvadratu na mreži hemocitometra. Za izračun broja spermija korištena je formula:

$$\text{broj spermija} = \frac{\text{ukupan broj izbrojeni spermija}}{\text{broj izbrojeni mali kvadrata}} \times 4 \times 10^6$$

Broj izbrojenih kvadrata iznosio je: $5 \times 16 = 80$



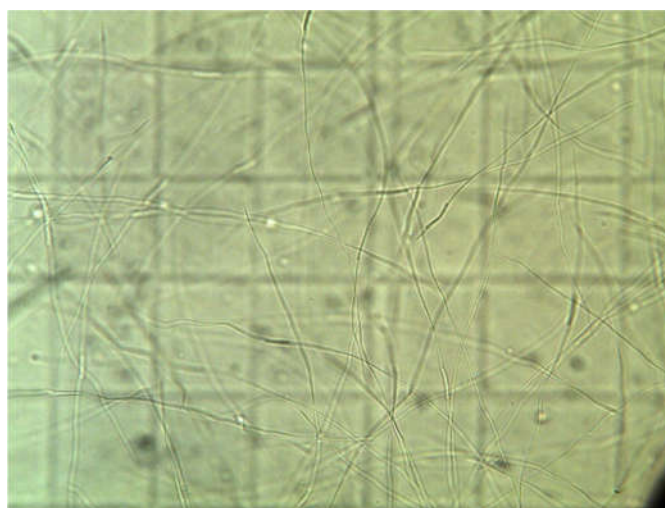
Slika 19: Kvadrati unutar mreže hemocitometra u kojima smo brojali spermije

(izvor: <http://microbebrewer.blogspot.hr/2014/01/yeast-cell-counting-and-viability.html>)

| | | | | |
|--|--|--|--|--|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

| | |
|---------|--------------------|
| Ukupno: | Broj spermija / ml |
| | |

Slika 20: Prikaz obrasca za upis izbrojanih spermija



Slika 21: Spermiji pod mikroskopom

Prikupljeni podatci u istraživanju:

1. Dob matice
2. Tjelesna masa matice
3. Promjer spermateke
4. Broj spermija unutar spermateke

Između dobivenih podataka gledana je međusobna povezanost, te je izračunat koeficijent korelacije, te značajnost koeficijenta korelacije. Statistička obrada podataka obavljena je pomoću programa Statistica 12.

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je vršeno na 210 matice, starosti 0 i 1. godine. Matice stare 0 godina su izlegnute 2015 godine. Matice stare 1. godinu su izlegnute 2014 godine.. Od ukupnog broja matice korištenih u istraživanju, uspješno je izolirana 141. spermateka. 3 spermateke su izolirane, ali zbog oštećenja prilikom izolacije spermateke nije postojala mogućnost mjerenja točnog promjera, no uspješno je izmjeren broj spermija.

Tablica : Dobiveni podatci za matice stare 0 godina

| Godina koje je matica izlegnuta | Tjelesna masa matice (mg) | Promjer spermateke (mm) | Broj spermija (u milionima) |
|--|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 2015 | 161,5 | 1,317 | 3,6 |
| 2015 | 154,7 | - | 3,7 |
| 2015 | 143,9 | 0,988 | 4,35 |
| 2015 | 185 | 1,249 | 3,75 |
| 2015 | 165,6 | 1,225 | 3 |
| 2015 | 170,2 | 1,247 | 1,95 |
| 2015 | 145,8 | 1,186 | 3,25 |
| 2015 | 155,8 | 1,074 | 1,45 |
| 2015 | 147,5 | 1,141 | 4,2 |
| 2015 | 133,8 | 1,118 | 2,25 |
| 2015 | 130 | 0,989 | 3,2 |
| 2015 | 170,4 | 1,079 | 6,65 |
| 2015 | 180,9 | 1,147 | 5,3 |
| 2015 | 175,9 | 1,162 | 4,75 |
| 2015 | 156 | 1,139 | 5,6 |
| 2015 | 156,1 | 1,124 | 5,6 |

| | | | |
|------|-------|-------|------|
| 2015 | 169,6 | 0,957 | 3,65 |
| 2015 | 137,3 | 1,178 | 4,3 |
| 2015 | 138 | 1,129 | 2,55 |
| 2015 | 167 | 1,005 | 4,9 |
| 2015 | 169,3 | 1,124 | 2,2 |
| 2015 | 122,1 | 1,059 | 4,55 |
| 2015 | 144,2 | 1,065 | 3,2 |
| 2015 | 125,6 | 1,036 | 4,05 |
| 2015 | 131,3 | 0,972 | 3,65 |
| 2015 | 167,6 | 1,156 | 4,5 |
| 2015 | 165 | 1,108 | 5,2 |
| 2015 | 129 | 1,095 | 4,95 |
| 2015 | 151 | 0,987 | 5,05 |
| 2015 | 122,1 | 1,007 | 4,3 |
| 2015 | 159 | 1,173 | 3,1 |
| 2015 | 152,8 | 1,123 | 5,05 |
| 2015 | 138,1 | 1,187 | 4,35 |
| 2015 | 137,6 | 1,199 | 4,75 |
| 2015 | 140,6 | 1,146 | 6,5 |
| 2015 | 141,6 | 1,032 | 3 |
| 2015 | 125 | 1,04 | 4,35 |
| 2015 | 117,1 | 0,939 | 3,55 |
| 2015 | 126,8 | 1,029 | 1,85 |
| 2015 | 161,1 | 1,134 | 4,2 |
| 2015 | 156 | 1,145 | 2,05 |
| 2015 | 163,4 | 0,98 | 4,75 |
| 2015 | 164,8 | 0,962 | 3,8 |
| 2015 | 166 | 1,039 | 3,9 |
| 2015 | 167,1 | 1,079 | 2,7 |
| 2015 | 130 | 1,056 | 2,85 |
| 2015 | 145 | 0,929 | 3,1 |
| 2015 | 168 | 1,029 | 4,7 |
| 2015 | 144,5 | 1,11 | 4,85 |

| | | | |
|------|-------|--------|------|
| 2015 | 147,8 | 1,146 | 5,5 |
| 2015 | 200 | 1,465 | 5,35 |
| 2015 | 129,4 | 1,145 | 5,2 |
| 2015 | 180,3 | 1,324 | 2 |
| 2015 | 167,2 | 1,122 | 5,5 |
| 2015 | 158,7 | 1,209 | 3,3 |
| 2015 | 156,1 | 1,149 | 4,4 |
| 2015 | 130,3 | 0,987 | 3,7 |
| 2015 | 130,7 | 1,053 | 3,6 |
| 2015 | 131,2 | 0,941 | 4,25 |
| 2015 | 155,5 | 1,276 | 4,1 |
| 2015 | 143,7 | 1,061 | 3,25 |
| 2015 | 121,2 | 0,995 | 4,45 |
| 2015 | 134,5 | 1,117 | 4,45 |
| 2015 | 150 | 1,005 | 4,65 |
| 2015 | 163,2 | 1,201 | 2,75 |
| 2015 | 138,8 | 1,127 | 3,95 |
| 2015 | 144 | 1,059 | 2,35 |
| 2015 | 150,4 | 1,042 | 4,5 |
| 2015 | 134,9 | 0,995 | 4,55 |
| 2015 | 103,1 | 0,875 | 2,75 |
| 2015 | 139 | 1,026 | 3,6 |
| 2015 | 113,1 | 1,175 | 5 |
| 2015 | 116,1 | 1,4975 | 6 |
| 2015 | 109 | 1,069 | 3 |
| 2015 | 154,9 | 1,065 | 8,45 |

Tablica : Dobiveni podatci za matice stare jednu godinu

| Godina koje je matica izlegnuta | Tjelesna masa matice (mg) | Promjer spermateke (mm) | Broj spermija (u milionima) |
|--|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 2014 | 188,3 | 1,149 | 3,25 |
| 2014 | 188,8 | 1,148 | 2,15 |
| 2014 | 234,7 | 1,15 | 2,55 |
| 2014 | 124,8 | 1,067 | 2,5 |
| 2014 | 158,1 | 1,089 | 2,4 |
| 2014 | 130 | 1,002 | 2,75 |
| 2014 | 155 | - | 2,1 |
| 2014 | 177 | 1,001 | 2,65 |
| 2014 | 183,2 | 1,325 | 2,8 |
| 2014 | 211,3 | 1,145 | 3,85 |
| 2014 | 191,4 | 1,226 | 2,45 |
| 2014 | 190,1 | 1,151 | 2 |
| 2014 | 184,9 | 1,443 | 3,55 |
| 2014 | 196 | 1,215 | 3 |
| 2014 | 189,3 | 1,144 | 2,05 |
| 2014 | 150,5 | 1,008 | 0,6 |
| 2014 | - | 0,982 | 2 |
| 2014 | 192,9 | 0,996 | 2,4 |
| 2014 | 128,5 | 0,981 | 1,7 |
| 2014 | 154,8 | 1,165 | 4,15 |
| 2014 | 131,4 | 0,962 | 4,25 |
| 2014 | 182,4 | 1,097 | 3,5 |
| 2014 | 177,5 | 1,108 | 2,85 |
| 2014 | 162,5 | 1,048 | 3,2 |
| 2014 | 182 | 1,116 | 2,65 |
| 2014 | 199,8 | 1,223 | 2,95 |

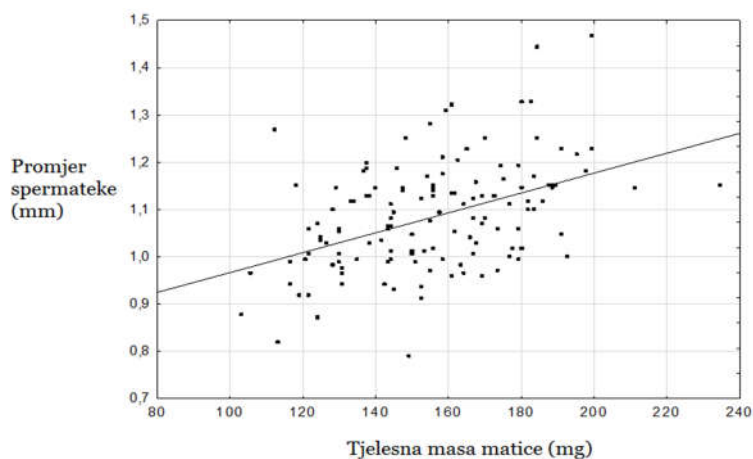
| | | | |
|------|-------|-------|------|
| 2014 | 117 | 0,985 | 2,2 |
| 2014 | 184 | 1,166 | 3,35 |
| 2014 | 144,2 | 1,008 | 1,9 |
| 2014 | 179,4 | 1,188 | 4,15 |
| 2014 | 159,1 | 0,993 | 3,85 |
| 2014 | 113,9 | 0,817 | 0,85 |
| 2014 | 173,5 | 1,054 | 2,05 |
| 2014 | 119,3 | 0,916 | 2,2 |
| 2014 | 180,2 | 1,013 | 1,8 |
| 2014 | 153 | 0,933 | 2,25 |
| 2014 | 177,7 | 1,013 | 2,55 |
| 2014 | 191,3 | 1,045 | 2 |
| 2014 | 169,3 | 1,069 | 5,05 |
| 2014 | 179,3 | 0,993 | 3 |
| 2014 | 122,3 | 0,914 | 1,55 |
| 2014 | 143 | 0,939 | 2,35 |
| 2014 | 186,4 | 1,116 | 2,85 |
| 2014 | 179,6 | 1,058 | 2,95 |
| 2014 | 172,8 | 1,127 | 2,35 |
| 2014 | 149,6 | 0,786 | 0,9 |
| 2014 | 144,8 | 1,079 | 2 |
| 2014 | 155,5 | 0,97 | 4,2 |
| 2014 | 174,2 | 0,967 | 1,7 |
| 2014 | 145,6 | 1,089 | 1,95 |
| 2014 | 159,6 | 1,307 | 1,1 |
| 2014 | 161,6 | 0,957 | 4,45 |
| 2014 | 105,6 | 0,961 | 1,35 |
| 2014 | 148,5 | 1,249 | 2,95 |
| 2014 | 166,9 | 1,121 | 4,35 |
| 2014 | 144,4 | 0,99 | 1,65 |
| 2014 | 153,2 | 0,91 | 3 |
| 2014 | 124,5 | 0,872 | 2,4 |
| 2014 | 198,2 | 1,177 | 3,6 |

| | | | |
|------|-------|-------|------|
| 2014 | 156,6 | 1,017 | 2,7 |
| 2014 | 175,1 | 1,189 | 2,25 |
| 2014 | 153,6 | 1,01 | 3,4 |
| 2014 | 183,7 | 1,097 | 3,1 |
| 2014 | 113 | 1,267 | 2,3 |
| 2014 | 162,3 | 1,133 | 2,8 |
| 2014 | 118,6 | 1,149 | 2,6 |

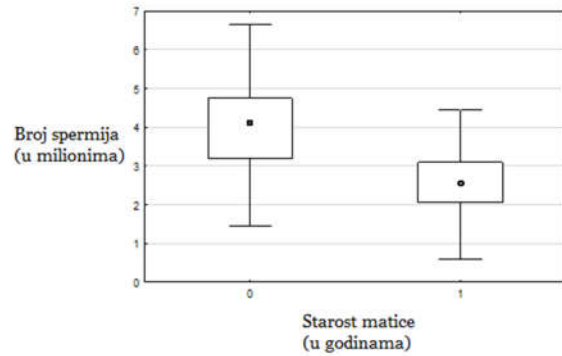
Tablica : Prosječne vrijednosti dobivenih podataka po godinama starosti matice

| Starost matica (u godinama) | Broj matica | Tjelesna masa matica (mg) | Promjer spermateka (mm) | Broj spermija (u milionima) |
|--------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 0 | 75 | 149,10 | 1,09 | 3,96 |
| 1 | 66 | 163,16 | 1,07 | 2,64 |

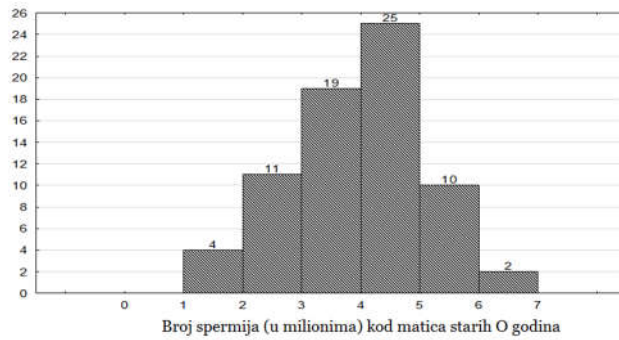
Iz dobivenih podataka vidljivo je da je sa starošću matica rasla njihova tjelesna masa, dok su promjer spermateke i broj spermija padali sa starošću matice, te je utvrđena pozitivna korelacija i signifikantna razlika između navedenih svojstava. Utvrđena je značajna korelacija između promjera izolirane spermateke i tjelesne mase matice. Promjer spermateke je u prosijeku veći što je veća tjelesna masa matice.



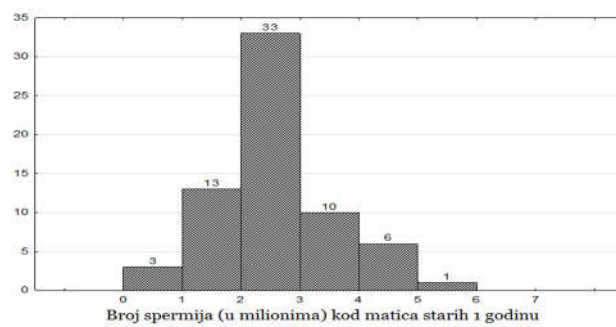
Grafikon 1: Korelacija između promjera spermateke i težine matice



Grafikon 2: Odnos broja spermija i starosti matice



Grafikon 3: Broj spermija kod matice starih 0 godina



Grafikon 4: broj spermija kod matice starih 1 godinu

Tek oplođene matice, stare 0 godina imale su veći broj spermija u spermateci. Sa starošću matice padao je broj spermija. Matice stare 0 godina imale su u prosjeku veći broj spermija od matice starih jednu godinu.

5. RASPRAVA

Istraživanje utjecaja starosti matice na broj spermija u spermateci svojim rezultatima daje mogućnost pretpostavke same proizvodnje u budućnosti. Primjećuje se kako matice stare 0 godina uglavnom imaju između 3 i 5 miliona spermija u spermateci dok matice stare jednu godinu imaju između jedan i tri miliona spermija te bi to značilo kako sa starošću matice broj spermija u spermateci pada. Al Lawati i suradnici (2009) navode kako postoji značajna razlika u broju spermija kod tek sparenih matica i matica koje su stare jednu godinu ($P < 0,0001$). Također navode kako nije utvrđena značajna razlika kod broja spermija u spermateci između matica starih jednu i dvije godine. Szabo i Heikel (1987) vrše istraživanje na maticama koje su uzgajali od 1982. do 1985. godine. Promatrali su broj spermija u spermatekama 87 matica starih 0, 1, 2 i 3 godine. Tek oplodene matice imale su $9,77 \pm 0,79$ miliona spermija, matice stare jednu godinu imale su $7,63 \pm 0,85$ miliona spermija, matice stare dvije godine imale su $5,57 \pm 0,64$ miliona spermija i matice stare tri godine imale su u prosjeku $2,08 \pm 0,62$ miliona spermija. Utvrđeno je kako je broj spermija u spermateci padao sa staršću matice.

Lodesani i suradnici (2004) na 12 matica podijeljenih u tri grupe po starosti (2 mjeseca, 12 mjeseci i 24 mjeseca) vršili su umjetnu oplodnju s 8 μ l sjemena. Matice stare 2 mjeseca imale su $5,1 \pm 0,9$ miliona spermija, matice stare 12 mjeseci imale su $4 \pm 1,1$ milion spermija i matice stare 24 mjeseca imale su $2,6 \pm 0,9$ miliona spermija, te su utvrdili kako broj spermija sa starenjem matice značajno pada. Matice stare 24 mjeseca imale su značajno manji broj spermija u spermateci od matica starih 2 mjeseca ($P < 0,05$). Hatjina i suradnici (2014) iznose rezultate istraživanja broja spermija u spermatekama vršenog na 46 prirodno parenih matica i na 42 matice koje su umjetno oplodene. Prosječni broj spermija kod prirodno sparenih matica iznosio je $2,78 \pm 0,17$ miliona spermija. Najmanji broj spermija kod prirodno sparenih matica iznosio je 0,7 miliona dok je najveći broj iznosio 6 miliona spermija. Prosječni broj spermija kod umjetno oplodjenih matica iznosio je $1,91 \pm 0,16$ miliona. Najmanji broj spermija kod ove grupe matica iznosio je 0,2 miliona dok je najveći broj spermija iznosio 4,5 miliona.

Harbo (1979) navodi kako je visoka reproduktivna proizvodnja teret za maticu. O tome govori i činjenica kako u vrhuncu sezone matica liježe do 2000 jaja, a do 12 spermija ulazi u jedno jaje. U toj činjenici autor daje razlog padu broja spermija u spermateci sa starošću matice. U komercijalnoj proizvodnji zato su bitni starost matice i broj spermija u spermateci.

Drugi autori radova na ovu temu iznose slične podatke kad se govori o utjecaju starosti matice na broj spermija u spermateci i tu se radi o padu broja spermija u spermateci sa starošću matice. Postoje i različiti podatci. Dražić i suradnici (2015) iznose kako dob matice nije značajno utjecala na broj spermija u spermateci te da je matica stara dvije godine imala veći broj spermija u spermateci od matice stare jednu godinu, no mlade tek sparene matice u prosijeku su ipak imale najveći broj spermija u spermateci. Treba istaknuti kako su oni također radili istraživanje na Kranjskoj pčeli i to otklanja mogućnost da se ovdje radi o različitostima kod određenih pasmina, kao što treba istaknuti da su radili istraživanje na 211 spermateka što donekle otklanja mogućnost većeg odstupanja.

Od velike važnosti je i utjecaj okolišnih čimbenika na promatrane parametre. Collins i Pettis (2012) u svome znanstvenom radu govore o utjecaju akaricida, regulatora razvoja grinja na tjelesnu masu matice, veličinu spermateke i broj spermija u spermateci. Matice su podijelili u dvije grupe. U jednoj grupi su bile matice koje su uzgajane bez dodavanja akaricida, dok su u drugoj grupi nalazile matice koje su bile izložene akaricidu. Matice veće tjelesne mase, uzgajane bez djelovanja akaricida, imale su veće spermateke i veći broj spermija, dok kod matica uzgajanih pod djelovanjem akaricida nije postajala pozitivna korelacija između navedenih svojstava.

6. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju korištene su matice starosti 0 i 1. godine. Uspješno je izolirana 141 spermateka od čega ja za 138 spermateka izmjeren promjer, te je izbrojan broj spermija u svim spermatekama. Tek sparene mlade matice imale su najveći promjer spermateke i najveći broj spermija. Na temelju dobivenih podataka možemo zaključiti postojanje pozitivne korelacije i značajne razlike između starosti matice i broja spermija u njoj spermateci. Sa starenjem matice padao je broj spermija te se smanjivao promjer spermateke. Matice s većom tjelesnom masom imale su u prosjeku veći promjer spermateke i veći broj spermija.

Matica je najvažnija jedinka u pčelinjoj zajednici. O matici ovisi sveukupna budućnost zajednice i njena produktivnost. Mlađe matice su reproduktivno jače, što ih čini pogodnijima za uzgoj. Sa starošću matice pada njena reproduktivna sposobnost. Postoje radovi koji se u svojim rezultatima ne podudaraju s ovim radom i zato je potrebno dalje istraživati navedenu problematiku kako bi se točno utvrdile korelacije između pojedinih mjerenja te na taj način bolje pridonijelo samoj proizvodnji.

7. POPIS LITERATURE

1. Al-Lawati, H., Kamp, G., Bienefeld, K. (2009.): Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee queens. *Journal of Insect Physiology*, 55 (2), 116–21.
2. Boch, R., Jamieson, C.A. (1960.): Relation of body weight to fecundity of the queen. *Can. Entomol.* 92, 700-701.
3. Camargo, J.M.F., Mello, M.L. (1970.): Anatomy and histology of genital tract, spermatheca, spermathecal duct and glands of *Apis mellifera*. *Apidologie*, Paris, V.1, P. 351-373.
4. Cantwell, G.E. (1970.): Standard methods for counting nosema spores. *American Bee Journal* 110 (6), 222-223.
5. Cobey, S.W., Tarpy, D.R., Woyke, J. (2013.): Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research.* *Journal of Apicultural Research*, 52(4).
6. Collins, A. M., Pettis, J. S. (2012.): Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. *Apidologie*, 44 (3), 351–356.
7. Dražić, M. M., Filipi, J., Caba, K., Pobran, L., Nikšić, M., Prđun, S., Bubalo, D., Kezić, N. (2015.): Broj spermija u maticama *Apis mellifera carnica* iz hrvatskog uzgojnog programa. *Proceedings 50th Croatian and 10th International Symposium of Agriculture, Opatija*, 394-398.
8. Delaney, D. A., Keller, J. J., Caren, J. R., Tarpy, D. R. (2011.): The physical, insemination and reproductive quality of honeybee queens (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 42, 1–13.
9. Ebadi, R., Gary, N.E., Lorenzen, K. (1980.): Effects of carbon dioxide and low temperature narcosis on honey bees, *Apis mellifera*. *Environmental Entomology*, 9 (1) 144-147.
10. Franck, P., Solignac M., Vautrin D., Corneuet J.M., Koeniger, G., Koneiger, N. (2002): Sperm competition and last- male precedence in the honey bee. *Animal Behaviour*, 39, 444-449.

11. Grout R.A. (1992.) *The hive and the Honey Bee*. Revised Edn., Dadant and Sons, U.S.A..
12. Hatjina F., Bieńkowska M., Charistos L., Chlebo R., Costa C., Dražić M., Filipi J., Gregorc A., Ivanova E. N., Kezić N., Kopernicky J., Kryger P., Lodesami M., Lokar V., Mladenovic M., Panasiuk B., Petrov P. P., Rašić S., Sker, M. I. S., Vejsnæs F. and Wilde, J. (2014.): A review of methods use din some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical chararcters and the preformance of their colonies. *Journal of Apicultural Research*, 53 (3), 337-363.
13. Harbo, J. R. (1979.): The rate of depletion of spermatozoa in the queen honeybee spermatheca. *Journal of Apicultural Research* 18 (3), 204-207.
14. Human, H. Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J. D., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F-L., Jaffe, R., Bruun Jensen, A., Kohler, A., Magyar, J. P., Ozkyrym, A., Pirk, C., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpy, D. R., van der Steen, J., Vaudo, A., Vejsnaes, F., Wilde, J., Williams, G. R., Zheng, H-Q. (2013.): Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52 (4), 1–56.
15. Imade, G.E., Towobola, O.A., Sagay, A.S., Otubu, A.M. (1993.): Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler and Horwells counting chambers. *Archives of Andrology*, 31, 17-22.
16. Kraus, F. B., Neumann, P., Moritz, R. F. A. (2005.): Genetic variance of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*, 52 (1), 1–5
17. Lodesani, M., Balduzzi, D., Galli, A. (2004.) : A study on spermatozoa viability over time in honey bee (*Apis mellifera ligustica*) queen spermathecae. *Journal of Apicultural Research*, 43 (1), 27–28.
18. Mortiz, R.F.A., Kryger, F., Allsopp, M.H. (1996.): Competition for royalty in bees. *Nature* 384, 31.
19. Nelson, D.L., Gary, N.E. (1983.): Honey productivity of honey bee colonies in relation to body weight, attractiveness and fecundity of the queen. *Journal of Apicultural Research*, 22(4): 209-213.
20. Neumann, P., Moritz, R. F. A., Praagh, J. P. Van. (1999.) : Queen mating frequency in different types of honey bee mating apiaries. *Journal of Apicultural Research*, 38 (1-2), 11–18.
21. Paul, J. (1975.): *Cell and tissue culture*. Churchill Livingstone, London, UK, 102 p.p.

22. Roberts, W.C. (1994.): Multiple mating of queen bees proved by progeny and flight tests, *Gleanings in Bee Culture*, 72, 225-260.
23. Szabo, T.I., Heikel, D.T. (1987.): Numbers of spermatozoa in spermathecae of queens aged 0 to 3 years reared in Beaverlodge, Alberta. *Journal of Apicultural Research*, 26: 79-82.
24. Tucak, Z., Bačić, T., Horvat, S., Puškadija, Z. (2005.): *Pčelarstvo*. Poljoprivredni fakultet Osijek, Osijek.
25. Weiser, W. (1973.): Effect of temperature on ectothermic organisms. In W Weiser (Ed). *Temperature relation on ectotherms. A speculative review*. Springer Verlag, Berlin, Germany, 1-23.
26. Woyke, J (1960.): Natural and artificial insemination of queen honey bees. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 4(3/4): 183-275.

8. SAŽETAK

Matica je glavna jedinka u zajednici i ujedno jedina ženska reproduktivno sposobna jedinka. Dobivanje što brojnijeg legla čimbenik je koji će odlučivati o budućnosti i snazi zajednice. Istraživanje povezanosti starosti matice i broja spermija u njoj spermateci pomaže utvrđivanju reproduktivne sposobnosti matice u određenoj dobi i daje pretpostavku o daljnjoj proizvodnji i snazi zajednice.

Istraživanje je vršeno na 210 matice, a uspješno je izolirana 141 spermateka, od kojih je za 138 izračunat promjer. Korištene su matice stare 0 i 1. godine, to jest matice izlegnute 2015. i 2014. godine. Između starosti matice i broja spermija u spermateci utvrđena je pozitivna korelacija i značajna razlika. Broj spermija izmjerenih u spermatekama matice starih 0 godina bio je u prosjeku 3,96 miliona, dok je za matice stare 1 godinu on iznosio 2,64 miliona. Dobiveni rezultati ukazuju na smanjenje broja spermija u spermateci sa starošću matice i povećanje tjelesne mase matice sa starošću.

9. SUMMARY

Queen is the only reproductively capable female and most important individual in honey bee colony. Strength and future of colony depends on brood production. Finding correlation between age of the queen and number of spermatozoa in the spermatheca helps to determine reproductive capability of queen in certain age which will help to assume further production and strength of colony.

Research was conducted on 210 queen bees, 141 spermatheca was isolated successfully, and for 138 spermatheca was calculated diameter. In this research 0 (queens laid in 2015) and 1. (queens laid in 2014) year old queens was used for dissection. Positive correlation and significant difference was found between the age of queen and number of spermatozoa in spermatheca. Number of spermatozoa in spermatheca of 0 year old queens was in average 3,96 million and for 1 year old queens was 2,64 million. These results indicate decreasing number of spermatozoa in spermatheca with age of the queen and increasing of body weight with age.

10. POPIS TABLICA

Tablica 1: Primjeri metoda za imobilizaciju pčela ovisno o istraživanju

(izvor: Human i sur. (2013.): Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. Journal of Apicultural Research, 52 (4), 1–56.)

Tablica 2: Dobiveni podatci za matice stare 0 godina

Tablica 3: Dobiveni podatci za matice stare jednu godinu

Tablica 4: Dobiveni podatci za matice stare 2 godine

Tablica 5: Dobiveni podatci za matice stare 3 godine

Tablica 6: Prosječne vrijednosti dobivenih podataka po godinama starosti matice

11. POPIS SLIKA

Slika 1: Životni ciklus pčele

(izvor: <http://blog.dnevnik.hr/apikultura/2013/02/1631508163/zivotni-ciklus-pcele-medarice.html>)

Slika 2: Članovi pčelinjeg društva (radilica, trut i matica)

(izvor: http://barnsleybeekeepers.org.uk/bee_sexes.html)

Slika 3: *Apis mellifera carnica*, matica i radilice

(izvor: <http://apis-mellifera-carnica.eu/gallery/index.php/Authentic-Apis-mellifera-carnica>)

Slika 4: Spermateka matice

(izvor: <https://www.pinterest.com/strawsinthewind/honey-bee-anatomy/>)

Slika 5: Anatomija medonosne pčele

(izvor: <http://draca.hr/pcele-2/anatomija-pcele/>)

Slika 6: Spolni sustav matice

(izvor: <http://www.glogster.com/whmshub/honey-bee-anatomy-by-anthony3/g-6jubs21f7v7gcp6auli51af>)

Slika 7: Svadbeni let

(izvor: <http://islamdenouncesterrorism.com/en/Books/4193/the-miracle-of-the-honeybee/chapter/5024>)

Slika 8: Hemocitometar

(izvor: <http://www.slideshare.net/AnaAnticevic/brojenje-eritrocita1>)

Slika 9: Disekcija matice u laboratoriju

Slika 10: Vaga - Kern Alj 250-4AM

Slika 11: Dino Lite digitalna kamera

Slika 12: Zagrijavanje voska

Slika 13: Matica fiksirana entomološkom iglom u petrijevoj zdjelici, spremna za disekciju

Slika 14: Matica nakon disekcije

Slika 15: Mjerenje promjera spermateke pomoću Dino Lite digitalne kamere

Slika 16: Dva hemocitometra korištena u ovom istraživanju

Slika 17: Fiziološka otopina i ependorf tube

Slika 18: Dva hemocitometra korištena u ovom istraživanju

Slika 19: Kvadrati unutar mreže hemocitometra u kojima smo brojali spermije

(izvor: <http://microbebrewer.blogspot.hr/2014/01/yeast-cell-counting-and-viability.html>)

Slika 20: Prikaz obrasca za upis izbrojanih spermija

Slika 21: Spermiji pod mikroskopom

12. POPIS GRAFIKONA

Grafikon 1: Korelacija između promjera spermateke i težine matice

Grafikon 2: Odnos broja spermija i starosti matice

Grafikon 3: Broj spermija kod matica starih 0 godina

Grafikon 4: Broj spermija kod matica starih 1 godinu

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Diplomski rad

UTJECAJ STAROSTI MATICA PČELA (*Apis mellifera*) NA BROJ SPERMIJA U SPERMATECI

Ivor Šurlan Spitzmuller

Sažetak: Matica je glavna jedinka u zajednici i ujedno jedina ženska reproduktivno sposobna jedinka. Dobivanje što brojnijeg legla čimbenik je koji će odlučivati o budućnosti i snazi zajednice. Istraživanje povezanosti starosti matice i broja spermija u njoj spermateci pomaže utvrđivanju reproduktivne sposobnosti matice u određenoj dobi i daje pretpostavku o daljnjoj proizvodnji i snazi zajednice.

Istraživanje je vršeno na 210 matice, a uspješno je izolirana 141 spermateka, od kojih je za 138 izračunat promjer. Korištene su matice stare 0 i 1. godine, to jest matice izlegnute 2015. i 2014. godine. Između starosti matice i broja spermija u spermateci utvrđena je pozitivna korelacija i značajna razlika. Broj spermija izmjerenih u spermatekama matice starih 0 godina bio je u prosjeku 3,96 miliona, dok je za matice stare 1 godinu on iznosio 2,64 miliona. Dobiveni rezultati ukazuju na smanjenje broja spermija u spermateci sa starošću matice i povećanje tjelesne mase matice sa starošću.

Ključne riječi: matica, starost, spermiji, spermateka, proizvodnja.

THE EFFECT OF AGE ON NUMBER OF SPERMATOZOA IN SPERMATHECA OF QUEEN HONEY BEES (*Apis mellifera*)

Summary: Queen is the only reproductively capable female and most important individual in honey bee colony. Strength and future of colony depends on brood production. Finding correlation between age of the queen and number of spermatozoa in the spermatheca helps to determine reproductive capability of queen in certain age which will help to assume further production and strength of colony.

Research was conducted on 210 queen bees, 141 spermatheca was isolated successfully, and for 138 spermatheca was calculated diameter. In this research 0 (queens laid in 2015) and 1. (queens laid in 2014) year old queens was used for dissection. Positive correlation and significant difference was found between the age of queen and number of spermatozoa in spermatheca. Number of spermatozoa in spermatheca of 0 year old queens was in average 3,96 million and for 1 year old queens was 2,64 million. These results indicate decreasing number of spermatozoa in spermatheca with age of the queen and increasing of body weight with age.

Keywords: queen, age, spermatozoa, spermatheca, production.

Datum obrane: