

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Slobodan G. Dolašević

UTICAJ ISHRANE NA KVALITET
PRIRODNO I VEŠTAČKI DOBIJENIH
PČELINJIH MATICA UZ PRAĆENJE
STEPENA EKSPRESIJE GENA ZA
VITELOGENIN TOKOM RAZVOJNIH
STADIJUMA

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Slobodan G. Dolašević

THE INFLUENCE OF DIET ON THE
QUALITY OF NATURALLY AND
ARTIFICIALLY OBTAINED QUEEN BEES,
AND VITELLOGENIN GENE
EXPRESSION DURING THEIR
DEVELOPMENT

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Komisija za ocenu i odbranu:

Mentori:

dr Mića Mladenović, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Jevrosima Stevanović, vanredni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

dr Nenad Đorđević, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Zoran Stanimirović, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

dr Goran Mirjanić, docent
Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Banja Luci

Datum odbrane doktorske disertacije _____

Zahvalnica

Da, došao je taj trenutak. Ili nije. Možda opet sanjam, ali i ako sanjam, nema veze. Vidim samo nepreglednu belinu papira i jednu tanku crtu, ali ni ona više nije prava kao nekada. Malo je nakrivljena, pohabana i suviše umorna. Ah, da - to je olovka. Uzeću je. Počecu da pišem, pa ako se trgnem, pisaću opet. Iznova.

Na horizontu česte usamljenosti i zabrinutosti u vezi sa ovim radom, došao je trenutak moje zahvalnosti, ali pre svega, izvinjenja.

Na prvom mestu izvinjenje porodici, a pre svega našim kovrdžavim princezama. Dugujem im jedno veliko objašnjenje, zašto često nisam žmurio iako je na mene bio red, ali tek kada za to dođe vreme, i ukoliko im ovaj tekst padne pod ruke. Uglavnom, svaka ispisana reč, pasus, fusnota predstavlja ukradeni deo njihovog vremena.

Postojanje ovog rada zaliveno je velikom upornošću. Nema ničega više do istrajne upornosti. Uz, razume se, puno podrške.

Na prvom mestu, moja najveća podrška je koleginica iz brucoških dana, Marijana, koja se sada, spletom srećnih okolnosti, preziva Dolašević. Zahvaljujem se i svojoj baka-Desi na čestim pozivima sa istim pitanjem, kada ću kući. Naravno i moja šira porodica je uvek uz mene.

Takođe, punu podršku i razumevanje sam dobio i od poslovnog partnera Predraga Kneževića i kuma Gorana Vidića. Pri samom sprovođenju oglada od velike važnosti je bio i pčelar Nenad Maksić. Svoju zahvalnost na lektorisanju i korekturi dugujem svom ocu, Goranu, a za jezičke nedoumice filologu, Aleksandri Miloševski.

Zahvalio bih se svojim mentorima, profesoru Mići Mladenović i profesorki Jevrosimi Stevanović, na njihovom nemalom doprinosu u svemu ovome, kao i na ukazanim sugestijama.

Zahvaljujem se profesoru Zoranu Stanimiroviću na nesebičnom ustupanju, ne samo njegove savremene laboratorije, nego i na punoj dostupnosti njegovih, kako bi ih on nazvao "sokolova", među kojima je najzaslužniji "visokoletač" Uroš Glavinić. Hvala Uroše.

Zahvalio bih se i profesoru Nebojši Deletiću na statističkim analizama.

Zahvaljujem se *Eva Crane Trust* fondaciji na dodeljenoj novčanoj pomoći.

Zahvaljujem se firmi *Golden Bee doo* i svojim partnerima na ustupanju pčelinjih društava u svrhu sprovođenja oglada, kao i na razumevanju za moje često odsustvo s posla.

Posebno bih istakao zalaganje profesorke Jevrosime Stevanović.

Zahvaljujem se svim članovima komisije.

Ovaj rad posvećujem svima onima koji vole medonosnu pčelu bar jednim delom koliko je i ja sam volim.

APSTRAKT

Ispitivan je uticaj ishrane pčelinjih društava na kvalitet dobijenih matičnjaka i performanse dobijenih nesprenih i sprenih matica. Formirane su četiri grupe pčelinjih društava koje su bile pod različitim tretmanom ishrane, kao i peta rojidbena grupa. Za potrebe procene kvaliteta pčelinjih matica merena je telesna masa, broj ovariola, dijametar spermateke, težina ovarijuma, broj pčela i kompaktnost legla. Osim toga, praćena je ekspresija gena za vitelogenin pomoću qreal-time PCR tokom razvojnih stadijuma matica ispitivanih grupa. Rezultati su pokazali da postoji međugrupna statistički značajna razlika u pogledu dijametra spermateke, mase matica i broja jajnih cevčica, te da različit tip ishrane utiče na vrednosti pomenutih parametara. Sparene matice koje potiču iz grupe čija su društva dobijala med i polen imale su signifikantno veći broj jajnih cevčica u odnosu na sve ostale ispitivane grupe. Grupa prihranjivana šećernim sirupom pokazala je superiornost u poređenju sa drugim grupama u pogledu masa nesprenih matica, dok je kod sprenih matica grupa prihranjivana sa dodatkom meda i polena dala bolje rezultate u odnosu na rojidbenu grupu kao i grupu koja je imala zamenu za polen. Kada je u pitanju poreklo matica, rojidbene ili veštački dobijene matice, veštački dobijene matice (grupa sa dodatkom meda i polena) ispoljile su bolje rezultate u pogledu telesne mase sprenih matica, broja jajnih cevčica i prečnika spermateke. Analizom ispitivanih matičnjaka utvrđene su značajne razlike u veličini matičnjaka, dok razlike u širini matičnjaka i dijametru otvora matičnjaka nisu bile signifikantne među ispitivanim grupama. Između različitih stadijuma razvića utvrđene su statistički značajne razlike u stepenu ekspresije gena za vitelogenin, dok među ispitivanim grupama nije bilo statistički značajnih razlika.

Ključne reči: pčelinja matica, matičnjak, ishrana, reproduktivne karakteristike, vitelogenin

Naučna oblast: Zootehnika

Uža naučna oblast: Odgajivanje i reprodukcija domaćih i gajenih životinja

UDK broj: 638.121.13:577.218(043.3)

ABSTRACT

The effect of bee colonies' diet on queen cell quality and the performance of unmated and mated queens was studied. There were four groups of colonies fed on different diet, as well as the fifth swarming group. The assessment of the queen bees' quality was based on their body mass, ovariole numbers, spermathecal diameters, ovary mass, the number of bees in their colonies and the brood pattern. The vitellogenin gene expression in queen development stages was observed using qreal-time PCR. The results revealed statistically significant inter-group differences in the diameters of spermathecae, queen body mass and the numbers of ovarioles, which pointed to the effect of diet on those parameters. Mated queens from the group fed on honey and pollen had significantly larger numbers of ovarioles in comparison to the others. The group additionally fed on sugar syrup was superior to the others in the number of unmated queens, while in mated queens the group additionally fed on honey and pollen achieved better results than the swarming group and the group fed on pollen substitute. The comparison of queens of different origin, swarming vs. artificially produced, revealed that the latter (fed on honey and pollen) had better results of mated queen mass, ovariole numbers and spermathecal diameters. Analysis of the observed queen cells showed significant differences in queen cell height, while differences between groups were not significant for queen cell width and the opening diameter. The levels of vitellogenin gene expression differed significantly between various developmental stages, while the differences between the investigated diet groups were not significant.

Key words: bee queen, queen cell, nutrition, reproductive characteristics, vitellogenin

Scientific field: Zootechnics

Scientific subfield: Breeding and reproduction of domestic and reared animals

UDC number: 638.121.13:577.218(043.3)

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Pregled literature.....	3
2.1. Pčelinja matica.....	3
2.2. Morfološko-reproduktivne karakteristike kao mera kvaliteta pčelinje matice	4
2.2.1. Telesna masa matica.....	4
2.2.2. Jajnik, masa jajnika i broj jajnih cevčica.....	7
2.3. Uticaj ishrane na dobijanje matičnjaka	12
2.4. Ishrana društava, potreba za šećerima i proteinima	15
2.5. Ekspresija gena za vitelogenin (Vg)	19
3. Cilj rada	32
4. Materijal i metod rada.....	33
5. Rezultati i diskusija	49
5.1. Prijem matičnjaka	49
5.2. Kvalitet matičnjaka i mase nesparenih matica.....	51
5.3. Ispitivanja sparenih matica	53
5.4. Analiza vitelogenina	62
6. Zaključak	77
7. Literatura	79
8. Prilog doktorske disertacije	91

1. Uvod

Primenom mnogih agrotehničkih mera, pojačane industrijalizacije kao i svojim opštim aktivnostima čovek nesumnjivo utiče na živi svet oko sebe. Pčelarstvo je veoma osetljiva grana poljoprivrede, a s obzirom na njenu sveobuhvatnu značajnost, svako istraživanje može predstavljati bitan doprinos kako bi se ova grana učinila održivijom i stabilnijom. Saznanja u oblasti prirodnih nauka su pokretači istraživanja u oblastima primenjenih nauka inženjerstva i tehnologije. U savremenom pčelarstvu, prirodna okruženja i pašne prilike medonosne pčele bitno su narušene usled urbanizacije i intenziviranja poljoprivredne proizvodnje, te je prihrana pčelinjih društava tokom komercijalne proizvodnje matica postala njen neizostavni deo. Ideja rada nije proistekla kao „istraživanje radi istraživanja“ već da se načela nauke stave u službu prakse.

Sa dobijanjem zdravih i vitalnih pčelinjih matica, koje čine stub u održavanju i proizvodnji snažnih pčelinjih društava, može se predupređiti mnoštvo problema sa kojim se trenutno pčelarstvo susreće. Sve su učestaliji negativni uticaji na pčelinja društva među kojima su aerozagađenja, upotreba pesticida, rasprostranjenost monokultura kao i pojave bolesti koje utiču subletalno na održavanje jednog pčelinjeg društva. Prisustvom matice slabog kvaliteta, koja predstavlja glavni genetički osnov u održavanju pčelinjeg društva, uticaji navedenih problema bivaju dodatno pojačani.

Motiv rada je proizašao iz želje za dobijanjem određenih načela i principa u ispitivanju delovanja određene vrste prihrane u dobijanju kvalitetnijih budućih majki pčelinjih društava. I pored hiperprodukcije naučnih radova u oblasti pčelarstva retki su radovi sa snažnim aplikativnim motivima. U postojećim informacijama, jako je skromno postojanje konkretnih apitehničkih saveta u procesu dobijanja kvalitetnih matičnjaka-matica. Ispitivani parametri ovog rada, u smislu anatomske-reproduktivne karakteristike pčelinjih matica, mogli bi se uvesti i kao selektivni kriterijumi u dobijanju kvalitetnijih matica, jer od njihovih veličina direktno zavisi i kvalitet budućeg društva. Iako ovaj sistem vrednovanja kvaliteta matica zahteva i njeno žrtvovanje, indirektnim saznanjima, poput sib-testa kod ostalih vrsta životinja, navedena ispitivanja mogu biti primenjiva u praksi kao pouzdan parametar njenog kvaliteta.

Prvi aspekt rada baziran je na uticaju različite ishrane tokom proizvodnje matica i njihovog dobijenog kvaliteta. Neizostavan faktor za uspešno pčelarenje je svakako kvalitet hrane i ishrana društava, bilo prirodno sakupljene od strane pčela, bilo veštački

dodate od strane čoveka. Od njenog kvaliteta zavisice dužina života pčela, brzina razvoja pčelinjeg društva, pojave bolesti, kvalitet prezimljavanja kao i mnogi drugi faktori među kojima je svakako i kvalitet dobijenih matičnjaka i matica. Zbog visokog uticaja hrane na kvalitet i produktivnost pčelinjeg društva, jasna je potreba i intervencija od strane čoveka za pomoć i unapređenje određenih faza proizvodnje. Ostvarivanje visokih proizvodnih rezultata usled određene ishrane bitno će doprineti u daljem odabiru najpovoljnije ishrane pri dobijanju pčelinjih matica i matičnjaka. Dobijeni rezultati o uticaju ishrane biće veoma relevantni s obzirom na to da se navedenoj problematici pristupilo kako sa biološko-anatomske strane (disekcija matica) tako i na nivou genetike, tj. genske ekspresije za jedan od glavnih i odgovornih gena zaslužnih za vitalnost matica.

Drugi aspekt je ispitivanje česte manipulacije i uznemiravanja društava pri komercijalnom dobijanju matica i veštački odabir materijala od strane komercijalnog proizvođača i poređenje tako dobijenih matica sa maticama poreklom iz prirodnog nagona.

Uzimajući u obzir da su medonosne pčele društveni insekti, a pčelinje društvo često imenovano kao super-organizam, ishrana i potreba društva za hranom predstavlja složen problem pri proučavanju. Primena različite ishrane i suplemenata može bitno uticati na odgajivačka društva i budući kvalitet proizvedenih matica. Ispitivani parametri (reproduktivno-proizvodne karakteristike i vitelogenska ekspresija) kvaliteta matice mogu dati detaljniji uvid kako delovanje određenog tipa ishrane utiče na dobijanje i formiranje matica.

2. Pregled literature

2.1. Pčelinja matica

Pčelinja matica, majka svih članova društva, određuje nasledne karakteristika toga društva (*Masry i sar., 2015*). Uprkos identičnoj prirodi DNK molekula, matica i njene radilice su snažno međusobno različite u pogledu anatomije, fiziologije i dužine života (*Maleszka, 2008*). Štaviše, ponašanje matice i radilica je izuzetno divergentno, varirajući od navigacionog znanja radilica do kolonijalno sveprisutnih hemijskih uticaja majke matice koja kontroliše mnoge aspekte postojanja društva (*Lyko i sar., 2010*). Uticaj ishrane koja dovodi do epigenetičkih promena kod medonosne pčele je izuzetno prisutan. Hranjenje matičnim mlečom u određenom periodu mladih larvih dovodi do metaboličkog ubrzanja i povećanog rasta usled globalnih ali relativno suptilnih promena u ekspresivnim nivoima sveprisutnih gena (*Barchuk i sar., 2007*), a samim tim i bifurkacije u nastajanju radilice/matrice. Rast, produktivnost i opstanak desetine hiljada pčela radilica zavisi u velikoj meri od reproduktivnog kapaciteta matice i broja trutova sa kojim je ona sparena (*Tarpy i sar., 2013*). Opšte je prihvaćeno da je kvalitet matice direktno povezan sa produktivnošću društva. Matica je visokospecijalizovana u svojoj ulozi u proizvodnji i polaganju jaja, dakle brojčanom održavanju i koheziji pčelinjeg društva. Kvantitativni i kvalitativni reproduktivni potencijal matice, koji predstavlja njen kvalitet, nije lako determinisati, jer se ogleda u zbiru mnogih faktora među kojima su njen genotip, ishrana, metode odgajivanja i broja matičnjaka koje je društvo negovalo, sezone, uspešnosti sparivanja kao i njenog kasnije adultnog okruženja (uključujući delovanje pčelara) (*Akyol i sar. 2008, Oldroyd i sar., 1990*).

Ishranom kontrolisana razvojna podela matica/radilica kod socijalne medonosne pčele *Apis mellifera* jedan je od najbolje poznatih primera razvojne fleksibilnosti (*Lyko i sar., 2010*). Mnogi insekti ispoljavaju polifenizme, kao alternativnu morfologiju, koji se zasnivaju na ekspresiji diferencijalnih gena pre nego genetski polimorfizam. Matica i radilice su alternativni oblici odrasle ženke medonosne pčele i tipičan su primer polifenizma usled ispoljavanja različite ekspresije mnogih gena pod uticajem faktora okoline (*Evans i Wheeler, 1999*).

Proizvodnja kvalitetnih matica je veoma važan korak u komercijalnom pčelarstvu. Zdrava i vitalna matica, koja predstavlja osnov za održavanje i proizvodnju

snažnih pčelinjih društava, mogu umanjiti pojavu i negativni efekat mnogih pomenutih problema s kojima se pčelarstvo suočava. Uticaj ishrane, posebno polena, na zdravlje pčela i razvoj zajednice je dobro poznat (*Brodtschneider i Crailsheim, 2010; Di Pasquale i sar., 2013; Omar i sar., 2017*). U praksi pčelama se u hranu najčešće dodaju proteinski suplementi (sa ili bez prirodnog polena) ili proteinsko-vitaminski preparati, ali postoje i novija istraživanja efekata gljiva i algi dodatih u hranu za na pčele, koji su dali obećavajuće rezultate (*Stevanović i sar., 2018; Jehlik i sar., 2019*).

Uopšteno je prihvaćeno da bi matica visokog kvaliteta trebala da ima sledeće fizičke karakteristike: veliku telesnu masu, veliki broj ovariola, veliku spermateku, visoki broj spermatozoida u spermateci kao i odsustvo bolesti (*Hatjina i sar., 2014*). Tokom rada, fokusirali smo se na nekoliko kriterijuma koji određuju kvalitet matice uključujući (pojedine) pomenute fizičke karakteristike reproduktivnog trakta uz genetsku analizu, koji su empirijski vezani za produktivnost i vitalnost pčelinjeg društva.

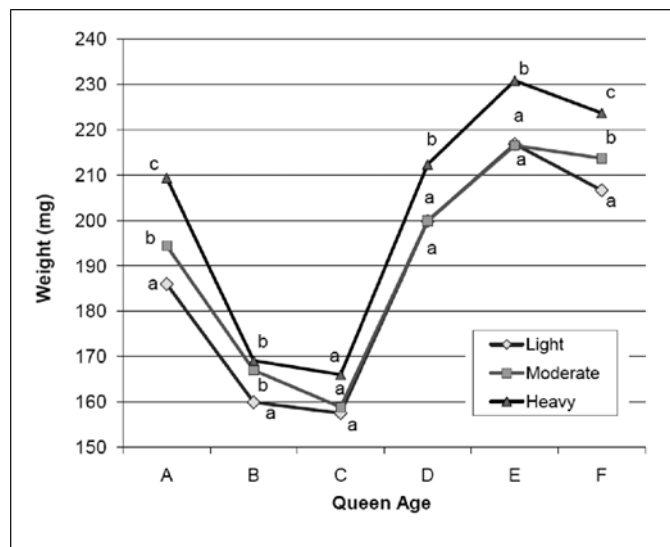
2.2. Morfološko-reproduktivne karakteristike kao mera kvaliteta pčelinje matice

2.2.1. Telesna masa matice

Razumevanje reproduktivnog potencijala („kvalitet“) matice može pružiti dragocene uvide u faktore koji utiču na fenotip pčelinjeg društva (*Delaney i sar., 2011*). Masa matice je fizička karakteristika koja je kritična u evaluaciji budućeg reproduktivnog potencijala i jedan je od preduslova za njen kvalitet (*Hatjina i sar., 2014*). Merenje matice (usled varijacije njene telesne mase mora se unapred odrediti koji trenutak je pogodan za merenje - pre ili nakon sparivanja) može biti pouzdan parametar njenog kvaliteta. (*Akyol i sar., 2008*). Varijacije u telesnim masama matice mogu biti posledica mnogih faktora uključujući genotip, starost larve pri presađivanju, period godine kao i uslovi nege u društvima gde se one proizvode (*Tarpy i sar., 2000*). Polno sazrevanje i reproduktivni status matice determiniše njenu masu. Masa nesparenih matice nema uticaja na njeno ranije polno sazrevanje i izlazak na sparivanje (*Kahya i sar., 2008*). Pri merenju matice uobičajena su dva merenja, merenje pri izvođenju kao i merenje nakon sparivanja i početka ovipozicije. Prema *Medina i Gonçalves* (2001) masa matice ne pogađa otpočinjanje ovipozicije, dok prema

navodima *Taranov-a* (1973) teže matice počinju sa polaganjem jaja ranije u poređenju sa lakšim maticama. Tokom prvih 36 h, teže matice gube brže svoju masu u poređenju sa prosečnim i lakšim maticama (*Skowronek i sar., 2004*). Masa matice varira tokom različitih perioda njenog života i zavisi od mnogih abiotičkih i biotičkih faktora. Kod novoizleženih, nesparenih matica, masa opada sve do čina sparivanja, a gubitak mase je posebno rapidan tokom prvih 36 h. Tokom prvih 36 h, gubitak mase je 1 mg / 1 h i to gotovo linearno, dok je nakon 36 h prosečan gubitak mase 1 mg do 2 mg po 1 danu (*Skowronek i sar., 2004*). Takođe, prosečne mase matica mogu da budu posledično vezane za godinu kao i za položaj matičnjaka na ramu (više u *poglavlju 2.3.*). Tako je prema prethodno navedenom autoru masa matica tokom 2003. i 2004. godine u proseku bila različita za 10 mg. Nakon sparivanja, matice oporavljaju svoju masu, čemu razvijanje i rast jajnika značajno doprinosi masi (*Shehata i sar., 1981*). Masa matica, bilo pri izvođenju, bilo nakon sparivanja, je značajno povezana sa njenom atraktivnošću prema radilicama kao i pri njenom reproduktivnom uspehu (*Szabo, 1973*). Veća telesna masa matica je takođe u pozitivnoj korelaciji sa većim procentom prijema dodatih matica u stranim društvima (*Yadava i Smith, 1971*). Masa matica je u pozitivnoj korelaciji sa težinom jajnika, veličinom i brojem ovariola, dijametrom spermateke i brojem uskladištenih spermatozoida (*Tarpy i sar., 2013; Kaftanoglu i sar., 2000; Collins i Pettis, 2013; Woyke, 1971*). Masa matice je osobina koja je veoma podložna pojavi heterozis efekta (*Hoopingartner i Farrar, 1959*). Dakle, masa je integrativna mera veličine i fiziološkog stanja matice i predstavlja jedan od osnovnih informativnih indikatora njenog kvaliteta. Sa druge strane prema *Abdulaziz i sar. (2013)* uočena je slaba korelacija između mase pčelinje matice i broja ovariola ($r = 0,2225$), dijametra spermateke ($r = 0,2413$) i volumena spermateke ($r = 0,2439$).

Prema novodima *Kahya i sar. (2008)*, od izvođenja pa do polne zrelosti, matice koje su pripadale lakoj grupi kalirale su 15,5% (29 mg), srednje teške matice 18,3% (35,6 mg) dok se masa kod najtežih matica umanjila za 20,6% (43 mg) (grafikon 1). Prema istim autorima, matica izmerena pri samom izvođenju kao i mesec dana nakon pronošnja je u značajnoj pozitivnoj korelaciji ($r = 0,808$).



Grafikon 1. Fluktuacija masa matica u različitim težinskim grupama tokom reproduktivnog razvoja (*Kahya i sar., 2008*)

Pri dobijanju matica, pored uticaja faktora okoline, nasledna genetska osnova utiče na ishod telesnih masa (*Moritz i sar., 2005*). Rasne karakteristike kod matica i njenih masa opisana je od strane *Abdulaziz-a (2013)* gde je u dvogodišnjem ispitivanju utvrđena prosečna razlika između *A.m. carnica-e* i *A.m. jemenitica-e* od 28,1 mg. Visoka pozitivna korelacija nađena je između mase nesparenih matica i veličine glave ($r = 0,6771$), dužine mandibula ($r = 0,6618$) kao i dužine prednjeg krila ($r = 0,6056$) (*Abdulaziz i sar., 2013*). Matice proizvedene od mlađih larvi (prvi stadijum) imale su veću telesnu masu i veći broj jajnih cevčica u poređenju sa maticama dobijenih od starijih larvi (treći stadijum) (*Rangel i sar., 2013*). Iako larve do kraja trećeg dana imaju potencijal da budu reproduktivne matice njihov kvalitet linearno opada sa povećanjem starosne dobi larve (*Gençer i sar., 2000*).

Masa novoizležjenih matica dobijenih (tokom proizvodnje matičnjaka) u prisustvu matice iznosila je $198,20 \text{ mg} \pm 8,74 \text{ mg}$ dok je težina matica dobijenih u odsustvu matice iznosila $199,07 \text{ mg} \pm 7,55 \text{ mg}$ (*Cengiz i sar., 2009*). Međutim, prema navodima *Dodologlu i sar. (2004)* masa novoizležjenih matica dobijenih u prisustvu matice iznosila je $206,13 \text{ mg} \pm 3,20 \text{ mg}$ dok je težina matica dobijenih u odsustvu matice iznosila $178,47 \text{ mg} \pm 2,05 \text{ mg}$.

Prilikom podele matica na lake, srednje i teške matice *Al-Fattah i sar. (2011)* su ustanovili da se teške matice (190 mg - 200 mg) javljaju kada se presađuje 15

matičnjaka po društvu, dok se teške matice pri presađivanju od 24 i 48 matičnjaka pojavljuju u malom procentu. U istoj studiji, prilikom presađivanja 66 matičnjaka pojava teških matica je potpuno izostala.

Uchôa i sar. (2012) u svom ogledu sprovedenom u Brazilskim prašumama navode da su teže matice proizvedene tokom kišne sezone u komparaciji sa sušnom sezonom i navode preporuku za minimalnu masu matica 200 mg. U istom radu navodi se da društva sa težim maticama imaju veću produktivnost što dalje navodi da je masa matice dobar selekcionni parametar.

Prosečne mase matica prema *Akyol i sar.* (2008) iznosila je $192 \text{ mg} \pm 1,49 \text{ mg}$ što je slično rezultatima *Akyol i Kaftanoglu* (1995) 197,38 mg; *Gul i Kaftanoglu* (1986) 181,13 mg; *Kale* (1992) i 169,9 mg; *Guler i Kaftanoglu* (1999) 205,83 mg i *Kaftanoglu i sar.* (2000) i 204,0 mg (*Akyol i sar.*, 2008). Prema navodima *Masry i sar.* (2015) prosečna telesna masa nesparenih matica iznosila je 140 mg -160 mg. Interesantni su i navodi *Harano-a i sar.* (2007) koji pokazuju da telesna masa opada kod nesparenih matica, dok suva materija blago raste. Gubitak u masi nesparenih matica posledica je gubitka telesne vode (*Harano i sar.*, 2007). Razlog povećanju telesne mase kod sparenih matica, osim razvoja jajnika, je i snižena lokomotorna aktivnost. Nakon sparivanja matice dolazi do pada nivoa dopamina (biogenog amina pčelinjeg mozga), koji utiče na inhibiciju lokomotornih aktivnosti, usled čega se čuva energija pronelih matica (*Harano i sar.*, 2007). Nesparsane matice imaju relativno visoku lokomotornu aktivnost u periodu od 6-12 dana, mada je malo verovatno da je to povezano sa potragom suparničkih sestara-matica jer se to obično izvrši u toku prvih 6 dana. Povećana aktivacija nesparenih matica u periodu 6-12 dana je rezultat aktivacije motornih sistema i održavanje visokog fizičkog kapaciteta koji je neophodan pri parenju u tom periodu. (*Gilley i Tarpy*, 2005).

2.2.2. Jajnik, masa jajnika i broj jajnih cevčica

Tokom reprodukcije (muških i ženskih individua) dolazi do redukcije života u jednu haploidnu ćeliju – gamet, koji predstavlja bazu za genetsku razmenu i stvaranje novog života (*Büning*, 1994). Proces formiranja polnih ćelija kod matica dešava se u ovarijumima. Ovarijumi kod ženki himenoptere izdeltjeni su na cevčice, tj. tubule – ovariole (*Jackson i sar.*, 2011). Ovariole predstavljaju cevčice, međusobno paralelne, u

kojima se razvijaju jajne ćelije i čine osnovnu jedinicu u građi jajnika kod ženskih insekata. U svakoj ovaroli dolazi do formiranja oocita na jednom kraju, potpuno sazrevajući dok pristižu na drugi kraj. Kod medonosne pčele, formiranje ovariola dešava se u ranom larvenom razviću (*Wheeler, 2009*). Broj i aktivnost jajnih cevčica u mnogome zavisi od tipa ishrane, porekla i rase matica, starosti larvi pri presađivanju, izloženosti akaricidima i dr., a broj cevčica varira u velikoj meri i kreće se od 100 - 180 po jednom jajniku (*Snodgrass, 1956*). Tokom evolucije, socijalni insekti razvili su jak dimorfizam u ovarijalnom broju između reproduktivno sposobnih i infertilnih kasta. Među ženskim kastama zajednička karakteristika ovariola se ogleda u izuzetno izduženim terminalnim filamentima koje se ne sastoje samo od normalnih terminalnih ćelija filamenata već sadrži i očigledno neizdiferencirane ćelije za koje se smatra da su stem ćelije (*Erica i Hartfelder, 2004*).

Kod oplođenih matica koje aktivno polažu jaja jajnici zauzimaju veći deo abdomena (*Winston, 1987*). Jajnici kod nesparenih matica su osam puta manji u poređenju sa jajnicima sparenih matica (*Shehata i sar., 1981*). Broj jaja koja pčelinja matica zaleže determinisano je brojem ovariola u ovarijumu gde se jaja i proizvode. Matice poreklom od određenih komercijalnih proizvođača mogu se često okarakterisati kao matice slabog kvaliteta, što pokazuje podatak iz Severne Amerike da je čak 7,5% matica posedovalo manje od 125 ovariola po jajniku (*Jackson i sar., 2011*).

Na početku postembrionalnog razvića, larva matice ne razlikuje se od larve radilice po broju ovarijalnih cevčica (ovariola), ali u toku daljeg razvića broj ovariola kod radiličkih larvi postepeno opada, tj. u procesu histolize ovariole i ostali delovi jajnika radiličke larve se resorbuju, tako da u trenutku završetka larvenog života broj nezrelih ovariola pada na pet, maksimalno dvadeset. Međutim, kod matičnih larvi, tokom daljeg postembrionalnog razvića, broj ovariola progresivno raste dostižući svoj konačni broj tokom stadijuma lutke (*Stanimirović i sar., 2000*). Primećena je i blaga asimetrija ($r = 0,12$) između jajnika adultnih oblika matica, broj ovariola bio je značajno veći u desnim jajnicima ispitivanih matica (*Jackson i sar., 2011*). Nasuprot iznetim, određeni rezultati starijih navoda (*Eckert, 1934*) ukazuju da je veći broj ovariola bio u korist levog jajnika.

Težina jajnika nije u zavisnosti samo od broja ovariola već i od broja i stadijuma razvoja jajnih ćelija u ovariolama, što je pak u vezi sa intenzitetom nosivosti pčelinjih

matica, kao i sezone. Prema *Hatjina i sar. (2008)* uočena je razlika u broju ovariola tokom dve različite sezone. Broj ovariola tokom 2006. godine varirao je od 134,39 mg - 180,63 mg u proseku od 160,94 mg, dok je broj ovariola tokom 2008. varirao od 125,46 mg - 172,21 mg sa prosekom 149 mg.

Korelacioni koeficijent telesne mase matice broja ovariola je $r = 0,75$; povećanjem mase matice za 10 mg dolazi do povećanja broja za 6,5 ovariola (*Woyke, 1987*). Podaci od *Woyke-a (1987)* nisu u skladu sa rezultatima *Hatjina i sar. (2008)* gde nije nađena korelacija između telesne mase i broja ovariola ($r = 0,1423$) dok je između telesne mase i mase jajnika utvrđena visoka korelacija ($r = 0,7434$) (tabela 1).

Broj ovariola je osobina koja ostaje nepromenjena tokom celog života, a broj zavisi od porekla i načina odgajivanja matica (*Avetisyan, 1961*). Izlaganje akaracidima, poput kumafosa, utiče negativno na težinu jajnika pčelinjih matica (*Haarmann i sar., 2002*).

Razvijenost jajnika tj. broj jajnih cevčica zavisi i od starosti larve pri presađivanju. Matice odnegovane od jednodnevnih larvi imale su, u proseku, 154 ovariola, matice odnegovane od dvodnevnih larvi oko 146 ovariola, a matice odnegovane od trodnevnih larvi 136 ovariola. Kvalitetna matica trebala bi da ima oko 150 ovariola (*Carreck i sar., 2013; Gregorc i Smodiš-Škerl, 2015*).

Tabela 1. Korelacija između reproduktivnih parametara pčelinjih matica (preuz. iz *Hatjina i sar, 2008*)

Povezanost osobina	Pozitivna korelacija	Nema korelacije
Telesna masa matice – broj ovariola	<i>Weaver, 1957; Avetisyan, 1961; Woyke, 1971; Szabo, 1973; Wen-Cheng and Chong-Yuan, 1985; Gilley et al., 2003</i>	<i>Corbella and Concalves (1982); Hatch et al., 1999; Jackson et al., 2011</i>
Telesna masa matice – dijametar spermateke	<i>Akyol et al., 2008; Kahya et al., 2008; Bienkowska et al., 2009</i>	
Masa larve pri presađivanju- broj ovariola	<i>Hoopingarner and Farrar, 1959; Woyke, 1971</i>	
Broj ovariola – dijametar spermateke	<i>Weaver, 1957; Woyke, 1971</i>	<i>Jackson et al., 2011</i>
Broja ovariola – proizvodnja legla	<i>Jackson et al., 2011</i>	

Telesna masa matice – proizvodnja legla	<i>Makarov, 1969; Akyol et al., 2008</i>	
Telesna masa matice – Vreme pronosjenja matice	<i>Taranov, 1973; Siuda & Wilde, 2006</i>	
Starost larvi pri presađivanju – broj ovariola	<i>Jordan, 1960; Woyke, 1960, 1964, 1971; Szabo and Townseed, 1974</i>	
Starost larvi pri presađivanju – dijametar spermateke	<i>Jordan, 1960; Woyke, 1960, 1964, 1971; Szabo and Townseed, 1974; Gilley et al., 2003; Tarpay et al., 2000</i>	
Starost larvi pri presađivanju – težina matice	<i>Tarpay et al., 2000</i>	
Dijametar spermateke – broj spermatozoida	<i>Woyke, 1966; Bieñkowska et al., 2008</i>	

Spoljašnji zid svake ovariole je građen od jednoslojnog epitela, dok se u unutrašnjosti nalaze jajne ćelije na različitim nivoima razvića. U svakoj ovariolu se mogu razlikovati tri dela: terminalni - končasti, germarijum i vitelarijum¹. Terminalni deo ovariole je končastog izgleda (nitolik), ispunjen jedinstvenom višejedarnom citoplazmatičnom masom, jer u njemu nije obavljena celularizacija. Germarijum je deo ovariole koji se nalazi ispod terminalnog filamentoznog dela, i u sebi nosi ovogonije ćelije, iz kojih će se diferencirati zrele jajne ćelije. Vitelarijum je deo ovariole u kojem se nalaze oociti u razviću i trofociti, tj. ćelije koje imaju ulogu u ishrani jajnih ćelija. Epitelijalni sloj vitelarijuma urasta tako da obrasta svaku ovogoniju, koja deobom daje jedan oocit i tri trofocita. Daljim razvojem ovocita nastaje jedna jajna ćelija, a u četiri sukcesivne deobe od tri trofocite nastaje 48 novih ćelija, koje su zajedno sa jajnom ćelijom (ukupno 49 ćelija) okružene posebnim epitelom poreklom od vitelarijuma - horion, gradeći jaje (preuz. iz *Stanimirović i sar., 2000*). Ako je sprečeno sparivanje matice, vitelarijum ne nastavlja diferencijaciju i vitelogeneza se ne dešava, ciste u ovariolama počinju sa degradacijom i pojedine ćelije izumiru. Dakle sparivanje je stimulatívni faktor za započinjanje vitelogeneze i oocitnog sazrevanja (*Patricio i Cruz-Landim, 2002*).

¹ Kod nesparenih matica u ovariolu se uočavaju samo dve regije, terminalni filament i germarijum. Ubrzo nakon sparivanja počinje taloženje žumanceta i uočavanja vitelarijuma, dok starenjem matice germarijum se skraćuje (*Patricio i Cruz-Landim, 2002*)

Masa jajnika zavisi i od rase pčela. Matice *Apis cerana* imaju svega ~ 140 ovariola dok matice *Apis dorsata* imaju 248 – 274 ovariola u oba jajnika (Velthuis i sar., 1971), Prema Abdulaziz i sar. (2013) *Apis mellifera carnica* matice imale su prosek od 156,98 ovariola po jajniku, što je bilo značajno više od *Apis mellifera jemenitica* od 146,6 ovariola. Prema istim autorima potvrđena je pozitivna korelacija između broja ovariola i veličine glave ($r = 0,3749$ za dužinu; $r = 0,5383$ za širinu glave), dužinu mandibula ($r = 0,3102$) i 3. i 4. abdominalnog tergita ($r = 0,4904$) kao i niska korelacija sa dužinom i širinom prednjeg krila kod matica.

Narušena plodnost matice usled određenih virusa bilo bi kritično pitanje za zdravstveno stanje pčelinjeg društva, s obzirom da je ona jedina odgovorna ženka za konstantno obnavljanje novih, uglavnom kratkoživećih, pčela. Patološka stanja ovarijuma usled viralne infekcije potencijalno može dovesti do lize tkiva i većeg broja praznih ovariola. Međutim, veliki broj ispitivanih matica je pokazao da određeni virusi (virus deformisanih krila, *Varroa destructor* virus kao i prisustvo nozeme) imaju mali uticaj na zdravstveni i funkcionalni status pčelinje matice, posebno u tkivima jajnika, koja se inače u većini slučajeva može nadoknaditi na normalni funkcionalni nivo (Gauthier i sar., 2011).

U našem radu ispitivan je kvalitet matica (između ostalog i preko njenih jajnika) u odnosu na tip ishrane. Zbog obimnosti rada nije se razmatrao uticaj ishrane na reproduktivni potencijal pčela radilica premda će se u ovom poglavlju radi potpunijeg razumevanja napraviti i kratki osvrt o uticaju hrane na pčele radilice. Polaganja jaja kod radilica kao komponenta reprodukcije medonosnih pčela je u velikoj meri ignorisana (Page i Erickson, 1988). Programirana ćelijska smrt u radiličnom jajniku *Apis mellifera* redukuje broj ovariola tokom metamorfoze od 150 do 200 primordija na manje od 10. Razlog izumiranja tkiva jajnika tokom larvenog perioda radilice je u nedovoljnoj ishrani sa matičnom mleči (Reginato i Cruz-Landim, 2002). Za razliku od radilica, praktično sve ovariole u ovarijumu matica preživljavaju do adultnog stadijuma (Capella i Hartfelder, 2002). Sem u izuzetnim slučajevima, pčele radilice nemaju aktivne jajnike i ne učestvuju u reprodukciji. Do ovog izuzetka (i aktiviranja jajnika) može doći do veoma malog broja radilica čak i u prisustvu matice, dok u bezmatičnim društvima njihova aktivnost kod određenih radilica se znatno povećava. Osim prisustva/odsustva matice, na razvoj jajnika kod radilica utiče tip ishrane kao i sezona (koja indirektno

predstavlja kvalitet ishrane i temperaturni režim). Radilice hranjene sa većim udelom proteina, bilo matičnom mleči, polenom ili kazeinom dolazi do aktiviranja njihovih jajnika (ishrana saharozom nema uticaja na aktivaciju jajnika) (*Pirk i sar., 2009*). Ukoliko se radilice hrane proteinski bogatom hranom (polenom) dovodi do aktiviranja njihovih jajnika i jajnih ćelija čak i u prisustvu matice (*Human i sar., 2007*). Slična ispitivanja godinu dana ranije *Hoover i sar. (2006)* ukazuju da je na iniciranje aktivnosti jajnika radilice moguće kako tokom larvenog, tako i tokom adultnog stadijuma, i da su efekti aditivni; ovarijumi radilica su najaktivniji tokom sredine leta što takođe ukazuje na uticaj hrane na njihov razvoj.

2.3. Uticaj ishrane na dobijanje matičnjaka

Odgovarajuća ishrana društava i kvalitetna produkcija matične mleči usloviće bolje rezultate u pogledu dobijenih pčelinjih matica. Iako razviće matice od momenta zaleganja jaja pa do njenog izvođenja traje u proseku 16 dana, treba istaći da je glavna ishrana matičnih larvi u prvom periodu njihovog larvenog stadijuma. Najbolji metod za proizvodnju matica je onaj koji će u ovom periodu obezbediti najoptimalniju ishranu larvi (*Standifer, 1980*).

Da bi se odgajila jedna larva potrebno je 125 mg do 187,5 mg polena, tj. 25 mg do 7,5 mg proteina ² (*Hrassnigg i Crailsheim, 2005*). Međutim, veoma mala količina polena direktno stiže do larve, veći deo proteina larva dobija od procesuirane hrane adultnih pčela (*Brodshneider i Crailsheim, 2010*). *Babendreieret i sar. (2004)* su izračunali da je udeo proteina koji direktno potiče iz polena svega 5%. Mlade larve se posećuju i hrane manje nego starije larve (*Schmickl i Crailsheim, 2002*).

Broj matičnjaka koji se dodaje odgajivačkim društvima je jedan od osnovnih preduslova u dobijanju kvalitetnih matica. Veći broj matičnjaka dovodi do smanjene ishrane svakog pojedinačnog matičnjaka. Navedene činjenice se mogu ispitati i pri potpuno veštačkom odgajivanju larvi. Larve se mogu hraniti u *in vitro* uslovima sa smešom 50% matičnog mleča i 50% vodenog rastvora pomešanog sa ekstraktom kvasca (2%), D-glukoze (12%) i D-fruktoze (12%) (*Vandenberg i Shimanuki, 1987*). Pre presađivanja larve poželjno je da se stavi 10 µl -20 µl navedene hrane. Količina hrane koja se dodaje u prva dva dana je po 10 µl, dok se za svaki naredni dan povećava za 10

² navedene informacije se odnose na radiličnu larvu

μl (*Aupinel i sar.*, 2005). U istom radu se navodi da je masa sedmodnevne larve bila veća pri prihrani od 160 μl (ukupno date hrane) nego pri prihrani od 130 μl , što potvrđuje prethodno izneto.

Dužina matičnjaka pored drugih faktora zavisi i od tehnologije njihove proizvodnje. Dužina zrelih matičnjaka iznosila je 25,13 mm \pm 0,18 mm proizvedenih u prisustvu matice, dok je izmerena dužina matičnjaka od 30,71 mm \pm 0,14 mm proizvedenih u društvima bez matice. Ovi rezultati pokazuju da društva u odsustvu matice grade veće matičnjake u poređenju sa društvima u kojima je matica prisutna (*Cengiz i sar.*, 2009). I pored ovoga, prema ukupnim rezultatima dobijenim u ovoj studiji (masa matica pri izvođenju, procenat sparivanja, vreme pronosjenja i prihvatanje sparenih matica), navedeni autori zaključuju da je proizvodnja matica u društvima uz prisustvo matice povoljnije nego proizvodnja matica u društvima gde je matica oduzeta. Prema *Skowronek i sar.* (2004) rađeno je merenje 195 matičnjaka, gde su izmerene dužine matičnjaka varirale od 19 mm do 31 mm, sa prosekom od 24,9 mm. U ovim merenjima nije pronađena značajna korelacija između dužine matičnjaka i telesnih masa matica starih 0h - 1h ($r = -0,0056$). Prema navedenim autorima utvrđeno je da težina matice ima veze sa pozicijom matičnjaka na ramu sa matičnjacima. Matice sa srednje i donje pozicije rama su bile teže (~ 224 mg) u poređenju sa maticama izvedenih iz matičnjaka pozicioniranih pri vrhu tj. blizu satonoše (~ 217 mg).

U pogledu veličine matičnjaka, do sličnih vrednosti su došli *Wilkinson i Brown* (2002) gde je dužina iznosila 30,82 mm u odsustvu matice, dok je vrednost 26,70 mm izmerena u prisustvu matice. Takođe, *Emsen i sar.* (2003) izmerili su prosečnu dužinu matičnjaka od 25,20 \pm 0,04 mm u društvima u prisustvu matice.

Metod proizvodnje matica može bitno uticati na kvalitet dobijenih matičnjaka i performanse sparenih matica. Metod dobijanja se uopšteno može podeliti na dva načina, jedan je veštački način dobijanja putem presađivanja (tzv. *Doolittle* metod) dok drugi metod podrazumeva prirodan način dobijanja. Razlike prema *Dodologlu i sar.* (2004) između ove dve metode izložene su u sledećoj tabeli (tabela 2). Prema podacima iz tabele zabeležena je visoka korelacija ($r = 0,828$) između veličine matičnjaka i telesnih masa matica.

Tabela 2. Komparacija prirodnog i *Doolittle* metode odgajivanja matičnjaka (*Dodologlu i sar., 2004*)

Metod	N	Dužina matičnjaka (mm)	N	Masa izvedenih matica (mg)	N	Period pronošnja (dana)	N	Dijametar spermateke	N	Broj spermatozoida
<i>Doolittle</i>	15	24,80±0,37	15	206,13±3,20	11	10,9±0,3	6	0,98±0,01	6	4,65±0,08
Prirodno	15	19,47±0,40	15	178,47±2,05	12	11,1±0,5	6	0,88±0,01	6	3,83±0,07

Prema *Cengiz i sar. (2009)* rađeno je ispitivanje kvaliteta matičnjaka pri presađivanju u prisustvu i bez prisustva matice. Prijem matičnjaka tokom juna, jula i avgusta bio je uvek veći pri presađivanju bez prisustva matice (95% / 78%; 86% / 71%; 78% / 61%). Prema drugoj studiji *Sahinler i Kaftanoglu (2005)* prosečan prijem matičnjaka pri presađivanju u prisustvu matice tokom juna, jula i avgusta iznosio je 75,1, 70,9 i 68,3%.

Jedan od najvažnijih faktora koji utiče na kvalitet matičnjaka (budućih majki) jeste starost larve pri presađivanju. Pri povećanju starosne dobi larve, značajan pad se ogleda u telesnim masama, dijametri spermateke i broju ovariola kod nesparenih matica (*Woyke, 1967*). Veličina matičnjaka zavisi i od starosti larve. Najveći matičnjaci potiču iz grupe gde su presađivane jednodnevne larve gde je veličina matičnjaka iznosila 29,98 mm ± 0,08 mm, dok su niže vrednosti zabeležene kod dvodnevni (24,27 mm ± 0,078 mm) i trodnevni larvi (23,56 mm ± 0,067 mm) (*Emsen i sar., 2003*). *Mahbobi i sar. (2012)* su ustanovili da su matice (*Apis mellifera meda*) koje su dobijene iz jednodnevni larvi imale veće mase i veće spermateke u poređenju sa maticama dobijenih od dvodnevni i trodnevni larvi. Prisilne matice bile su slabijeg kvaliteta od matica poreklom od jednodnevni larvi, ali boljeg kvaliteta od matica dobijenih od trodnevni larvi. Uticaj ishrane (šećerni sirup sa suplementima) je dao dobre rezultate na telesne mase matica (159,82 mg ± 1,54 mg) u poređenju sa maticama gde nije bilo dodatne prihrane (144,69 mg ± 2,56 mg).

U radu *Kovačić i Puškadija (2016)* vršeno je presađenje od 3840 matičnjaka, da bi se ispitalo da li poliranje matičnjaka u trajanju od jednog sata ima uticaja na prijem matičnjaka nakon presađivanja. Matičnjaci koji su bili prethodno ispolirani imali su prijem 85,3% za razliku od nepolirani matičnjaka gde je prijem bio 76,6%. U daljim

ispitivanjima, utvrdili su da ispolirani matičnjaci ne rezultiraju boljim telesnim masama matica i veličini njihovih spermataka.

U pogledu pozicije matičnjaka (horizontalna pozicija) i položaja letvice (vertikalna pozicija) gde se nalaze matičnjaci, najveći procenat teških matica potiče sa središnjeg dela letvice koja je na srednjem nivou. Nasuptot njima, lakše matice su proizvedene na gornjoj i donjoj letvici bliže periferiji (*Al-Fattah i sar., 2011*).

Interesantni su i stariji navodi *Taber (1979)* i *Zhu (1981)* o potrebnoj količini pčela za odgajivanje matičnjaka. *Taber (1979)* navodi da je 500 pčela hraniteljica dovoljno da bi se odnegovala jedna dobra matica. *Zhu (1981)* navodi da je desetoramna košnica, sa 1000-1500 pčela po ramu, dovoljno da bi se proizvelo 20-30 matičnjaka u jednom turnusu. Radilične larve su teže u odnosu na matične larve u prvih 96 h, a lakše posle 102 h (*Wang, 1965*). Slični rezultati su i kod *Thrasyvoulou i Benton (1982)* koji navode da je težina tj. porast larvi u prvih 90 sati brži kod radilica nego kod matica. Porast zavisi i od zdravstvenog statusa larvi prvenstveno od prisutnosti varoe koja se može naći i na svim kastama tokom larvenog razvitka, pa tako i u matičnjacima. *Garedew i sar. (2004)* navode da je energetski metabolizam kao i hranljiva potreba varoe veoma visoka, koristeći do 25% hranljivih rezervi lutke.

2.4. Ishrana društava, potreba za šećerima i proteinima

Pčelinja društva u velikoj meri zavise od raspoloživosti cvetnih izvora iz kojih dobijaju hranljive materije (posebno polen) koje su neophodne za razvoj i opstanak (*Di Pasquale i sar., 2013*). Da bi unapredili proizvodnju i pomogli pčelinjim društvima, mnogi proizvođači pribegavaju različitim prihranama od egzotičnih³ poput *Acacia* (bagremovog) brašna (*De Jong i sar., 2009*), sojinog i urminog brašna (*Amro i sar., 2016*) pa preko opšte poznatih prihrana kao što su kuruzni gluten, glukožno-fruktozni sirup, saharozni sirup itd. Ispunjavanje svih nutritivnih potreba komercijalno držanih pčelinjih društava postalo je izazov, posebno ako se društva koriste za specifične delatnosti poput oprašivanja (*De Grandi-Hoffman i sar., 2008*) ili proizvodnju matične mleči, matičnjaka i sl.

Hrana ima ogroman uticaj na mnoge parametre društava a neki od njih su prolećni razvoj, dužina života pčela, količina legla, kvalitet prezimljavanja i dr. Sem

³ Egzotičnost proizilazi iz ugla naše perspektive i lokaliteta

nabrojanih faktora, održavanje imunog sistema je jedan od najskupljih fizioloških procesa kod svih životinja (*Schmid-Hempel, 2005*) te tako neadekvatna ishrana može biti uzrok pojave raznih bolesti. Loša ishrana može uticati negativno na imunokompetenciju preko individualnog imuniteta pčele (preko snižene koncentracije hemocita, masnih tela i aktivnosti fenol-oksidge) i preko socijalnog imuniteta (aktivnosti glukoza oksidge) (*Alaux i sar., 2010*). Ishrana se može istraživati na tri nivoa - ishrana društva, ishrana odraslih pčela i ishrana larvi (*Brodschneider i Crailsheim, 2010*).

Pri dobijanju matica u radu je ispitivan jedan tip energetske hrane (šećerni sirup) i dva tipa proteinske hrane (med uz poliflorni polen; zamena za polen). S obzirom na njihov različit uticaj pri samoj proizvodnji, u ovom odeljku biće izložen kratak pregled o navedenim ishranama kao i njihovim efektima na pčelinje društvo i samih pčela.

Potrebe za šećerom. Različitom ishranom se može uticati na procenat glikogena, lipida i proteina kod medonosnih pčela (*Hrassnigg i Crailsheim, 2005*), kao i na sastav hemolimfe. Odrasle pčele, za razliku od larvi, imaju niske rezerve glikogena, 0,05 mg do 0,47 mg po radilici (*Hrassnigg i Crailsheim, 2005*). S obzirom da u telu nemaju značajne rezerve ugljenih hidrata, proteina ili masti pčele su veoma zavisne od rezerve hrane u društvima i bez dodatne prihrane ne mogu dugo opstati (*Kunert i Crailsheim, 1988*). Potrebe odrasle radilice su 4 mg svarljivog šećera za dnevno preživljavanje (*Barker i Lehner, 1978*), dok su potrebe ugljenih hidrata za ishranu jedne larve 59,4 mg tokom njenog razvića (*Rortais i sar., 2005*).

Dužina života kod zimskih pčela hranjenih u kavezima pri prihrani medom iznosila je 26,55 dana, pri ishrani šećernim sirupom 20,52 dana, dok pri invert sirupu 10,30 dana. Prosečna potrošnja hrane po pčeli u zimskom periodu se kretala u rasponu od 0,031 grama – 0,036 grama po danu. Minimalna konzumacija hrane je zabeležena kod ishrane zimskih pčela medom 0,031 grama po danu, dok je kod šećernog sirupa iznosila 0,035 grama po danu (*Mirjanić i Nedić, 2016*).

Pčele hranjene u kavezima, ispoljile su najduži životni vek prihranom šećera - saharoze (56,3 dana), visoko-fruktoznim sirupom (HFCS, 37,7 dana) a potom i medom (31,3 dana) (*Barker i Lehner, 1978*). Pčele koje uzimaju hranu iz hranilica su mlađe od pčela sakupljačica (*Free, 1965*) dok su *Brodschneider i sar. (2007)* dokazali da su pčele

koje uzimaju šećerni sirup tokom leta unutar košnice uglavnom iste starosti kao i pčele primateljice nektara.

Dodavanje vitamina C u šećerni sirup u količini od 2000 mg/L doprinosi većoj površini legla i procenta proteina u telu pčela, dok je koncentracija od 4000 mg/L dala najbolje rezultate u veličini populacije pčela i telesnih masa pčela (*Andi i Ahmadi 2014*).

Hranjenje šećernim sirupom povećalo je količinu legla tokom i nakon hranjenja, tokom jedne godine kada je bilo loše vreme, ali nije imalo uticaja na količinu legla u drugoj godini kada je vreme bilo bolje (*Free i Spencer-Booth, 1961*). Prihrana šećernim sirupom poboljšava sakupljanje polena, gde su bolji rezultati bili tokom kontinuirane prihrane od 1 litra sirupa dnevno u poređenju sa 3 litra sirupa za tri dana (*Goodwin i Houten, 1991*).

Zanimljivi su nalazi jednog ogleada u kome je utvrđeno da su sve pčele hranjene sa 100% matičnim mlečom umrle tokom trodnevnog hranjenja (kavezno držanje). Pretpostavlja se da je nemogućnost defekacije jedan od uzroka smrti, ali to može biti i zbog činjenice da sama matična mleč ne obezbeđuje dovoljno ugljenih hidrata za snabdevanje dovoljno energije, pa su pčele umrle zbog gladi (*Lin i Winston, 1998*).

Potrebe za proteinima. Sva živa bića koja su nama danas poznata, pa tako i pčele, izgrađena su po uputstvima DNK tj. RNK molekula, koji nose zapise o redosledu spajanja aminokiselina, koje se svojim peptidnim vezama „udružuju“ u veoma važne i za život neophodne biomolekule - proteine. Kod medonosnih pčela, glavni izvor proteina je polen. Polen, haploidna mikrospora, prenosi muški genetski materijal pri seksualnoj reprodukciji svih viših biljaka (*Stanley i Linskens, 1974*). Osim muških polnih ćelija, polen sadrži i hranljive sastojke i nakon stizanja do tučka deli se i izrasta u vidu polenove cevčice kroz tučak. Ova cevčica prolazi kroz stubić tučka i stiže do plodnika i do jajne ćelije. Pri tome, polenova cevčica puca i oslobađa dve muške polne ćelije (mikrogameti). Jedna se spaja sa jajnom ćelijom i formira diploidni zigot, a od druge će se formirati endosperm. On predstavlja hranljivo tkivo koje će zigot koristiti pri klijanju i razviću u novu biljku. Polen je glavni izvor proteina kod medonosnih pčela. Proteinski sadržaj u polenu varira u zavisnosti od vrste biljke i njenog lokaliteta i iznosi od 2,5% – 61% (*Roulston i sar., 2000*). Optimalni nivo proteina kako za pčele radilice tako i za odgajivanje legla je 20% - 23% (*Herbert i sar., 1977*). Za razliku od

meda, samo male količine polena se skladište u košnicama, koje se tokom bezpaše, vrlo brzo potroše (*Schmickl i Crailsheim, 2002*). Radilice konzumiraju prosečno 3,4 mg – 4,3 mg polena po danu (*Crailsheim i sar., 1992*). Prema *Alaux i sar. (2010)* količina polena konzumirana od strane jedne pčele iznosila je 5,6 mg \pm 2,1 mg po danu. Nasuprot lipidima i šećerima, nivo proteina, aminokiselina i antioksidativnog kapaciteta u polenu varira značajno (*Di Pasquale i sar., 2013*).

Količina proteina u hemolimfi se povećava tokom prvih dana nakon izvođenja i kreće se od 6,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ – 9,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (*De Jong i sar., 2009*). Postoji i fiziološka razlika kod pčela u različitim delovima godine. Glavna razlika je upravo u povećanom sadržaju proteina u hemolimfi što omogućava da prežive nekoliko meseci na ugljenim hidratima. Vitelogenin je glavni rezervni protein u hemolimfi i prekursor za mnoge druge proteine (*Amdam i sar., 2003*) i može dostići koncentraciju do 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ kod zimskih pčela (*Brodshneider i Crailsheim, 2010*).

Interesantni su i rezultati *Fievet i sar. (2006)* koji navode da virusi koriste celularnu mašineriju da se množe i reprodukuju, tako da veći broj dostupnih ćelija može doprineti i boljem razvoju populacije virusa. Na primer, utvrđeno je da se virus *DWV* umnožava u masnom telu pčela a ovo tkivo je više razvijeno u pčelama koje su hranjene polenom.

Polen utiče na razvijanje hipofaringealnih žlezda, ekspresiju gena vitelogenina i transferina, toleranciju na *Nosema ceranae*, dužinu života i preživljavanje pčela (*Di Pasquale i sar., 2013*). Zanimljiva činjenica, prema istim autorima, je da polifloralna mešavina polena nije nužno bolja od monoflornog polena dobre hranljive vrednosti (poput *Rubus* polena).

Proteini čine 66% – 74% suve materije adultnih pčela (*Hrassnigg i Crailsheim, 2005*). Prema ispitivanju *Crailsheim i sar. (1992)* dve desetoramne zajednice potrošile su 13,4 kg i 17,8 kg polena u jednoj godini. Iako je polen kompletna hrana, pčele sa svojim izlučenim enzimima, regurgitacijom nektara, mlečnim bakterijama (iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*) (*Vásquez i Olofsson, 2009*) pretvaraju polen u još kompletniju nutritivnu, konzervisanu materiju – pčelinji hleb, perga.

Ocenjivanje kvaliteta polena merenjem rasta i razvoja pčelinjeg društva obezbedilo bi najpristupačnije informacije o potencijalnom polenskom uticaju na društvo. Međutim, sakupljanje velikih količina polena za upotrebu u eksperimentima

gde učestvuje veći broj društava u punoj razvijenosti nije uvek izvodljivo. Iz navedenih razloga *Pernal and Currie* (2000) su radili indirektno ispitivanje kvaliteta polena preko veličine hipofaringealnih žlezda i stepena razvijenosti jajnika kod pčela radilica, gde su dokazali da navedeni parametri mogu biti pouzdana i osetljiva mera kvaliteta polena i iskorišćenosti proteina. U istom radu su zaključili da zamrzavanje polena do 1 godine kao i skladištenje u okruženju sa smanjenom količinom kiseonika nije umanjilo sadržaj azota, niti promenilo hranljivu vrednost.

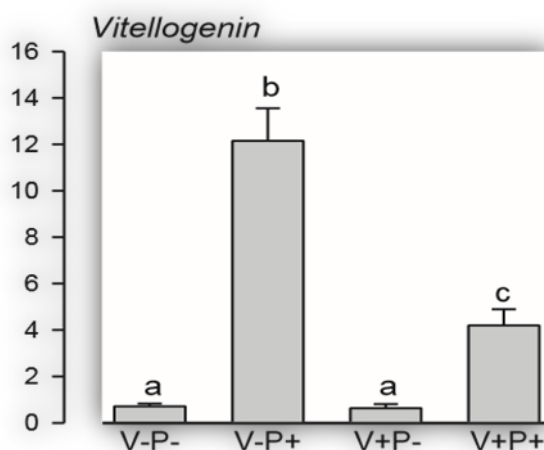
Protein je strukturni i funkcionalni sastojak tkiva i stoga igra važnu ulogu u razvoju pčela (*Hoover i sar., 2006*). I pored navedenog, ne sme se zaključiti da prevelika količina proteina uvek povoljno deluje na pčelinje društvo. Osim toga, nema dokaza da pčele preferiraju sakupljanje polena koji sadrži visok nivo proteina (*Roulstonetal, 2000*). Optimalna koncentracija sirovih proteina (SP) je 29,5% – 34,0% (pre mešanja sa šećernim sirupom) (*Zheng i sar., 2014*). Nasuprot optimumu, više vrednosi (38,5% SP) nisu poželjne jer negativno utiču na porast zajednice, dugovečnost pčela, aktivnost proteolitičkih enzima u srednjem traktu i veličinu hipofaringealnih žlezda (*Zheng i sar., 2014*).

2.5. Ekspresija gena za vitelogenin (Vg)

Nutrigenomika, originalno razvijena za ljudske potrebe u zdravstvene svrhe, obećava i dešifrovanje nutritivnog uticaja na metaboličke puteve kod insekata. Ishranom proteina i amino kiselina (kao i drugih materija) mogu se poboljšati imune funkcije kako kod ljudi (*Li i sar., 2007*) tako i kod insekata (*Lee i sar., 2008*), upravo preko povećanja regulacije i ekspresije imunih gena. Nutrigenomika predstavlja novo područje u oblasti poljoprivrednih nauka gde se saznanja o pozitivnom, ili negativnom, uticaju ishrane direktno ispoljava na aktivnost gena (*Alaux i sar., 2011*). Cilj našeg istraživanja, preko visoko-sofisticiranih metoda za analizu genoma i ekspresiju gena, je u otkrivanju i razumevanju uticaja ishrane na ekspresiju gena kod pčelinjih matica. Mnogi socijalni insekti pokazuju polifenizme, alternativnu morfologiju, koji se zasnivaju na ekspresiji diferencijalnog gena, a ne na genetičkom polimorfizmu. Napredak u razumevanju razvojnih mehanizama koji regulišu određivanje kaste u većini eusocijalnih insekata frustrirajuće je sporo usled male veličine ovih organizama i kompleksne prirode njihovih društava. (*Evans i Wheeler, 1999*). Kompleksnost jednog pčelinjeg društva se

ogleda u postojanju altruizma, nepotizma, sofisticirane kognitivne sposobnosti hiljada radilica, koje uprkos mozgu zapremine 1mm^3 sa svega milion neurona izvršava gotovo nepogrešivo navigaciju, komunikaciju i dr. (*Ribi i sar., 2008*)

Uticao ishrane (bilo floralnog nektara, polena ili određenih suplemenata) na vitalnost i otpornost medonosnih pčela ne može se u potpunosti razumeti bez određivanja načina na koji se određeni nutrienti ponašaju na molekularnom nivou (*Glavinic i sar., 2017, Stanimirović i sar., 2019*). Tako su *Alaux i sar.* (2011) ispitivali uticaj polena preko transkriptomске analize abdomena odraslih pčela, uključujući srednje crevo, gde se odvija varenje polena i masnog tela kao glavne lokacije antimikrobne peptidne sinteze i skladištenja hranljivih materija. Pomenuti metod kombinuje sekvenciranje serijske analize genetske ekspresije (*SAGE*) sa tehnologijom sekvenciranja za generisanje digitalnog izlaza proporcionalnom broju transkripta po iRNK opisanom od strane *Anisimov* (2008). Nakon generisanja biblioteke digitalne genske ekspresije (*DGE*) može se utvrditi kako polen utiče na metaboličke puteve, gene koji utiču na životni vek, imunološke funkcije i prevalencu virusa kod pčela. Vitelogenin (*Vg*) je protein žumanca koji učestvuje u razvoju oocita i povezan je sa proizvodnjom jaja kod matica (*Engels, 1974; Tanaka i Hartfelder, 2004*), ali takođe ima antioksidativne funkcije koje štite pčele od oksidativnog stresa i povećanju dugovečnosti (*Corona i sar., 2007*). Zbog toga, nivo *Vg* može se predstaviti kao indikator dugovečnosti. Dakle ishrana polenom promovise razvoj masnog tela gde se *Vg* sintetiše u masnom telu, samim tim pčele hranjene polenom imaju veću ekspresiju *Vg*. To je potvrđeno *DGE* i *RT-PCR* analizom (grafikon 2), gde se jasno vidi koliko polen utiče na regulaciju i ekspresiju gena, dok parazitiranje varoe može biti veliki ekspresivni inhibitor.



Grafikon 2. Nivo vitelogenina u zavisnosti od infekcije varoom i prihrane polenom ⁴ (Alaux i sar., 2011) u zavisnosti od prihrane polenom i infestiranosti ektoparazitom *Varroa destructor*

Osim toga, varoa utiče negativno na ekspresiju i drugih gena kao što je ekspresija profeniloksidaza (PPO). Kod pomenutog gena ishrana polenom nije imala uticaja na njegovu ekspresiju (s obzirom PPO kao i mnogi drugi geni nisu predmet našeg ispitivanja, efekti ishrane i drugih faktora na njihovu ekspresiju neće se dublje analizirati). Prihrana polenom (i prisutnost varoe) može uticati na celokupnu fiziologiju upravo preko ekspresije gena što dalje utiče na biogenezu ribozoma, oksidativne fosforilacije, lipidne digestistije, kataboličkih i anaboličkih procesa, rasta ćelija itd. (Alaux i sar., 2011). Tako je, na primer, ispitivan i efekat aminokiselinsko-vitaminskog suplementa “Beewell AminoPlus” na pčele praćenjem ekspresije gena za imune peptide (abecin, defensin, himenoptecin, apidecin i vitelogenin). Pčele su bile eksperimentalno inficirane sporama endoparazita *Nosema ceranae*, zbog problema koji ta mikrosporidija nanosi pčelarstvu širom sveta i odsustva načina njenog suzbijanja. Utvrđeno je da suplement “Beewell AminoPlus” modifikuje ekspresiju gena značajnih za imunitet kada se daje pčelama čiji je imunitet kompromitovan pomenutim endoparazitom, čime je dokazana mogućnost uticaja dodatka hrani na ekspresiju gena, uključujući gen za vitelogenin (Glavinic i sar., 2017).

⁴ Pčele bez polenske prihrane i bez varoe V-P- , pčele sa polenskom prihranom bez varoe V-P+, pčele zaražene varoom bez polenske prihrane V+P-, pčele zaražene varoom sa polenskom prihranom V+P+

Prema *Amdam i sar.* (2003) parazit *Varroa destructor* umanjuje kapacitet skladištenja vitelogenina što ima ozbiljan uticaj na prezimljavanje. Nasuprot gore navedenim studijama od strane *Alaux i sar.* (2011), kao i drugih studija (*Belles, 2003*), studije objavljene od strane *Guidugli i sar.* (2005b) ukazuju da na osnovu citoloških studija u jajnicima larvi odraslih *A. mellifera* matica (*Fleig, 1995*) folikularne ćelije jajnika učestvuju u proizvodnji Vg. Međutim, *northern blot* analizom *Guidugli i sar.* (2005b) su ustanovili da je nivo vitelogenina u jajniku odraslih matica niži, u poređenju sa nivoom vitelogenina u masnom telu. Za razliku kod matica, *Guidugli i sar.* (2005b) nisu uspjeli da otkriju vitelogensku iRNK u tkivu jajnika pčela radilica.

Nedavna istraživanja su pokazala da organofosfatni akaricid kumafos i neonikotinoidni insekticid imidakloprid imaju negativan uticaj na vitelogenin i heksamerin 70b kod matica kako jedan dan nakon tretmana, tako i sedam dana nakon tretmana (dok kod radilica nisu ostvarili takav efekat). Stoga, navedeni pesticidi kod matica mogu dovesti do skraćanja života, smanjenja reproduktivne sposobnosti i povećanja oksidativnog stresa, a posledično, zbog neuspeha matice, i do gubitka čitavog društva (*Chaimanee i sar., 2016*).

Među brojnim faktorima koji doprinose gubicima pčelinjih društava i problemima u pčelarstvu, često se navode pesticidi i *Nosema ceranae*, naročito ako deluju istovremeno. Zbog toga je ispitivana ekspresija 17 gena za imunitet i detoksifikaciju gena (uključujući vitelogenin) pod uticajem fungicida prohloraza i *N. ceranae*. Najveće promene u genskoj ekspresiji zabeležene su kod novoizleženih pčela poreklom iz društava koja su prethodno kontaminirana prohlorazom. Samo je povećanje ekspresije zabeleženo, što ukazuje da je ovaj fungicid dovoljno jak stresor koji kod pčela izaziva aktivaciju imunih puteva. Udruženo delovanje oba stresora (prohloraza i infekcije sa *N. ceranae*) je bilo najizraženije kod odraslih pčela starih 6 dana. Od 17 praćenih gena za imunitet i detoksifikaciju, deset je imalo statistički značajno promenjenu ekspresiju (uključujući vitelogenin). Zaključeno je da hrana zagađena prohlorazom koja dospeva u telo pčela dok su one u larvenom stadijumu štetno utiče na njihov imunitet i mehanizme detoksifikacije (*Glavinic i sar., 2019*). Na sličan način je ispitivan efekat insekticida tiametoksama i *N. ceranae*, samo što je praćena ekspresija 19 gena značajnih za imunitet pčela, detoksifikaciju, razvoj i apoptozu (uključujući vitelogenin). Značajne promene u ekspresiji većine praćenih gena (u odnosu na

kontrolu) zabeleženi su nakon 9. i nakon 15. dana od momenta zaražavanja nozemom, pri čemu je povećanje bilo statistički značajno kada su u pitanju geni za imunitet *abaecin*, *defensin-1* i *defensin-2* nakon 9. dana, dok je nakon 15. dana ekspresija većine gena za detoksifikaciju bila smanjena. Utvrđeno je da tiametoksam i *N. ceranae* imaju negativan sinergistički efekat na pčele (*Tesovnik i sar., 2019*). Navedena ispitivanja jasno ukazuju na efekat kako pesticida, tako i parazita *N. ceranae* na ekspresiju gena kod pčela.

Radilice i matice poreklom su od istog genoma, s tim što matice žive deset puta duže (*Page i Peng, 2001*). Koji je mogući uzrok ovakve razlike!? Razlike između radilica i matice se ne ogleda u genotipskoj razlici već u različitim ekspresijama istog genoma. Direktni dokazi o morfo-specifičnoj genskoj ekspresiji, predstavlja osnovni korak u razjašnjavanju mehanizama i evolucije fenotipske raznovrsnosti proisteklih od strane jednog genoma (*Corona i sar., 2005*). Juvenilni hormon, koji igra važnu ulogu u određivanju kasta kod pčela, čini se da je opšteprihvaćen, mada svakako ne univerzalan, posrednik širokog spektra polifenizama kod insekata. Studije ekspresije gena treba da pomognu u razjašnjavanju mehanizama pomoću kojih juvenilni hormon i slični agensi utiču na različite razvojne programe bipotentnih larvi (*Evans i Wheeler, 1999*).

Ekspresije gena ne zavise samo od ishrane već i od dela tkiva u kome se date ćelije nalaze i starosti organizma. Tako je prema pomenutim autorima utvrđena razlika u ekspresiji trinaest⁵ ispitivanih gena kod pčela i matice gde su jednodnevne matice imale značajno više iRNK⁶ za antioksidativne gene nego što su imale radilice iste starosti, dok je nivo iRNK za respiratorno-odgovorne gene kod matice značajno opadao tokom starenja, pa je između matice starih jedan dan i matice starih jednu godinu razlika bila i do 20 puta u ekspresiji tih gena u toraksu dok nije došlo do razlika u mozgu i abdomenu.

Prelazak kućne pčele u izletnicu je povezan sa smanjenjem koncentracije vitelogenina i povećanjem koncentracije juvenilnog hormona (JH) (*Bloch i sar., 2002; Amdam i Omholt 2003*). JH je kontrolor vitelogenske ekspresije i ponašanja pčela, a na nivo JH, između ostalog, utiče sezona i demografija zajednice (*Huang i Robinson, 1995*,

⁵ meren je nivo iRNK za osam gena koji kodiraju najvažnije elemente antioksidativnog sistema i pet gena koji kodiraju mitohondrijalne proteine koji su uključeni u respiratornu funkciju

⁶ iRNK je produkt aktivnog gena, pomoću kojeg se indirektno izračunava ekspresija nekog gena. Zapravo aktivan hromatin dozvoljava DNK transkripciju, što je gen aktivniji to će se više iRNK proizvesti

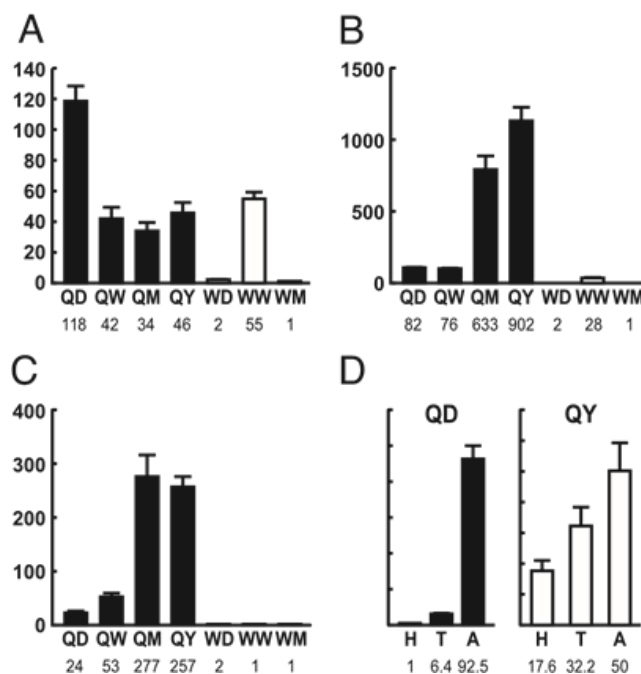
1996). Utišavanjem ekspresije vitelogenina prouzrokuje značajno povećanje juvenilnog hormona (*Guidugli i sar., 2005a*). Plastičnost društva (i pčele kao jedinke) ukazuje na to da JH potencionalno funkcionira kao *pacemaker* u načinu ponašanja pčela. Pčelama kojima je izvađena žlezda *corpora allata* (CA) ukazuju da JH nije jedini regulator modela ponašanja pčela (*Sullivan i sar., 2000*). Vitelogenin je glavni nosač cinka (Zn) u hemolimfi a koncentracija Zn u plazmi izletnica je značajno manja u poređenju sa pčelama negovateljicama (*Amdam i sar., 2004*).

Ukoliko larva od njenih sestara⁷ umesto radiličnog, dobija matični mleč, dolazi do metaboličkog ubrzanja i povećanog rasta podstaknutih globalnim ali relativno suptilnim promenama u ekspresiji velikog broja sveprisutnih gena (*Kucharski i sar., 2008*). Jedan od sastojaka matičnog mleča, fenil butirrat, je poznati inhibitor histon deacetilaze i regulator rasta, koji dovodi do poboljšanih kognitivnih sposobnosti kod miševa (*Burzynski i sar., 2008*) i povećanju dužine života *Drosophila* (*Kang i sar., 2002*). Iako značaj fenilbutirata u matičnom mleču još nije shvaćen, moguće je da se ova složena materija (mleč) razvila da bi obezbedila dve važne funkcije kod medonosnih pčela: da služi kao izvor hranljivih materija za razvoj i da služi kao regulator epigenetičkih mreža koje kontrolišu ekspresiju gena u mozgu. Smatra se da ova specijalizovana ishrana utiče na određenu hemijsku modifikaciju, metilaciju, pčelinjeg DNK, što uzrokuje da isti genom bude ispoljen drugačije. U mozgu, osim gustine sinaptičkih veza, preko 550 gena (*Lyko i sar., 2010*) pokazalo je značajne razlike u metilaciji između matica i radilica, što može doprineti dubokoj divergenciji u ponašanju (*Lyko i sar., 2010*).

Vitelogenin kod medonosne pčele je glikoprotein od 180-kDa sintetisan u ćelijama masnog tela i oslobođen u hemolimfu. Nativni vitelogenin je glikolipoprotein veoma visoke gustine koji sadrži približno 91% proteina, 7% lipida i 2% ugljenih hidrata (*Wheeler i Kawooya., 1990*). Juvenilni hormon (JH), gonadotropin, reguliše vitelogenezu kod insekata (*Robinson i Vargo, 1997*) i kod radilica titar JH je nizak tokom prvih 2-3 nedelje adultnog života (tokom ishrane i negovanja legla) a visok u kasnijim fazama (tokom sakupljačkih aktivnosti). Nasuprot njemu, titar vitelogenina ima suprotni obrazac (*Hartfelder i Engels, 1998*).

⁷ U pčelinjem društvu postoje polu-sestre i „super“ sestre

Na grafikonu (grafikon 3) su prikazani nivoi ekspresije gena za Vg u različitim delovima tkiva, u zavisnosti od kasta.



Grafikon 3. Tkivno specifična analiza Vg iRNK nivoa u maticama i radilicama⁸
(Corona i sar., 2007)

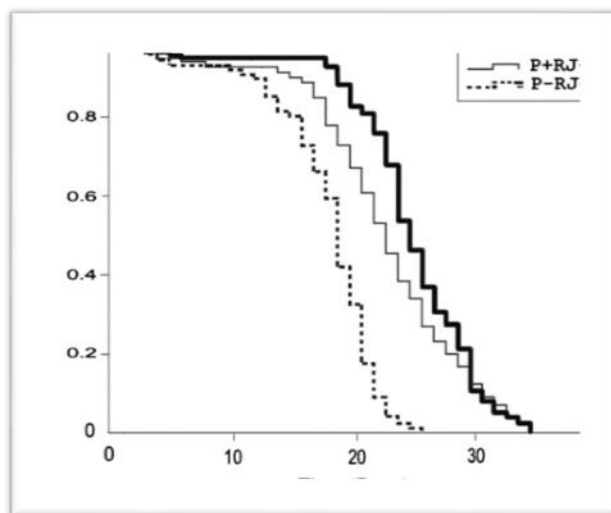
Vrednosti Vg iRNK nivoa u maticama i radilicama se razlikuju kako pri različitom uzrastu, tako i u različitim tkivima. Koncentracija abdominalne Vg iRNK je najviša kod jednodnevnih matica, dok je u kasnijim fazama nivo opao na ~1/3 tog nivoa. Kod radilica koncentracija Vg iRNK je mnogo dinamičnija. Zapravo koncentracija je bila veoma niska kod jednodnevnih radilica, dok se tokom narednih nedelju dana povećala 25 puta. Kod radilica koje su bile stare mesec dana nivo Vg je opao 50 puta, što je bilo neznatno iznad granice detekcije (Corona i sar., 2007). Glava i torakalni deo značajno doprinose ukupnoj Vg iRNK. Prema navedenim autorima procenjena transkripcija gena za Vg u glavi i grudima čini 25% ukupne transkripcijske aktivnosti, dok su, među svim tkivima, jajnici zabeležili najveći nivo.

⁸ Puni stubovi predstavljaju matice: QD-jednodnevne, QW-stare nedelju dana QM- stare mesec dana QY- stare godinu dana

Prazni stubovi predstavljaju radilice: WD-jednodnevne, WW- stare nedelju dana WM-stare mesec dana y- osa predstavlja relativnu koncentraciju Vg iRNK u abdomenu (A), toraksu (B) i glavi (C); procentualni udeo Vg iRNK po segmentima tela (D)

QD i QW nesparene, QM i QY sparene, WW negovateljice i WM sakupljačice.

Ekspresija gena za Vg je i pod uticajem ishrane. U eksperimentu *Wang i sar.* (2014) formirana su tri kaveza sa ~200 mladih pčela (21g pčela). Sva tri kaveza pčela hranjena su različitim tipom hrane nakon čega je praćena dinamika Vg (grafikon 4).



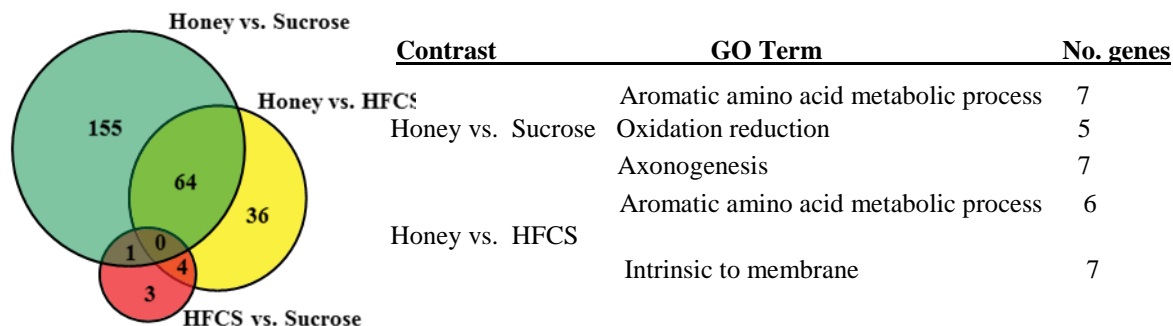
Grafikon 4. Dinamika Vg tokom različite ishrane (*Wang i sar.*, 2014)

Pčele koje su hranjene polenom i matičnim mlečom zajedno (P + RJ +) i pčele koje su hranjene samo polenom (P + RJ-) imale su veću ekspresiju gena za Vg od pčela hranjenih bez polena i matične mleči (P-RJ-). Pčele koje su hranjene polenom i matičnim mlečom zajedno (P + RJ +) takođe su imale veći nivo ekspresije gena za Vg od pčela hranjenih samo polenom (P + RJ-) (*Wang i sar.*, 2014).

Stalno snabdevanje šećerom je naročito važno za hranjenje pčela izletnica, jer se njihova ishrana uglavnom bazira na ugljenim hidratima (*Crailsheim i sar.*, 1992). Izletnice tokom perioda kućnog života izgube preko polovinu svojih abdominalnih lipidnih rezervi (*Toth i Robinson*, 2005). Iz navedenih razloga jasna je potreba pčelara za obezbeđivanje dodatnih ugljenih hidrata u raznim oblicima. U stranim zemljama jedna od veoma čestih prihrana (osim meda i saharoze) je prihrana u obliku visoko-fruktoznog kukuruznog sirupa (HFCS⁹). HFCS ima odnos fruktoze-glukoze sličan medu, i najčešća formulacija prilikom prihrane medonosne pčele predstavlja 55% fruktoze i 42% glukoze (*Hanover i White*, 1993). *Wheeler i Robinson* (2014) su se fokusirali na efekte ishrane različitih ugljenih hidrata na ekspresiju gena kod pčela starih

⁹ HFCS- engl. high fructose corn syrup, jeftiniji je od saharoze, i manje napora zahteva za pripremu jer je u tečnom stanju

18-21 dan. Tokom ogleada ispitivala se konzumacija medom, HFCS, i saharoznim sirupom (konzumacija prema navedenom redosledu iznosila je 0,040, 0,036 i 0,032 g/pčeli/danu). Takođe i mortalitet u ispitivanim grupama je bio sličan od 0-7%. Iako konzumacija i mortalitet nisu bili značajno različiti, čitava raznolikost i nepodudarnost između hrane i pčela se javila na nivou gena (slika 1).



Slika 1. Razlika u genskoj ekspresiji u masnim tkivima pčela radilica usled različite ishrane (Wheeler i Robinson, 2014)

Rezultati pokazuju da je došlo do razlike u ekspresiji 104 gena kod pčela hranjenih medom ili HFCS-om i 220 gena različito ispoljenih između pčela koje su hranjene medom ili saharozom. Nasuprot tome, razlike između HFCS i saharoze su bile mnogo manje, sa ukupno 8 različitih gena. S obzirom da su u radu korišćene radilice od veštački osemenjene matice sa jednim trutom, gde je koeficijent srodstva među radilicama 0,75, navedene razlike u rezultatima govore da ishrana ima jak uticaj na ekspresiju gena. Med je, za razliku od saharoze i HFCS, uticao na povećanu regulaciju i aktivnost gena zaduženih za metabolizam proteina i oksidativnu redukciju, što implicira da med izaziva određene specifične fiziološke promene u poređenju sa drugim prihranama. Dakle, određene materije iz meda drugačije regulišu fiziološke procese i prema izloženom saharozu i HFCS verovatno nisu dobre ekvivalentne zamene meda pri ishrani pčela (Wheeler i Robinson, 2014).

Kod visoko socijalnih insekata, jedna ili nekoliko visoko-plodnih matice uglavnom monopoliziraju reprodukcijom čitavog društva, dok su radilice subfertilne ili čak potpuno sterilne. Na regulisanje sinteze vitelogenina u ovim alternativnim fenotipovima ukazuju nekoliko studija kako bi se promovisalo razumevanje mehanizama koji su osnova za uspostavljanje hijerarhijske dominacije reprodukcije

(Barchuk i sar., 2002). Samo u tragovima, vitelogenin je detektovan kod matica deset sati pred njenim izvođenjem, nakon čega se naglo povećavao. Kod radilica, značajan vitelogeninski titar otkriven je tek nekoliko dana nakon izvođenja (Engels i sar., 1990). Hormonska regulacija sinteze vitelogenina kod pčela i dalje je nejasna u mnogim detaljima. Primena malih doza juvenilnog hormona kod odraslih radilica dovela je do povećanja nivoa vitelogenina, dok su visoke doze ovog hormona ili njegovih sintetičkih analogi inhibirali ovaj odgovor. Nasuprot tome, juvenilni hormon nije imao efekta na nivo vitelogenina kod odraslih matica (Engels et al., 1990). Posle eklozije, hemolimfa matice sadrži male količine vitelogenina, međutim, titar brzo raste na 70% ukupnog proteina hemolimfe. Nakon sparivanja, titar vitelogenina se blago smanjuje, očigledno zbog toga što je započela vitelogeneza. Ako se sprečava let za sparivanje, titar vitelogenina nastavlja da raste do 90% ukupnog proteina. Isto se dešava ako se prekida proizvodnja jaja (Engels, 1974). Kod radilica, proizvodnja vitelogenina se progresivno smanjuje i završava oko 20 dana adultnog perioda (Engels, 1987). Kod matica, vitelogenin se prvi put pojavljuje u braon fazi očiju sa srednje pigmentiranom kutikulom, dok se kod radilica vitelogenin kasnije pojavljuje u fazi tamne kutikule gde lutka ima izgled adulta. Drugim rečima, vitelogenin se prvi put pojavljuje kod matica otprilike 60 časova, a kod radilica oko 10 časova pre izvođenja (Barchuk i sar., 2002).

Gen za vitelogenin tj. cDNK *Apis mellifera* je kloniran i sekvenciran. cDNK je duga 5440 bp i sadrži ORF¹⁰ od 1770 aminokiselina, i poređenjem sekvenci najbližiji je vitelogeninu drugih *Himenoptera*-e (sličnost ~ 58%) dok je najmanje sličan vitelogeninu bubašvaba (sličnost ~ 32%) (Piulachs i sar., 2003). Prema istim autorima se navodi da je kod matica iRNK vitelogenina najpre detektovana u stadijumu rane-srednje faze lutke, dok je kod radilica prvi put detektovana u kasnoj fazi lutke.

Sem kod matica i radilica, iRNK vitelogenina detektovana je i kod trutova 4. dana starosti, dok 11. dana odraslog truta nije bilo moguće detektovati (Piulachs i sar., 2003). Vitelogenin je kod insekata uključen u transport šećera, lipida, fosfata, vitamina i hormona (Chen i sar., 1997; Sappington i Raikhel, 1998), što je verovatno razlog njegovog prisustva kod trutova.

¹⁰ engl. *open reading frame*, deo kodonskih sekvenci koji se „čita“ i koji potencijalno može započeti translaciju

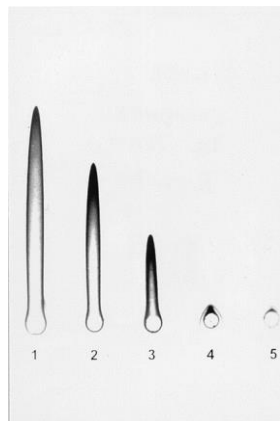
Prema *Chen i sar.*, (1997) vitelogenin (Vg) je veliki fosfolipoprotein (200-700 kDa¹¹) koji služi kao glavni sastojak žumanca kod gotovo svih oviparnih životinja. Vitelogenin se sintetise u ekstraovarijalnom tkivu, potom izlučuje u cirkulatorni sistem, a zatim se ugrađuje u oocite putem endocitoze. Vg se sintetise u masnom telu, funkcionalnom ekvivalentu jetre kičmenjaka (*Byrne i Gruber, 1989*). Filogenetska rekonstrukcija Vg, bazirana na identičnosti i komparaciji sekvenci, ukazuje na to da je serumski protein sisara, apolipoprotein B-100, nastao od nekadašnjeg pretka nakon evolutivnog raskršća sa kičmenjacima (*Chen i sar., 1997*). Lipidi, proteini i ugljeni hidrati čine približno 62%, 35% i 3% (po navedenom redosledu) od ukupnih procenjenih depoa u masnom tkivu matice i oko 72%, 22% i 6% (po navedenom redosledu) kod radilica. Razvoj ovarijuma je praćen velikim padom lipida u masnom telu, i značajnim porastom proteina u masnom telu. Kod matice, koncentracije proteina masnog tela su niske tokom letnje nosivosti, uz stalno povećavanje u periodu od novembra do aprila, a zatim naglog pada tokom aprila i maja (*Shehata i sar., 1981*).

Određivanje koncentracije proteina (ili vitelogenina) u hemolimfi pčela veoma je pouzdan metod za procenu kvaliteta i efikasnosti proteinske prihrane, polena kao i nekih drugih zamena. Prema tome, ukoliko bi se analizom utvrdilo da pčele imaju nizak nivo proteina (što usporava rast društva i njihovu sposobnost održavanja) proizvođačima bi preostale dve opcije, selidba društava na novu lokaciju sa izdašnjim uslovima ili započeti sa određenim prihranama da se nadoknadi smanjen nivo proteina. Mlade pčele imaju visok titar proteina u hemolimfi zbog potrošnje i konzumacije polena radi ishrane i nege legla. Kako pčele stare i menjaju svoje aktivnosti, potreba za proteinima se menja u potrebu za ugljenim hidratima usled predstojećih izletničkih aktivnosti (*Nachtigall i sar., 1989*). Vitelogenin čini 40% ukupnog proteina koji se nalazi u hemolimfi mladih pčela 15 dana starosti, iako pčele mlađe od 3 dana gotovo nemaju vitelogenin (*Engels i sar., 1990*). Nizak procenat polena ili odsustvo ovog prirodnog izvora proteina u ishrani pčela dovodi do smanjenja ukupnog proteina i vitelogenina u hemolimfi (*Bitondi i Simoes, 1996*).

Količina proteina i vitelogenina pri izvođenju radilica (nulti dan) je blizu nule, i obično počinje da raste tokom trećeg i četvrog dana, dostižući maksimum krajem prve nedelje do 15-20 dana, nakon čega ponovo opada (*Nachtigall i sar., 1989*). Iz navedenih

¹¹ Jedinica molekulske mase sastavljena od 1000 daltona (jedinica vodonikove mase)

razloga, kaveznim eksperimentom sa 140 pčela, *Cremonz i sar.* (1998) su ispitivali kvantifikaciju proteina u hemolimfi kao brze metode za analizu kvaliteta prihrane kod mladih pčela 0-6 dana (slika 2).



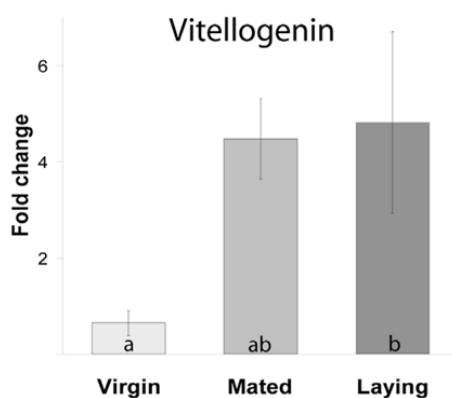
Slika 2. Vitelogeninski vrhovi dobijeni imunoelektroforezom hemolimfe šestodnevnikih radilica *A. mellifera* usled različite prihrane¹² (*Cremonz i sar.*,1998)

Vitelogenska ekspresija je otkrivena u visokom nivou tokom ranog razvoja pčela radilica (druga, treća i četvrta larvena faza), nakon čega je došlo do smanjenja u petoj (poslednjoj) larvenoj fazi i tokom stadijuma predlutki. U periodu lutki ekspresija nije detektovana (u prvim ranim fazama lutki), nakon čega se ponovo povećala u kasnijim fazama (*Guidugli i sar.*, 2005b). Poražavajuća činjenica, navedena od strane istih autora, govori nam da poređenjem dobijenih podataka o iRNK i Vg ukazuju da nema jasne korelacije između oba parametra u određenim fazama razvoja pčela. Tako na primer, u četvrtoj fazi larve, visoki nivoi iRNK odgovaraju vrlo niskim količinama Vg, što ukazuje na postojanje mehanizama prevođenja i / ili opšte (ne)stabilnosti vitelogenina i iRNK.

Merenje sadržaja proteina ili vitelogenina u hemolimfi odraslih pčela je korisna, brza, praktična i precizna metoda za određivanje pogodnosti alternativnih proteinskih prihrana. Razlike između različitih ishrana bile su najizraženije u šestodnevnikim pčelama, gde je pčelinji hleb ispoljio najbolje rezultate. Nasuprot tome, dokazano je da je šećerni sirup signifikantno redukovao titar vitelogenina u hemolimfi radilica kao i ukupnu količinu proteina (*Cremonz i sar.*, 1998).

¹² 1 - pčelinji hleb; 2 - soja/kvasac; 3 - polen ; 4 - kukuruzni sirup; 5 - saharoza

Akt sparivanja prouzrokuje kratkoročne, tako i na dugoročne modifikacije kod pčelinjih matica. Pri sparivanju dolazi do niza promena u fiziologiji, ponašanju, feromonskom statusu, aktiviranju jajnika i sl. Velike promene se dešavaju i u mozgu matica, gde u pečurkastim telima dolazi do smanjenja „kenyon“ ćelija za 30% dok se neuropil povećava za 25-50%¹³ (*Fahrbach i sar., 1995*). Nivo dopamina i njegovih metabolita takođe se smanjuju nakon sparivanja (*Harano i sar., 2005*). Promene u ponašanju, između ostalog, se ogledaju u tome da su nesporene matice foto privlačne, za razliku od sporenih matica koje ostaju u zajednicama dalje od svetlosti (*Winston, 1987*). Pored nabrojanih promena, promene koje su od važnosti za našu problematiku jesu promene u ekspresiji gena. Tako su *Kocher i sar. (2008)* ispitivali promene u ekspresiji gena za vitelogenina kod nesporenih, sporenih (koje još nisu pronele) i pronelih matica (slika 3).



Slika 3. Nivo vitelogenina u masnom telu nesporenih, sporenih i pronelih matica (*Kocher i sar., 2008*)

U istom istraživanju utvrđena je značajna razlika između nesporenih i pronelih matica u nivoima vitelogenina u masnom telu, ali nije postojala značajna razlika u količini RNK između sporenih i pronelih matica i nesporenih i sporenih. Nivoi vitelogenina bili su pozitivno korelirani sa razvojem jajnika ($r = 0,46$) (*Kocher i sar., 2008*).

¹³ Pečurkasta tela su najvažniji asocijativni-olfaktorni centri, delovi neurona zajedno sa glijalnim ćelijama čine neuropil

3. Cilj rada

Ciljevi ovog rada su:

- Ispitivanje uticaja četiri načina ishrane odgajivačkih društava na:
 - prijem matičnjaka;
 - kvalitet matičnjaka (preko njegove tri dimenzije (dužina, širina i dijametar otvora matičnjaka));
 - težinu dobijenih novoizleženih matica;
 - mase sparenih matica;
 - težinu jajnika;
 - broj jajnih cevčica;
 - dijametar spermateke;
 - proizvodno-reproduktivne osobine kod sparenih matica (preko kompaktnosti legla i broja proizvedenih pčela).
- Poređenje kvaliteta rojidbenih i komercijalno dobijenih pčelinjih matica preko sledećih morfološko-reproduktivnih parametara: mase matica, težine jajnika, broja jajnih cevčica, dijametra spermateke i proizvodno-reproduktivnih osobina (kompaktnosti legla i broja proizvedenih pčela).
- Poređenje nivoa ekspresije gena za vitelogenin između tretman grupa i kontrolne grupe.
- Analiza ekspresije gena za vitelogenin između razvojnih stadijuma pčelinjih matica: jajeta (1-3 dana), larve (4-5 dana), predlutke (9-11 dana), lutke (12-14 dana), jednodnevne matice i jajnika sparenih matica u kontrolnoj (N) grupi.
- Poređenje nivoa ekspresije vitelogenina u jajnicima matica dobijenih u grupama komercijalnog načina odgoja (četiri tipa ishrane) i matica izvedenih iz rojidbenih matičnjaka.

4. Materijal i metod rada

Ogled je sproveden u okolini Beograda ("Makiš" region, 44° 44' 36,60" severne geografske širine; 20° 19' 44,50" istočne geografske dužine i „Bele vode“, 44° 44' 18.38" severne geografske širine; 20° 23' 25.83" istočne geografske dužine) sa lokalizovanom rasom *Apis mellifera carnica*. Za kranjsku rasu pčela u Srbiji je u upotrebi naziv domaća karnika (*Mladenović i sar., 2007; Nedić i sar., 2009; Rašić i sar., 2009a, Stevanović i sar., 2010; Muñoz i sar., 2012*). Formirano je po pet odgajivačkih društava u kojima su se proizvodili matičnjaci u četiri ispitivane grupe, kao i peta, rojodbena grupa.

Pre početka eksperimenta, sva društva koja su učestvovala u proizvodnji matičnjaka (osim rojidbenih) su ujednačena po snazi. Prema *Delaplane i sar. (2013)* postoje dva načina ujednačavanja. Prvi način je objektivni način koji koristi empirijske mere, dok je drugi način subjektivni metod koji se oslanja na vizuelnu procenu od strane jednog ili više posmatrača. U našem slučaju sistem ujednačavanja se bazirao na objektivnom načinu, gde su sva društva bila na dva Langstroth-Roth (LR) standardna nastavka, zaposednuta pčelama, gde je u prvom, kao i u drugom nastavku, bilo po 4 rama legla. Svi ramovi koji su sadržali hranu, izvađeni su iz društava a izvađeni ramovi nadomešteni su sa praznim izgrađenim saćem. Ramovi sa leglom su centrirani u oba nastavka, dok su preostali prazni ramovi dopunjeni sa obe strane. U gornjem nastavku, s obzirom na ram hranilicu, bilo je ukupno 8 ramova (4 sa leglom i 4 prazna). Nastavci su bili predvojeni matičnom rešetkom kako bi se ograničio pristup matice u gornjoj zoni (pozicija matičnjaka).

Varijacija usled različite genetike pčela svedena je na najmanju moguću meru tako što su sva odgajivačka društva posedovala jednogodišnje matice (međusobno polu/super sestre), proizvedene od iste majke rodonačelnice, koje su bile prirodno sparene na istom sparivalištu, u isto vreme.

Svi spoljni faktori koji imaju uticaja na potencijalnu superiornost ili inferiornost pojedinih košnica svedeni su na najmanju moguću meru na način što su društva, sem što su smeštena u LR košnicama, bila naseljena na paviljonu-kontejneru specijalizovanom samo za proizvodnju matičnjaka (slika 4). Na ovaj način negativni uticaj letnje dnevne insolacije košnica (posebno ukoliko su košnice tamnije), pozicija košnica, kao i noćna

temperaturna variranja su potpuno ujednačena kod svih proizvodnih društava. Paviljon-kontejner pruža ujednačenu mikroklimu, temperaturu i vlagu tokom proizvodnje matičnjaka.

Pri oduzimanju hrane, sva društva su dobijala prihranu koja je trajala 10 dana pre, i 5 dana nakon presađivanja (do poklapanja matičnjaka). Tokom veštačke proizvodnje matičnjaka društva su prihranjivana različitom hranom. U ispitivanju su bila uključena tri tipa ishrane:

- Ishrana 1. Šećerni sirup (1:1 šećer : voda) i šećerna pogača bez dodataka, tzv. „0“ pogača (S grupa).
- Ishrana 2. Šećerni sirup sa dodatkom 30% meda i 25% polena i šećerna pogača sa dodatkom 25% polena (P grupa).
- Ishrana 3. Šećerni sirup sa dodatkom zamene za polen pod komercijalnim nazivom suplementa FeedBee® (Nutrifeed, Canada Inc.) i šećerna pogača sa dodatkom istog suplementa (F grupa) (prema proizvođačkoj specifikaciji).
- Ishrana 4. Bez prihrane, ostavljena na sopstvenim rezervama, kontrolna grupa (N grupa).

Feedbee® je komercijalno dostupan preparat za koga proizvođač (Bee Processing Enterprises Ltd., Toronto, Ontario, Canada, <http://www.feedbee.com/>) navodi da je “veoma ukusna, nutritivno izbalansirana, visoko efikasna zamena za polen u ishrani medonosne pčele”. Proizvođač takođe navodi da je Feedbee® 100% biljnog porekla (tačan sastav / receptura predstavljaju poslovnu tajnu), da ne sadrži soju ni proizvode od soje, polen, proizvode pčela ili drugih životinja, GMO, hemijska sredstva, antibiotike niti bilo koje druge lekove, kao ni veštačke boje, arome ili konzervanse.

Nutritivni sastav preparata Feedbee® koji je dao proizvođač (36,4% proteina, 3,9% masti, 41,8% ugljenih hidrata u vidu dijetarnih vlakana, 10,0% šećera koji je 100% prirodnog porekla i 3,1% minerala) potvrdili su *Saffari i sar.* (2010), koji su obavili detaljnije analize preparata Feedbee® i utvrdili sledeće nutritivne karakteristike:

- Proteini 36.4%
- Vlažnost 4.8%
- Masti 3.9%
- Suvi ostatak 3.1%

- Ugljeni hidrati 51.8%
- Energetska vrednost 388 kcal/100g
- Vitamin A 181 IU/100g
- β Karoten 1770 IU/100g
- Gvožđe 12.8 mg/100g
- Arginin 0.934%
- Histidin 0.443%
- Izoleucin 0.606%
- Leucin 1.561%
- Lizin 1.180%
- Metionin 0.405%
- Fenilalanin 1.127%
- Treonin 1.032%
- Triptofan 0.221%
- Valin 0.854%

Ishrana odgajivačkih društava je u prvih deset dana bila forsirana i bez ograničavanja pristupa. Svakodnevno se dodavalo pola litra sirupa u ram hranilice i pola litra sirupa u plastične hranilice smeštene preko satonoša (slika 6). Na ovaj način društvima je obezbeđena brza dopuna zaliha koje su prethodno bile oduzete. Po presađivanju, primenjivao se drugi sistem prihrane tečne hrane. Pristup hrani bio je ograničen tako što je hrana dodata u kese koje su posedovale jednu rupu koja je onemogućavala brzu konzumaciju. Na taj način obezbedio se kontinuitet za sve vreme nege matičnjaka (narednih pet dana) bez dodatog stresa pri svakodnevnom otvaranju i dodavanju hrane. Ujedno, negovanje matičnjaka uz ovakvu prihranu omogućava manje uznemiravanje društava što povoljno utiče na ishranu matičnih larvi (slika 5, slika 6).



Slika 4. Kontejner za proizvodnju matičnjaka



Slika 5. Prihrana odgajivačkih društava

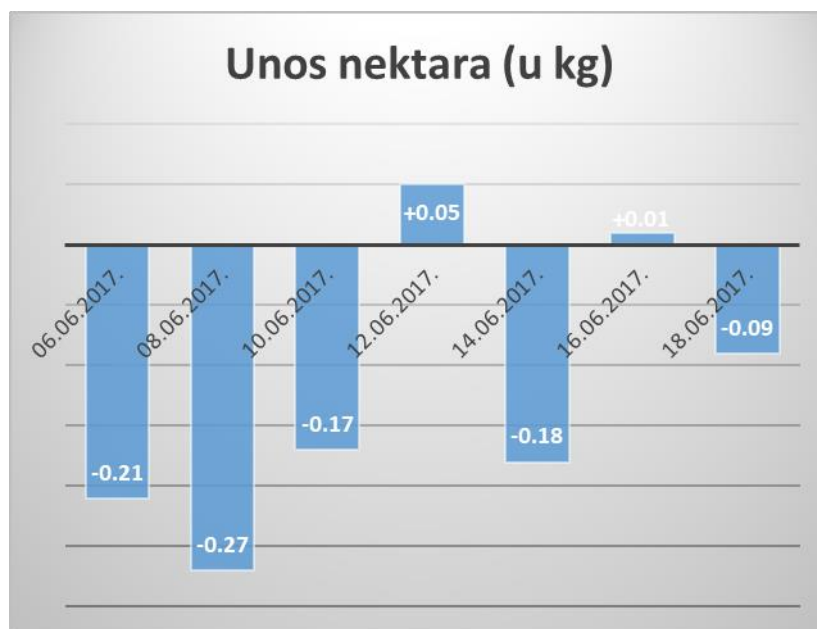


Slika 6. Hrana u kesama

Sem tečne, odgajivačka društva su imala pogače od 250 grama, koje su, po potrebi bile dodavane tokom prvih deset dana (*ad libitum*). Poslednjih pet dana, od dana

presađivanja, pogače su date jednokratno bez njihove zamene i dopune. Količina konzumiranja pogača nije merena.

Prihrana odgajivačkih društava vršena je u prvom delu juna tokom bezpašnog perioda. Tokom oglada korišćene su dve SMS vage postavljene na srednje jakim zajednicama (nisu bile korišćene za presađivanje) (grafikon 5). Sem negativnog unosa, sva društva (osim kontrolnih i rojidbenih) imale su uključene sakupljače polena. Prethodno oduzeta hrana, bespašni period, i oduzimanje polena pomoću sakupljača, pojačalo je uticaj veštačke prihrane pri planskoj proizvodnji matičnjaka tokom sprovedenog oglada.



Grafikon 5. Unos nektara pre i nakon presađivanja

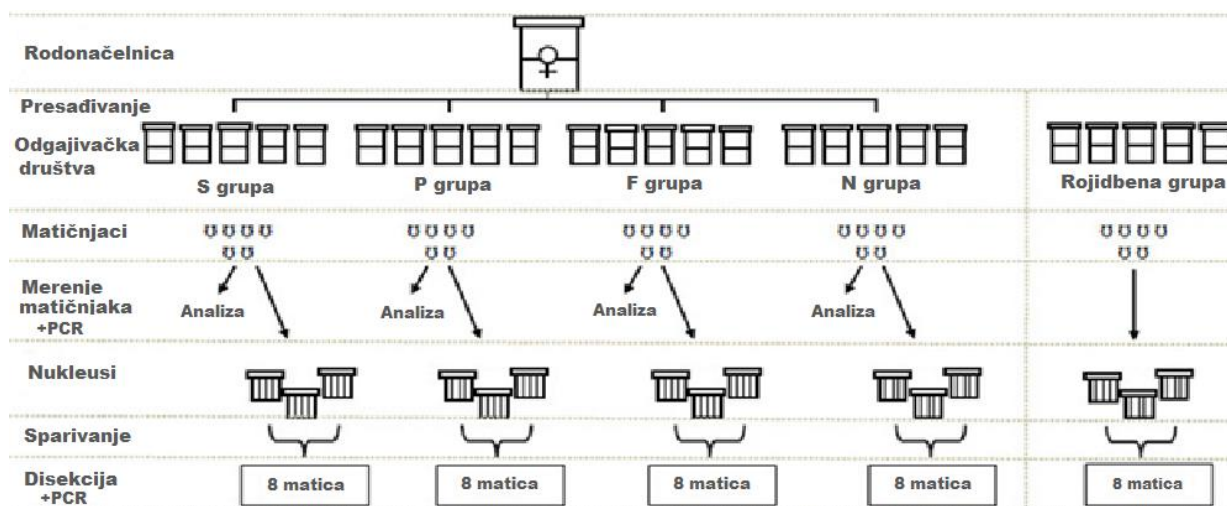
Presađivanje je rađeno u dva navrata (12. i 13. juna) da bi se obezbedio dovoljan broj optimalnih larvi poreklom od jednog rama. Sve larve za presađivanje bile su poreklom od jedne matice koja je prethodno bila ograničena u ram izolatoru. Svih dvadeset odgajivačkih društava (po pet društava u četiri grupe) imala su podjednak broj (24) presađenih matičnjaka. Pored navedenog plana presađivanja, presađeno je po jedno dodatno društvo (pripremljeno na isti način) u svakoj grupi, koje dalje nije statistički obrađivano (rezerva).

Dakle, pored navedenih četiri grupa, gde su se veštačkim putem proizvodili matičnjaci, ispitivani su i prirodno dobijeni matičnjaci - peta grupa. Kod prirodno

dobijenih (rojidbenih) matica, analiziran je samo stadijum sparenih matica. Tokom rojidbenog perioda (maj-jun) oduzimali smo rojidbene matičnjake od društava koja su, bez antropološkog uticaja, ušla u rojidbeni nagon. Matičnjake smo dodavali u oplodnjake za potrebe dobijanja rojidbenih matica. Za razliku od veštački dobijenih matičnjaka, prirodni matičnjaci nisu poticali poreklom od jedne matice. Dalji postupak sa prirodno dobijenim matičnjacima bio je isti kao i sa veštački dobijenim.

Metod proizvodnje matičnjaka u jakim društvima sastoji se od podizanja ramova sa leglom iznad matične rešetke i presađivanje larvi starih 12-18 sati u matične osnove koje su smeštene do legla u drugom nastavku (metod šire opisan od strane *Wilkinson i Brown, 2002*). Ovom metodom matičnjaci su dobijeni uz konstantno prisustvo matice u odgajivačkim društvima. Matičnjaci su proizvedeni presađivanjem standardnom tzv. *Doolittle (1899)* metodom u termo-izolovanom kontejneru. Po dobijanju zrelih matičnjaka, 10 dana nakon presađivanja, svi matičnjaci su prebačeni u prenosivi inkubator. Jedan deo matičnjaka je dodat na sparivanje u nukleuse koji su formirani jedan dan pre, dok je drugi deo matičnjaka korišćen za dodatna ispitivanja matičnjaka. U okviru disertacije ispitivan je uticaj ishrane pčelinjih društava na kvalitet dobijenih matičnjaka i performanse dobijenih nesparenih i sparenih matica (šema 1).

Šema 1. Grafički prikaz ogleđa



Planirani broj dobijenih sparenih matica iz svake grupe je osam, te je iz tog razloga dodato od 12-16 matičnjaka kod svih grupa, kako bi rizik pri oplodnji i broja

dobijenih matica bio minimalan. Nukleusi su formirani na standardnim dvoramnim LR ramovima, koji su smešteni u četvorodelne LR nastavke, međusobno potpuno odvojene pregradama od lesonita. Tri nedelje nakon dodavanja matičnjaka, vršena je provera sparivanja matica. U nukleusima gde su se matice uspešno sparile dodavan je još jedan ram sa praznim izvučenim satom, tako da je svaka sparena matica imala tri rama na raspolaganju, gde se nakon 6 nedelja vršilo testiranje kvaliteta matica. Svi nukleusi u kojima nije evidentirana sparena matica su potpuno uklonjeni. Tamo gde su sve četiri matice bile sparene, jedan nukleus je izmešten radi proširenja preostalih tri matica. Sve matice su kontrolisane u istom periodu sem rojidbenih koje su formirane na isti način ali tokom sezone rojenja.

Kvalitet matica je ispitivan indirektno, preko parametara nukleusa, i direktno preko morfološko-reproduktivnih osobina matica.

Indirektni parametri. Pod indirektnim parametrima u proceni kvaliteta matica podrazumeva se snaga nukleusa preko broja individualnih pčela na srednjem ramu, kao i kompaktnosti legla (dve mere).

Brojanje pčela je izvršeno preko kompjuterskog programa koji omogućava manuelno obeležavanje i sabiranje pčela (slika 7). Program je napravljen isključivo za potrebe ovog rada kako bi se zaobišla greška subjektivne ocene u ocenjivanju broja pčela¹⁴. Program pruža i dodatne (opciono) pogodnosti koje olakšavaju brojanje (različite filtere, kontraste, mogućnost zumiranja radi preciznijeg brojanja). Ramovi na kojima se utvrđivao broj pčela slikani su DSLR kamerom *Nikon D90*, u JPEG formatu u visokoj rezoluciji 4288 x 2848, u skladu sa protokolom opisanim od strane *Delaplane i sar.* (2013).

¹⁴ Inače, pri redovnoj proceni broja pčela i površine legla najčešće se koristi metoda (*Kulinčević i sar., 1990*) kojom se ispitivana vrednost izražava u 1/10 okvira pčela i legla, a preračunavanje na ukupan broj pčela i ukupan broj ćelija sa leglom vrši preko Liebefeld metode



Slika 7. Brojanje i obeležavanje pčela pomoću programa



Slika 8. Procena kompaktnosti legla

Ramovi su slikani u istom delu dana (da bi se smanjila greška usled izletničkih aktivnosti) i svi nukleusi su pčelarskom dimilicom blago nadimljeni kako ne bi došlo do uznemiravanja pčela i njihovog grupisanja na periferiji nukleusa.

Nakon slikanog rama zaposednutog pčelama (radi analize tačnog broja pčela), sledilo je energično stresanje pčela i ponovnog slikanja radi ocene kompaktnosti legla (slika 8). Ocena kompaktnosti legla se računala na dva načina:

- maksimalna kompaktnost – podrazumeva broj poklopljenih ćelija u jednom polju (10x10) na najboljem delu rama, u poglavlju Rezultati i diskusija obeležena kao L_{max} ;
- prosečna kompaktnost – četiri najbolja polja sa leglom (10x10) podeljena sa istim brojem, u poglavlju Rezultati i diskusija obeležena kao $L_{\bar{x}}$.

Direktni parametri. U ispitivanju kvaliteta pčelinjih matica, osim indirektnih parametara društava korišćeni su i direktni parametri morfološko-reproduktivnih

osobina matica kao što su telesne mase, broj ovariola, dijametar spermateka i težine ovarijuma. Tokom oglada vršena je disekcija 40 sparenih matica.

Telesna masa. Nakon oduzimanja matica iz oplodnjaka, sledila je njihova narkoza i merenje pomoću analitičke vage. Merenje je vršeno sa tačnošću od 0,0001 g na vagi „LAC214“ -210 g/0,0001 g. Nakon merenja mase, dok je matica još u narkozi, sledila je disekcija.

Masa jajnika i broj ovariola. Nakon merenja telesnih masa matica sledila je njihova disekcija gde su prvo merene mase jajnika a potom brojanje jajnih cevčica jednog jajnika. Oba jajnika su merena (tzv. vlažna težina) na analitičkoj vagi, gde je dalje jedan jajnik služio za gensku ekspresiju za vitelogenin, dok je drugi jajnik služio za brojanje jajnih cevčica. Slučajan odabir jajnika (levi ili desni) je smanjio i anulirao favorizovanje određenog jajnika s obzirom postojanja asimetrije koje svedoče kako stariji navodi (*Chaud-Netto i Bueno, 1979*) tako i novija literatura (*Jackson i sar., 2011*).

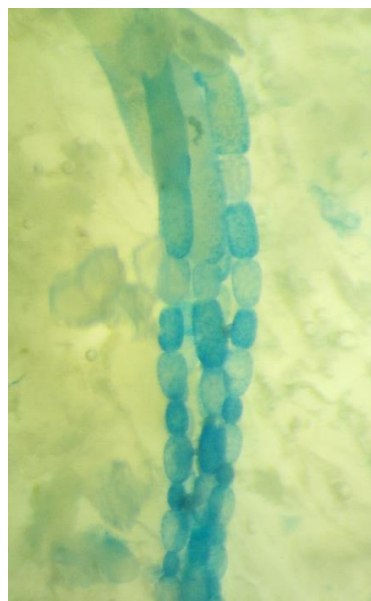
S obzirom na probleme pri brojanju ovariola kod čuvanih uzoraka matica (atrofija jajnika, kidanje i pojava krtih ovariola pri brojanju), sve matice su disekovane u najkraćem roku nakon njihovog vađenja iz nukleusa. Disekcija je rađena u disekcionom sudu uz pomoć trinokularnog stereo mikroskopa BTC STM-3C. Disekcioni sud je posuda u kojoj se nalazi 6 mm otopljenog (ohlađenog) voska koja pored mikroskopa i instrumenata za disekciju (makazice, entomološke igle, pincete i sl.) čine osnovu za ispitivanje interne anatomije (detaljnije opisano od strane *Carreck i sar. 2013*). Pri disekciji koristili smo rastvor 96% alkohola i vode u odnosu 70:30, u korist vode¹⁵. Uloga rastvora je održavanje volumena tkiva kao i sprečavanje njegovog isušivanja što bi onemogućilo brojanje ovariola. U našem radu brojanje ovariola rađeno je trenutno, sa svežim jajnikom, bez posebne histološke pripreme¹⁶. Prethodno izmeren jajnik, je ponovno vraćen na posebnom disekcionom sudu gde je obojen sa metilen plavom bojom, nakon čega je sledilo brojanje ovariola (slika 9 - slika 10).

¹⁵ Viša koncentracija alkohola stvrdnjava tkivo, dok pri povišenom udelu vode dlačni pokivač pčele onemogućava njenu penetraciju. Najčešće korišćen rastvor je (Insect saline solution) koga čine 7,5 g NaCl, 2,38 g Na₂HPO₄, 2,72 g KH₂PO₄ u 1 l destilovane vode

¹⁶ Brojanje ovariola se može vršiti i histološkom pripremom jajnika uz pomoć mikrotoma, određenih reagenasa, parafinskog fiksiranja i dr. (postupak traje oko nedelju dana)



Slika 9. Izgled neobojenih ovariola (na tamnoj podlozi)



Slika 10. Izgled obojenih ovariola (na svetloj podlozi)

Dijametar spermateke. Prilikom disekcije, neposredno pre vađenja jajnika, izolovana je spermateka kod svih sparenih matica. Spermateka je čuvana u formaldehidu do narednog dana kada su vršena i merenja. Merenja su vršena na Veterinarskom fakultetu Univerziteta u Beogradu uz pomoć mikroskopa *OLYMPUS CX31* (Olympus, Tokyo, Japan), kamere za mikroskop *Olympus UC50 digital camera* i softera za analizu slike *OLYMPUS CellSens Entry software*. Veličina spermateka je merena zajedno sa trahejalnom mrežom. Radi veće preciznosti, i s obzirom da traheja nema savršeno sferičan oblik, rađena su tri merenja iz kojih je vađen prosek. Dijametar je direktna procena volumena¹⁷ (*Hatch i sar., 1999*) i indirektna procena broja spermatozoida (*Carreck i sar., 2013*).

Dodatna ispitivanja – ispitivanja matičnjaka. Pored analize sparenih matica, vršena je i analiza 120 matičnjaka (telesne mase nesparenih matica i tri dimenzije matičnjaka) svih ispitivanih grupa izuzev rojodbene grupe. U društvima je presađeno po 24 matičnjaka, gde je deo matičnjaka oduziman radi genske ekspresije (3x8)¹⁸, deo matičnjaka je dodavan u nukleuse (12-16) kako bismo dobili sparene matice, dok je deo

¹⁷ Poznavajući prosečni radijus (r), volum spermateke (SV) se izračunava $SV = (4/3)(\pi)(r^3)$

¹⁸ Uzimano je u tri navrata po 8 uzoraka tri različita stadijuma – 8 predlutka, 8 lutka i 8 imaga-jednodnevnih matica. Jaja i larve su oduzete od rodonačelnice

matičnjaka (30) oduziman i smeštan u stacionarni inkubator ($34,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$; Rh $60\% \pm 1\% \text{ Rh}$) radi dodatnih ispitivanja. Analiza matičnjaka vršena je u svim grupama (izuzev rojdbene), gde su jedanaestog dana (od presađivanja) matičnjaci precizno premereni (dužina i širina matičnjaka). Za potrebe dodatnih ispitivanja u dve ispitivane grupe (N i P grupa) matičnjaci su dodati iz društva koja su bila formirana u slučaju rezerve, kako bi broj bio ujednačen kod svih grupa (30). Merenja su vršena digitalnim nonijusom, sa preciznošću $0,01\text{ mm}$, koji omogućava merenje spoljnih i unutrašnjih dimenzija. Dužina matičnjaka merena je od osnove voštane čaure do vrha matičnjaka, dok je širina matičnjaka merena na najširem delu matičnjaka. Matičnjaci, čuvani u stacionarnom inkubatoru smešteni su u namenski zamrežene pojedinačne podeoke kako bi se omogućilo nesmetano izvođenje matičnjaka (slika 14., data u prilogu disertacije). Ubrzo po izvođenju, matice su merene na analitičkoj vagi. Po izvođenju matica merena je i širina-dijametar otvora na vrhu matičnjaka.

Vitelogenin. Razvojni stadijumi pčelinjih matica koji su tokom ogleda analizirani za potrebe ekspresije gena za vitelogenin bili su sledećih definisanih starosti:

- Stadijum jajeta (1-3 dana), 8 uzoraka dobijenih iz rama izolatora ($\Sigma=8$)
- Stadijum larve (4-5 dana), 8 uzoraka dobijenih iz rama izolatora ($\Sigma=8$)
- Stadijum predlutke (9-11), po 8 uzoraka dobijenih iz pripadajućih košnica četiri grupa ($\Sigma=32$)
- Stadijum lutke (12-14 dana), po 8 uzoraka dobijenih iz pripadajućih košnica četiri grupa ($\Sigma=32$)
- Stadijum matica (jednodnevni adult - nesparena matica), po 8 uzoraka dobijenih iz pripadajućih košnica četiri grupa ($\Sigma=32$)
- Stadijum sparenih matica (jedan jajnik), po 8 uzoraka-matica poreklom od 5 grupa - dobijenih iz nukleusa (uključujući rojdbenu grupu) ($\Sigma=40$).

Radi ispitivanja ekspresije vitelogenina, tokom ogleda svi sakupljeni uzorci skladišteni su u sterilnim epruvetama i čuvani pomoću RNA later-a, prema navedenom uputstvu proizvođača (duže čuvanje na niskoj temperaturi). Pojedinačni razvojni stadijumi matica (kao i jajnici sparenih matica) uzorkovani su tokom proizvodnje matičnjaka i procesa dobijanja sparenih matica radi sprovođenja daljeg postupka ekstrakcije molekula ribonukleinske kiseline (RNK).

Ekstrakcija RNK. Postupak ekstrakcije je sproveden korišćenjem komercijalnog seta Quick-RNA MiniPrep Kit (Zymo Research). U skladu sa tipom uzorka i njegovom veličinom, korišćena je različita količina pufera za liziranje *Lysis Buffer* i PBS pufera. Nakon liziranja, nezavisno od tipa uzorka, postupak je bio isti. U skladu sa navedenim, radni protokol sastoji se iz sledećih koraka:

- Kod stadijuma jaja i larve:

U epruvetama u kojima se nalaze uzorci, koji su duže čuvani u zamrzivaču, u RNA-later, dodato je 150 µl 1x PBS i 600 µl Lysis pufera (bez odlivanja RNA-later). Razlog zbog čega se ne odliva RNA later je usled nemogućnosti lakog uočavanja navedenih uzoraka i odlivanja RNA later-a. Nakon dodavanja 1x PBS i Lysis pufera sledi maceriranje sterilnim plastičnim štapićem za maceriranje (pellet pestle) u epruvetama zapremine 1,5 ml.

- Kod stadijuma predlutki, lutki i novoizleženih matica:

Iz epruveta u kojima se nalaze uzorci, koji su duže čuvani u zamrzivaču u RNA-later, prvo je odliveno što veći deo RNA-later-a tako da u epruveti ostane uzorak koji je vlažan od RNA-Later-a. Nakon prelivanja uzorka sa 750 µl Lysis pufera sledi detaljno maceriranje sterilnim plastičnim štapićem za maceriranje (pellet pestle) u epruvetama zapremine 1,5 ml. U ovim stadijumima nije korišćen i dodavan 1x PBS.

- Kod stadijuma jajnika:

Postupak izolovanja je isti kao kod predlutki, lutki i novoizleženih matica s tim što se nakon odlivanja RNA later uzorci prelivaju sa 500 µl Lysis pufera.

Dalji protokol ekstrakcije RNK:

- Nakon dodavanja lizirajućih komponenti, usled detaljnog i podrobnog maceriranja sterilnim plastičnim štapićima dovodi do razbijanja tkiva na sitnije delove kako bi delovanje lizirajućih komponenti bilo efikasnije. Potom je macerat inkubiran na sobnoj temperaturi (20-30°C) na vorteks aparatu u trajanju od 5 minuta.

- Lizat je prečišćen centrifugovanjem na 13000 rpm u trajanju od 1 minut.

- Supernatant je prebacivan u Spin-Awaytm Filter kolonicu (žuto obojena)¹⁹ prethodno postavljenu u sabirnu epruveticu, centrifugovan 1 minut na 13000 rpm.

¹⁹ S obzirom da je bilo više supernatanta nego što staje u jednu kolonicu, iscedak smo prebacivali u novu čistu (2 ml epruveticu) i ostatak supernatanta centrifugovali u istoj kolonici

- U epruveticu sa filtratom koji je dobijen centrifugovanjem (iscedak) dodat je 1 volumen (isto tolika količina, dakle 750 μ l) etanola a onda mešavina dobro izmešana na vorteksu.

- Miksat iz prethodnog koraka je zatim prebačen u Zymo-Spintm IICG Column kolonicu (zeleno obojena) prethodno postavljenu u sabirnu epruveticu i centrifugovan 30 sekundi na 13000 rpm.

- U nekoliko narednih koraka vršeno je dodavanje određenih pufera (RNA Prep Buffer i RNA Wash Buffer) uz centrifugovanje kolonica na 13000 rpm i to sledećim redom:

- RNA Prep Buffer 400 μ l, centrifugiranje 30 sekundi;
- RNA Wash Buffer 700 μ l, centrifugiranje 30 sekundi;
- RNA Wash Buffer 400 μ l, centrifugiranje 120 sekundi.
- Nakon dodavanja svakog pufera uzorak je prečišćen. Kolonica je zatim prebačena u novu, sterilnu i pravilno obeleženu 1,5 ml epruveticu. U kolonicu je dodato 40 μ l vode za eluciju direktno na belu membranu kolonice (Dnase/Rnase-Free Water) i uzorci su centrifugovani 60 sekundi na 13000 rpm. Nakon ovog postupka dobili smo izolat i epruvetice sa RNK izolatom su čuvane na -70°C ili odmah korišćene za reverznu transkripciju.

Reverzna transkripcija RNK. Reverzna transkripcija, kojom je izolovana RNK prevedena u cDNK, vršena je pomoću seta - RevertAid Reverse Transcriptase, Thermo Scientific.

Reakciona smeša ukupnog volumena od 20 μ l sastojala se iz:

- 1 μ g RNK
- 5 μ M nasumični heksameri kao prajmeri (Thermo Scientific)
- 1 x RT pufera (Thermo Scientific)
- 20 U Ribo-Lock RNaznog inhibitora (Thermo Scientific)
- 1 mM dNTP (Thermo Scientific)
- 200 U RevertAid reverzne transkriptaze (Thermo Scientific)

Reakciona smeša pripremana je na sledeći način: RNK i prajmeri su u volumenu od 11 μ l inkubirani 5 min na 70°C, a zatim prebacivani na led. Dok su uzorci stajali na ledu, u svaki je dodato po 9 μ l smeše koja se sastojala iz RT pufera, Ribo-Lock RNaza

inhibitor, dNTP i RevertAid reverzne transkriptaze. Finalna smeša je inkubirana 10 min na 25°C, a zatim 1 sat na 42°C. Reakcija je zaustavljena inkubiranjem 10 min na 70°C. Uzorak cDNK koncentracije 50 ng/μl je do dalje upotrebe čuvan na -20°C.

Provera kvaliteta cDNK. Kvalitet sintetisane cDNK se proveravao umnožavanjem regiona gena β-aktin koji je konstitutivno eksprimiran. Na ovaj način je indirektno potvrđivan integritet izolovane RNK koja je korišćena za sintezu cDNK, kao i efikasnost reverzne transkripcije. Za umnožavanje su korišćeni prajmeri čije su sekvence prikazane u Tabeli 7.

Reakcija volumena 25 μl sastojala se od:

- 100 ng cDNK
- 10 x PCR pufer (KAPA Biosystems)
- 2,5 mM MgCl₂ (KAPA Biosystems)
- 0,2 μM dNTP (KAPA Biosystems)
- 0,5 μM prajmera (uzvodni i nizvodni)
- 1 U Taq polimeraze (KAPA Biosystems)

Ukoliko je u PCR reakciji umnožen fragment dužine od 120 bp, smatralo se da je cDNK odgovarajućeg kvaliteta za analizu ekspresije metodom qRT-PCR. Ukupan broj uzoraka za ispitivanje ekspresije vitelogenina iznosio je 152, kao i dodatnih 152 za kontrolu β-aktin.

qReal-Time PCR analiza ekspresije gena

Za merenje nivoa ekspresije gena u uzorcima korišćena je metoda qRT-PCR sa komparativnom $\Delta\Delta C_t$ analizom (*Livak i sar., 2001*). Za normalizaciju sintetisane cDNK u uzorcima je korišćena endogena kontrola β-aktin, a kao kalibrator je odabrana medijana normalizovanih vrednosti za ekspresiju gena razvojnih stadijuma matica iz kontrolne grupe.

Formula po kojoj je izračunata relativna vrednost količine ekspresije gena je:

$$Q = 2^{-\Delta\Delta C_t},$$

gde je $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ uzorak} - \Delta C_t \text{ kalibrator}$

$(C_t \text{ vitelogenin} - C_t \beta\text{-aktin}) - (C_t \text{ vitelogenin, kalibrator} - C_t \beta\text{-aktin, kalibrator})$

Svi eksperimenti su rađeni u duplikatu. Ukoliko su se Ct vrednosti (ciklus u kojem intenzitet fluorescencije prelazi zadati prag intenziteta) za isti uzorak značajno razlikovale, eksperiment je ponavljan u duplikatu.

Nivoi ekspresije gena praćeni su upotrebom Sybr-Green tehnike (prema protokolu proizvođača seta KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, KAPA Biosystems). Nukleotidne sekvence prajmera navedene su u tabeli 3.

Tabela 3. Prajmeri korišćeni za Real time PCR kvantifikaciju

Naziv prajmera	Sekvenca 5' – 3'	Referenca
Beta actin-F	TTGTATGCCAACACTGTCCTTT	<i>Simone i sar.</i> (2009)
Beta actin-R	TGGCGCGATGATCTTAATTT	<i>Simone i sar.</i> (2009)
VgMC-F	AGTTCGACCGACGACGA	<i>Simone i sar.</i> (2009)
VgMC-R	TTCCCTCCCACGGAGTCC	<i>Simone i sar.</i> (2009)

Reakciona smeša ukupnog volumena 20 µl sastojala se od sledećih komponenti u finalnim koncentracijama:

- 20 ng cDNK
- 1 x Kapa Syber Fast Universal qPCR Master Mix
- Prajmeri (200 nM uzvodnog i nizvodnog prajmera)

Temperaturni profil reakcije korišćene za amplifikaciju bio je:

1. 3 min / 95°C
2. 45 ciklusa:
 - 20 s / 95°C
 - 1 min / 60°C
 - 30 s / 72°C

Nivoi ekspresije navedenih gena mereni su na real-time PCR aparatu „Rotor-Gene Q 5plex“ (Qiagen).

Statistička analiza

Dobijeni podaci su obrađeni standardnim statističkim metodama. Pored osnovne deskriptivne statistike, primenjena je metoda jednofaktorske analize varijanse. Efekat tretmana na ispitivane parametre je ocenjen na osnovu F-testa za tri nivoa značajnosti ($\alpha=0,05$, $\alpha=0,01$ i $\alpha=0,001$), a razlike između pojedinih varijanti su ocenjene pomoću Dankanovog (*Duncan*) testa ($\alpha=0,05$). Izračunati su koeficijenti korelacije između ispitivanih osobina, a njihova značajnost je ocenjivana na osnovu t-testa. Nivo ekspresije gena za vitelogenin, normalizovan prema ekspresiji gena za β -aktin, iskazan je u obliku vrednosti $2^{-\Delta\Delta Ct}$, koje predstavljaju relativno povećanje ili smanjenje ekspresije vitelogeninskog gena u odnosu na kontrolu (ili u odnosu na stadijum jajeta u poređenjima između stadijuma) gde ekspresija u kontroli ima jediničnu vrednost. Pošto je koeficijent varijacije između uzoraka u svakoj od ispitivanih grupa bio veći od 30% (često i mnogo više), za poređenje ekspresije gena za vitelogenin između ispitivanih grupa korišćeni su neparametrijski *Kruskal-Wallis* i *Mann-Whitney U* testovi. Statistička analiza rezultata obavljena je korišćenjem softvera *MS Excel 2007* (MS Office 2007, Microsoft, Redmond WA, USA) i *Statistica v9.0* (StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA).

5. Rezultati i diskusija

5.1. Prijem matičnjaka

Tokom 2017. godine dvadeset društava presađeno je *Doolittle* metodom radi dobijanja matičnjaka. Tokom eksperimenta prvi parametar koji je ispitivan odnosio se na broj matičnjaka i uticaja tipa ishrane na procenat prijema. Broj povučenih matičnjaka ispitivanih grupa prikazan je u sledećoj tabeli:

Tabela 4. Broj povučenih matičnjaka pojedinačne košnice po varijantama ogleda

Košnica	Varijante ogleda – broj povučenih matičnjaka			
	S grupa	P grupa	F grupa	N grupa
1	17 / 24	0 ¹ / 24	15 / 24	11 / 24
2	20 / 24	22 / 24	18 / 24	19 / 24
3	21 / 24	17 / 24	20 / 24	10 / 24
4	22 / 24	17 / 24	15 / 24	6 / 24
5	23 / 24	7 / 24	15 / 24	8 / 24
Aritmetička sredina²	20,6 ^b	15,75 ^{a,b}	16,6 ^{a,b}	10,8 ^a
Standardna devijacija (σ)	2,3	6,3	2,3	5,0
Koeficijent varijacije (CV%)	11,2	39,9	13,9	46,0

^{a,b,c...} Vrednosti za aritmetičku sredinu su grupisane na osnovu Dankanovog (Duncan) testa ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.
¹ Nije povučen nijedan matičnjak
² Značajnost na osnovu F testa: $P = 0,016917$ (*)

Procenat prijema matičnjaka bio je 85,8% u S grupi, 66,5% u P grupi, 69,2% u F grupi i 45,0% u N grupi. Nizak procenat u N grupi (kontrolna grupa, bez prihrane) bio je očekivan što potvrđuje da je prihrana, u procentu prijema matičnjaka, izuzetno bitan faktor u proizvodnji. Visok koeficijent varijacije ispoljio se u P grupi, iz razloga što društvo broj 1 nije povuklo matičnjake. Iako pomenuta košnica nije korišćena pri statističkoj analizi, košnica broj 5, u istoj grupi (P grupi), dala je znatno niže vrednosti povučenih matičnjaka u poređenju sa ostalim košnicama. Najviše vrednosti za broj povučenih matičnjaka očekivano je u P grupi ali usled navedenog to nije bio slučaj. Proces veštačke proizvodnje matičnjaka (matica) je praksa koja je revolucionirala pčelarsku industriju. Pošto je sve veća potreba za masovnom proizvodnjom matičnjaka, odgajivači stalno pokušavaju da optimizuju praksu „uzgoja“ primenom takvih tehnika koje dovode do najboljih rezultata u broju povučenih matičnjaka. Tako su *Contreras-Martinez i sar.* (2016) izneli činjenicu da je najbolji procenat povučenih matičnjaka bio

sa dodatkom jabukovog soka u osnove matičnjaka²⁰. Pri našem radu, korišćena je kineska igla za presađivanje, koja larvu zahvata zajedno sa već prisutnim mlečom, što omogućava presađivanje bez dodataka drugih suplemenata u osnove.

Prosečni prijem matičnjaka za sva društva u našem ogledu iznosio je 66,5% U poređenju sa drugima, prosečan prijem matičnjaka u junu, julu i avgustu bio je 75,1, 70,9 i 68,3% (*Sahinler i Kaftanoglu, 2005*). Prema *Emsen i sar. (2003)* prijem larvi iznosio je 77% u (jednostruko presađivanje) i 70% (dvostruko presađivanje). Jedino je S grupa, u našem slučaju, imala bolje rezultate u poređenju sa gore navedenim vrednostima (*Dolasevic i sar., 2020*).

Nešto niže prosečne vrednosti povučenih matičnjaka u odnosu na druge bilo je očekivano jer su:

- društva bila prvi put presađena²¹, a prema tvrdnjama *Wilkinson i Brown (2002)* proizvodnja matičnjaka u društvima (sa prisutnom maticom) pri prvom presađivanju daju lošije rezultate u poređenju sa svakim narednim presađivanjem gde se prijem poboljšava;

- eksperiment je rađen tokom bespašnog perioda;
- sakupljači polena bili su sve vreme uključeni;
- presađivanje i dobijanje matičnjaka vršeno je u prisustvu matice što takođe rezultira nižim prijemom (*Cengiz i sar., 2009*).

Dakle, prihrana sirupom je dala najbolje rezultate kada je u pitanju broj povučenih matičnjaka što ne znači da će veći broj povučenih matičnjaka rezultirati dobijanjem kvalitetnijih matica. U poređenju sa drugom hranom (P i F grupa) ovog ispitivanja šećerni sirup predstavlja inferiorniju hranu (iz ugla njegove hemijske jednoličnosti) koja ne može u potpunosti obezbediti sve hranljive materije pri proizvodnji kvalitetnih matica (detaljnije u narednim poglavljima). U našem ogledu rezultati pokazuju pozitivan efekat šećernog sirupa na broj povučenih matičnjaka (kvantitativni efekat) dok će se kvalitet buduće dobijenih matica kasnije obrazložiti (kvalitativan efekat).

²⁰ Interesantno da u istom istraživanju dodavanje matičnog mleča pri presađivanju zauzima četvrto mesto u pogledu prijemu matičnjaka (57,82%), dok jabukov sok (81,06), koka kola (62,93%) i kokosova voda (60,90) zauzimaju prva tri mesta

²¹ Društva su samo u prvom delu sezone korišćenja za presađivanje (u komercijalne svrhe) nakon čega je proizvodnja prekinuta a društva odabrana za budući ogled

5.2. Kvalitet matičnjaka i mase nesparenih matica

Sem broja povučenih matičnjaka, sledeće parametre koje smo ispitivali bili su veličina matičnjaka i telesne mase (nesparenih) matica. Podaci su obrađeni analizom varijanse, urađen je grupni F test koji pokazuje da li je bilo značajnih rezultata između tretmana, a srednje vrednosti tretmana su grupisane na osnovu Dankanovog testa, koji pokazuje značajnost razlika između pojedinačnih tretmana.

Pri veličini matičnjaka testirali smo tri dimenzije: dužina matičnjaka, širina matičnjaka i dijametar otvora matičnjaka. U sledećoj tabeli (tabela 5) dati su proseci navedenih dimenzija i mase nesparenih matica:

Tabela 5. Masa matica i dimenzije matičnjaka u zavisnosti od ishrane

Osobine	Varijante oglada				F ¹
	S grupa	P grupa	F grupa	N grupa	
Telesna masa (g)	0,2041 ^b	0,1793 ^a	0,1879 ^a	0,1881 ^a	***
Dužina matičnjaka (mm)	27,18 ^b	26,51 ^{a,b}	24,91 ^a	27,88 ^b	**
Dijametar otvora (mm)	6,83 ^a	6,67 ^a	6,85 ^a	6,99 ^a	ns
Širina matičnjaka (mm)	11,54 ^a	11,55 ^a	11,54 ^a	11,20 ^a	ns

^{a,b,c...} Vrednosti su grupisane na osnovu Dankanovog (Duncan) testa ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.

¹ Značajnost na osnovu F testa: ns = $P > 0,05$; * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$

Najviša vrednost telesnih masa matica zabeležena je kod S grupe, gde je iznosila 204 mg. Vrednosti S grupe su pokazale značajnu razliku u poređenju sa preostalim grupama, koje međusobno nisu pokazale značajnu razliku.

Telesna masa jednodnevnih matica u S grupi iznosi 204,1 mg, P grupi 179,3 mg, u F grupi 187,9 mg i u N grupi 188,1 mg. Prema *Hatjina i sar.* (2014) masa nesparenih matica ne bi trebala da bude manja od 200 mg. *Kahya i sar.* (2008) su matice podeljene u tri kategorije maseno predstavili kao: lake (ispod 190 mg), srednje (190-200 mg) i teške (preko 200 mg), što bi prema našim vrednostima jedino matice hranjene šećernim sirupom spadale u tešku, dok bi preostale, spadale u laku kategoriju. Prosečna telesna masa nesparenih matica svih ispitivanih grupa iznosila je 189,8 mg.

U pogledu dužina, matičnjaci iz F grupe značajno su manji u poređenju sa matičnjacima S i N grupe. Iako nije bila statistički značajna razlika, nesparene matice F grupe su ujedno bile i nešto lakše u poređenju sa drugim maticama. Ovi rezultati ukazuju da polenski suplement nije najbolji izbor kada su u pitanju dosadašnji ispitivani

parametri. U našem ogledu, srednja dužina zatvorenih matičnjaka iznosila je 26,62 mm. Ove vrednosti su slične u poređenju sa vrednostima drugih autora. Srednja dužina matičnjaka prema *Cengiz i sar.* (2009) iznosila je 25,13 mm ± 0,18 mm u prisustvu matice. *Emsen i sar.* (2003) su došli do prosečne vrednosti dužine matičnjaka od 25,20 mm ± 0,04 mm proizvedene u društvima bez matica. *Wilkinson i Brown* (2002) takođe imaju slične vrednosti od 26,70 mm u društvima gde je matica bila prisutna. Premda mi nismo vršili poređenje dužine matičnjaka proizvedene prirodnim putem, rezultati *Dodologlu i sar.* (2004) navode da je dužina matičnjaka (24,80 mm ± 0,37 mm) proizvedenih *Doolittle* metodom bila veća u poređenju sa prirodno dobijenim matičnjacima.

Razlike u dijametru otvora matičnjaka kao i širine matičnjaka nisu bile značajne. Matice pri izvođenju kružno progrizaju vrh matičnjaka prema kome su i same okrenute²². Ispitivanja dijametra otvora matičnjaka je rađena po pretpostavci da će veći dijametar biti indirektni pokazatelji krupnijih matica. Na ovaj način, kvalitet svih izvedenih matičnjaka bio jednostavno ocenjen preko dijametra otvora, kao pouzdan parametar u pogledu krupnoće matice. Ova pretpostavka nije dokazana u našem postavljenom ogledu.

Širina matičnjaka je u slaboj pozitivnoj korelaciji sa telesnom masom matica ($r = 0,271$) kao i dužinom matičnjaka ($r = 0,241$), dok je dijametar otvora u srednjoj pozitivnoj korelaciji sa dužinom ($r = 0,332$) (tabela 6).

Tabela 6. Koeficijenti korelacije mase matica i dimenzija matičnjaka (iznad dijagonale) i njihove standardne greške (ispod dijagonale)

Osobine matice i matičnjaka	Osobine matice i matičnjaka			
	Telesna masa	Dužina matičnjaka	Dijametar otvora	Širina matičnjaka
Telesna masa	0	0,152	-0,030	0,271** ¹
Dužina matičnjaka	±0,023	0	0,332***	0,241*
Dijametar otvora	±0,001	±0,110	0	-0,035
Širina matičnjaka	±0,073	±0,058	±0,001	0

Iznad dijagonale su koeficijenti korelacije, a ispod dijagonale su odgovarajuće vrednosti njihove standardne greške. Jačina korelacije je procenjivana po skali: <0,3 = slaba; 0,3-0,6 = srednje jaka; >0,6 = jaka.

¹ Značajnost korelacije na osnovu *t*-testa: ns = P>0,05; * = P<0,05; ** = P<0,01; *** = P<0,001

Korelacija između ostalih osobina matičnjaka i jednodnevnih matica nije bila signifikantna pa ih nećemo dalje analizirati i diskutovati.

²² Iako retko, u praksi se može naići na situaciju gde je matica okrenuta suprotno od vrha matičnjaka

5.3. Ispitivanja sparenih matica

Od svih proizvedenih matičnjaka, oduzet je jedan broj matičnjaka iz svake grupe/košnice. S obzirom da je od svih grupa oduzeto 12-16 matičnjaka²³, to znači da je iz svih košnica izdvojeno po dva-tri matičnjaka. Matičnjaci su dodati u oplodnjake (nukleuse) radi njihovog izvođenja i sparivanja. Nakon kontrole njihovog sparivanja i šestonedelnog perioda nosivosti sledila je analize njihovog kvaliteta. U narednoj tabeli (tabela 7) prikazane su razlike u masama (sparenih) matica kod različitih grupa.

Tabela 7. Telesna masa matica (g) u zavisnosti od ishrane

Matica	Varijante ogleda				
	S grupa	P grupa	F grupa	N grupa	rojdbene
1	0,2298	0,2277	0,1762	0,2109	0,2159
2	0,2211	0,2300	0,1889	0,2046	0,2057
3	0,2071	0,1868	0,2005	0,2470	0,1924
4	0,1954	0,2331	0,2265	0,2350	0,1948
5	0,2235	0,2263	0,2019	0,2018	0,2118
6	0,2092	0,2514	0,1960	0,2399	0,1993
7	0,2157	0,2269	0,1972	0,2341	0,2401
8	0,2336	0,2392	0,2210	0,2009	0,1906
Aritmetička sredina¹	0,2169 ^{a,b,c}	0,2277 ^c	0,2010 ^a	0,2218 ^{b,c}	0,2063 ^{a,b}
Standardna devijacija (σ)	0,0127	0,0185	0,0163	0,0190	0,0164
Koeficijent varijacije (CV%)	5,85	8,14	8,09	8,59	7,96

^{a,b,c...} Vrednosti za aritmetičku sredinu su grupisane na osnovu Dankanovog (Duncan) testa ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.

¹ Značajnost na osnovu F testa: $P = 0,018175$ (*)

Razvijenost matice, tj. njena masa može se koristiti kao faktor kvaliteta pri ocenjivanju jer teže matice imaju više ovariola, veće spermateke i više spermatozoida u spermateci (Akyol i sar., 2008; Kaftanoglu i sar., 2000). Različit tip ishrane imao je uticaj na težinu sparenih matica, tako da je P grupa dala teže matice od F i rojdbene grupe. Zanimljivo je da nije bilo razlike između grupe gde su društva prihranjivana polenom i medom (P grupa) i grupe koja uopšte nije imala prihranu (N grupa) kao i S grupe koja je prethodno (kod nesparenih matica) bila superiornija. Objašnjenje ovakvog rezultata najverovatnije leži u tome da je društvo iz N grupe imalo najmanji broj povučениh matičnjaka i samim tim svaki matičnjak bio je više hranjen matičnom mleči. U prilog ovome ukazuju i određeni radovi koji potvrđuju da prosečna proizvodnja

²³ Radi izbegavanja rizika sparivanja, u nukleuse smo dodavali 12-16 matičnjaka radi dobijanja minimum 8 sparenih matica po svakoj ispitivanoj grupi. Matičnjaci po tretmanima/košnicama izabrani su metodom slučajnog odabira

matične mleči (kao i njen kvalitet!) po jednom matičnjaku opada sa ukupnim brojem matičnjaka (*Sahinler i Sahinler, 2002*). U ovoj fazi oglada, grupa S, za razliku od prethodnih rezultata, nije se statistički razlikovala od nijedne grupe. Masa sparenih matica iz grupe sa polenom značajno je veća od rojdbene grupe kao i od grupe sa dodatkom polenskog suplementa. S obzirom na nedostatak radova o uticaju različite ishrane i njenog efekta na masu dobijenih sparenih matica, osvrnućemo se na dobijene mase drugih autora u njihovim ogledima kao i neke od preporuka. Dakle, prosečna masa dobijenih matica u svim ispitivanim grupama iznosila je 215 mg. Prosečna masa matica u našem ogledu je u saglasnosti sa studijama *Tarpy i sar.* (2011, 2012), 206,6 mg i 218,7 mg. Masa sparenih matica ne bi trebala da je ispod 230 mg, prema navodima *Hatjina i sar., 2014*. U Sloveniji, sa rasom *Apis mellifera carnica*, tokom 2006., 2008. i 2010. godine masa matica iznosila je 208,40 mg ± 15,31 mg, 209,49 mg ± 9,82 mg, 201,83 mg ± 15,85 mg (*Gregorc i Smodiš Škerl, 2015*). Poredeći strane navode, možemo zaključiti da je prosečna masa sparenih matica od 228 mg u grupi sa polenom i medom dala izuzetne rezultate. Prema našem ogledu, kada je u pitanju masa sparenih matica, prednost u izboru hrane treba svakako dati prirodnoj hrani, medu i polenu (P grupa), što su vrednosti iz prethodne tabele i potvrdile.

Nakon merenja matica, sledila je disekcija svih sparenih matica. Broj disekovanih matica po svakoj grupi iznosio je 8 (ukupno 40), gde su se sve vrednosti, tokom, i neposredno nakon disekcije, evidentirale i statistički obradile. Pri disekciji prvi parametar koji ćemo prikazati predstavlja masu jajnika sparenih matica (tabela 8).

Tabela 8. Masa jajnika matica (g) u zavisnosti od ishrane

Košnice	Varijante oglada				
	S grupa	P grupa	F grupa	N grupa	rojdbene
1	0,1642	0,1323	0,0559	0,0896	0,1529
2	0,1483	0,1278	0,0889	0,1068	0,1271
3	0,1329	0,0945	0,1213	0,1559	0,1252
4	0,1023	0,1181	0,1220	0,1355	0,1082
5	0,0947	0,1374	0,0953	0,0766	0,1245
6	0,0917	0,1323	0,1085	0,1704	0,1012
7	0,1240	0,1208	0,0566	0,1108	0,1410
8	0,1333	0,1189	0,1443	0,0429	0,0970
Aritmetička sredina¹	0,1239 ^a	0,1228 ^a	0,0991 ^a	0,1111 ^a	0,1221 ^a
Standardna devijacija (σ)	0,0260	0,0134	0,0315	0,0422	0,0193
Koeficijent varijacije (CV%)	21,01	10,93	31,77	37,96	15,80

^{a,b,c...} Vrednosti za aritmetičku sredinu su grupisane na osnovu Dankanovog (Duncan) testa ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.

¹ Značajnost na osnovu F testa: P = 0,353722 (ns)

Težina jajnika nije pokazala statističku značajnost među ispitivanim grupama, iako su srednje vrednosti kod F grupe bile nešto niže. Usled navedenih (nesignifikantnih) vrednosti, pojedinačna poređenja se neće dalje analizirati. Nasuprot, osvrnućemo se na prosek masa svih dobijenih jajnika koja nisu u skladu sa ranije objavljanim vrednostima. Prosečna masa jajnika za sve grupe iznosila je 115,8 mg. Ove vrednosti su više čak i od pojedinačnih (najviših) vrednosti drugih autora prethodno objavljenih. Prema *Gregorc i Smodiš Škerl* (2015) najteži jajnici bili su tokom 2010. godine i iznosili su $78,67 \pm 11,86$ mg. Prema *Haarmann i sar.* (2002) najviša vrednost bila je 47,9 mg u kontrolnoj grupi. Pretpostavka je, da je do razlika dovelo nestandardizovana metodologija merenja. Prilikom samog merenja, dužina kontakta vlažnih jajnika sa suvim papirom je od presudnog značaja za konačan rezultat. Tokom našeg oglada, svež jajnik smo na trenutak prislonili suvom papiru i odmah nakon toga pristupali merenju. Ukoliko je jajnik potpuno spušten na papir onda se masa znatno smanjuje usled većeg kapilarnog upijanja tečnosti vlažnog jajnika. Sem ovoga, matice u našem eksperimentu su odmah po vađenju iz nukleusa merene, što takođe doprinosi većim vrednostima i manjem kaliranjju ovarijuma tokom dužeg transporta u kavezima.

Nakon merenja mase jajnika, sledilo je razdvajanje parnih jajnika. Jedan jajnik je služio za brojanje jajnih cevčica (tabela 9) dok je drugi jajnik služio za analizu ekspresije vitelogenina (kasnije analizirano).

Tabela 9. Broj jajnih cevčica matice u zavisnosti od ishrane

Košnice	Varijante oglada				
	S grupa	P grupa	F grupa	N grupa	rojidbene
1	144	170	130	146	159
2	148	171	147	149	145
3	158	162	142	140	144
4	154	168	151	147	157
5	160	167	154	147	138
6	155	159	154	174	158
7	149	147	109	148	160
8	151	173	146	132	120
Aritmetička sredina¹	152,38 ^a	164,63 ^b	141,63 ^a	147,88 ^a	147,63 ^a
Standardna devijacija (σ)	5,37	8,50	15,32	11,97	13,91
Koeficijent varijacije (CV%)	3,52	5,16	10,81	8,09	9,42

^{a,b,c...} Vrednosti za aritmetičku sredinu su grupisane na osnovu Dankanovog (Duncan) testa ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.
¹ Značajnost na osnovu F testa: $P = 0,005437$ (**)

Veći broj jajnih cevčica ukazuje na bolju razvijenost jajnika i na veću potencijalnu nosivost matice. Razlike u broju jajnih cevčica, usled različite ishrane, bile su uočljive. Statistički značajno veći broj jajnih cevčica imale su matice iz P grupe u poređenju sa ostalim grupama što je i očekivano (Dolasevic i sar., 2020). Ovim je dokazano da dodatkom prirodne hrane (polen i med) bitno možemo uticati na povećanje broja jajnih cevčica. Matice iz P grupe posedovale su 8% više ovariola u odnosu na S grupu, 14% više ovariola u odnosu na F grupu i 10% više u odnosu na N i rojdbenu grupu. Matice iz P grupe posedovale su 9% više ovariola u odnosu na prosek svih ispitivanih grupa. U našem eksperimentu, prosečan broj ovariola za sve ispitivane grupe iznosio je 150,83. Što se tiče proseka svih grupa, naši rezultati su u skladu sa drugim autorima; kvalitetna matica bi trebala imati oko 150 ovariola (Ruttner, 1983; Carreck i sar., 2013); oko 149 ovariola (Gregorc i Smodiš Škerl, 2015). Broj ovariola (*A. m. carnica*) za kvalitetnu maticu bi trebao biti u opsegu 145-160 (Hatjina i sar., 2014). U našem radu nisu testirane nesporene matice jer su ovariole sastavljene od terminalnih filamenata dok je bazalni germarijum slabo razvijen.

U narednoj tabeli (tabela 10) predstavljene su veličine spermateke kod svih ispitivanih grupa. Kao što je prethodno naglašeno (u *Materijal i metod rada*), sve vrednosti koje se nalaze u tabeli predstavljaju prosečne vrednosti tri različita merenja spermateke.

Tabela 10. Prečnik spermateke matice (μm) u zavisnosti od ishrane

Košnice	Varijante ogleđa				
	S grupa	P grupa	F grupa	N grupa	rojdbene
1	1276,56	1258,73	1205,37	1254,59	1093,10
2	1227,56	1258,93	1242,61	1177,75	1149,77
3	1257,01	1180,91	1176,28	1314,49	1299,32
4	1138,68	1391,48	1231,53	1196,28	1248,66
5	1248,94	1309,56	1163,93	1287,25	1207,24
6	1279,41	1233,28	1207,52	1303,98	1281,88
7	1196,87	1338,11	1244,65	1277,04	1303,85
8	1116,10	1299,38	1241,73	1332,32	1082,55
Aritmetička sredina¹	1217,64 ^{a,b}	1283,80 ^b	1214,20 ^{a,b}	1267,96 ^{a,b}	1208,30 ^a
Standardna devijacija (σ)	61,98	65,29	31,35	55,44	90,21
Koeficijent varijacije (CV%)	5,09	5,09	2,58	4,37	7,47

^{a,b,c...} Vrednosti za aritmetičku sredinu su grupisane na osnovu Dankanovog (Duncan) testa ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.
¹ Značajnost na osnovu F testa: P = 0,069193 (ns)

U pogledu dijametra spermateke P grupa je dala bolje rezultate u poređenju sa rojidbenim maticama ali je bila u rangu sa preostalim grupama. Prema *Kovačić i Puškadija* (2016) veća spermateka bi trebala da primi više spermatozoida kao i to da srednji dijametar pripada ospegu 1,17 mm - 1,24 mm. Takođe, prema drugim autorima dijometri spermateka kod matica koje su podeljene u grupe, na teške i srednje, iznosili su $1,258 \text{ mm} \pm 0,20 \text{ mm}$ i $1,061 \text{ mm} \pm 0,28 \text{ mm}$ (*Akyol i sar.*, 2008). *Hatjina i sar.* (2014) daju preporuku da dijometri ne bi smeli da budu manji od 1,2 mm. U našem ogledu, srednja vrednost dijametra spermateka kod svih ispitivanih grupa iznosila je 1,24 mm.

S obzirom da su prethodno bili navedeni i analizirani direktni parametri kvaliteta matica, u ovom delu ćemo napraviti osvrt na indirektnne parametre kvaliteta matica. Ovi parametri predstavljaju jačinu društava (u našem slučaju nukleusa) tj. kompaktnost legla i broja pčela. Indirektni parametri su od velike važnosti i u praksi vrlo često jedini sud koji odlučuje o njenom kvalitetu. Za razliku od direktnih, pri ocenjivanju indirektnih parametara kvaliteta matice, maticu nije potrebno žrtvovati. U našem radu, kvalitet legla smo ocenjivali preko njegove maksimalne i prosečne kompaktnosti. Maksimalna kompaktnost – podrazumeva broj poklopljenih ćelija u jednom polju (10x10) na najboljem delu rama (L_{\max}), dok prosečna kompaktnost predstavlja četiri najbolja polja sa leglom (10x10) podeljena sa istim brojem ($L_{\bar{x}}$) (detaljnije objašnjeno u *Materijal i metod rada*). U tabeli 11. prikazane su vrednosti maksimalne kompaktnosti legla.

Tabela 11. Maksimalna kompaktnost legla (L_{\max})

Nukleusi	Varijante oglada				
	S grupa	P grupa	F grupa	N grupa	rojidbene
1	92	90	98	92	96
2	80	99	77	75	97
3	91	95	97	92	50
4	83	93	85	91	92
5	92	89	96	93	92
6	94	71	91	90	95
7	93	95	90	86	90
8	95	74	78	86	78
Aritmetička sredina¹	90,00 ^a	88,25 ^a	89,00 ^a	88,13 ^a	86,25 ^a
Standardna devijacija (σ)	5,45	10,24	8,28	5,94	15,81
Koeficijent varijacije (CV%)	6,06	11,60	9,30	6,74	18,33

^{a,b,c...} Vrednosti za aritmetičku sredinu su grupisane na osnovu Dankanovog (Duncan) testa ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.

¹ Značajnost na osnovu F testa: $P = 0,959035$ (ns)

Pored maksimalne kompaktnosti, ocenjena je i prosečna kompaktnost legla istih nukleusa (tabela 12).

Tabela 12. Prosečna kompaktnost legla ($L_{\bar{x}}$)

Košnice	Varijante ogleđa				
	S grupa	P grupa	F grupa	N grupa	rojdbene
1	90	88	94	91	94
2	75	94	71	72	94
3	89	93	96	91	46
4	72	92	81	87	88
5	90	89	90	92	87
6	86	64	87	90	92
7	91	95	88	82	87
8	92	67	69	85	76
Aritmetička sredina¹	85,63 ^a	85,25 ^a	84,50 ^a	86,25 ^a	83,00 ^a
Standardna devijacija (σ)	7,73	12,44	10,04	6,71	16,03
Koeficijent varijacije (CV%)	9,02	14,59	11,88	7,78	19,31

^{a,b,c...} Vrednosti za aritmetičku sredinu su grupisane na osnovu Dankanovog (Duncan) testa ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.
¹ Značajnost na osnovu F testa: P = 0,981382 (ns)

Interesantno je da kompaktnost legla, kako u maksimalnim tako i u prosečnim vrednostima, nije pokazala značajnost kod ispitivanih grupa. Prema našem ogledu, ovo saznanje nam ukazuje da mlade, tek sparene matice, nezavisno od tipa ishrane ne ispoljavaju razliku u prvom periodu njihove nosivosti. Da bi se razlike pojavile verovatno je neophodno njihovo duže praćenje. Ovo ukazuje i na činjenicu da šestonedeljno testiranje matice nije dovoljan period da bi se sa tačnošću odredila potencijalna nosivost i kvalitet legla prema njegovoj kompaktnosti.

Broj pčela, kao indirektni parametar, je ocenjen i dat u sledećoj tabeli:

Tabela 13. Broj pčela na srednjem ramu nukleusa

Košnice	Varijante ogleđa				
	S grupa	P grupa	F grupa	N grupa	rojdbene
1	559	412	321	710	484
2	393	496	722	571	706
3	530	339	357	607	753
4	527	584	357	463	655
5	616	472	675	392	830
6	604	563	355	415	536
7	584	694	488	490	501
8	373	630	394	605	769
Aritmetička sredina¹	523,25 ^{a,b}	523,75 ^{a,b}	458,63 ^a	531,63 ^{a,b}	654,25 ^b
Standardna devijacija (σ)	92,34	116,81	156,55	109,53	132,52
Koeficijent varijacije (CV%)	17,65	22,30	34,13	20,60	20,26

^{a,b,c...} Vrednosti za aritmetičku sredinu su grupisane na osnovu Dankanovog (Duncan) testa ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istom redu koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.
¹ Značajnost na osnovu F testa: P = 0,048844 (*)

Matice dobijene prirodnim putem imale su veći broj pčela u poređenju sa F grupom dok u poređenju sa ostalim grupama nije bilo statistički značajne razlike. Broj pčela je jedini parametar koji je pokazao superiornost prirodno dobijenih matice u odnosu na veštački dobijene matice. Poređenjem morfološko-reproduktivnih karakteristika matice dobijenih prirodnim i veštačkim putem nije dalo rezultate u korist prirodno dobijenih matice. Matice dobijene prirodnim putem imale su manju telesnu masu, manji broj jajnih cevčica i manji dijametar spermateka u poređenju sa P grupom. Slične tvrdnje navode i *Abbasi i sar. (2015)* gde veštački način (putem presađivanja) daje bolje rezultate od prirodnog načina proizvodnje matice.

Veći procenat kompaktnosti legla, treba da rezultira većim brojem izvedenih pčela. S obzirom da je kompaktnost legla bila bez značajne razlike kod svih grupa, dobijena razlika u broju pčela, u korist rojidbenih matice, teško je objašnjiva. S obzirom da izvedeni eksperiment nije u potpuno kontrolisanim uslovima, već pripada tzv. poljskom eksperimentu (engl. *field experiment*), ovakve razlike se dešavaju usled uticaja drugih nekontrolisanih faktora.

Prema svim gore navedenim i sakupljenim podacima uočena je pozitivna korelacija između telesnih masa matice i mase jajnika ($r = 0,666$), broja ovariola ($r = 0,452$) i dijametra spermateke ($r = 0,364$). Dobijena je i pozitivna korelacija između mase jajnika i broja ovariola ($r = 0,465$) (tabela 14). Ovi podaci nedvosmisleno dokazuju da je masa matice veoma bitan faktor u proceni njenog kvaliteta. Krupnije matice, prema našim rezultatima, posedovaće veću masu jajnika, veći broj ovariola i veću zapreminu spermateke.

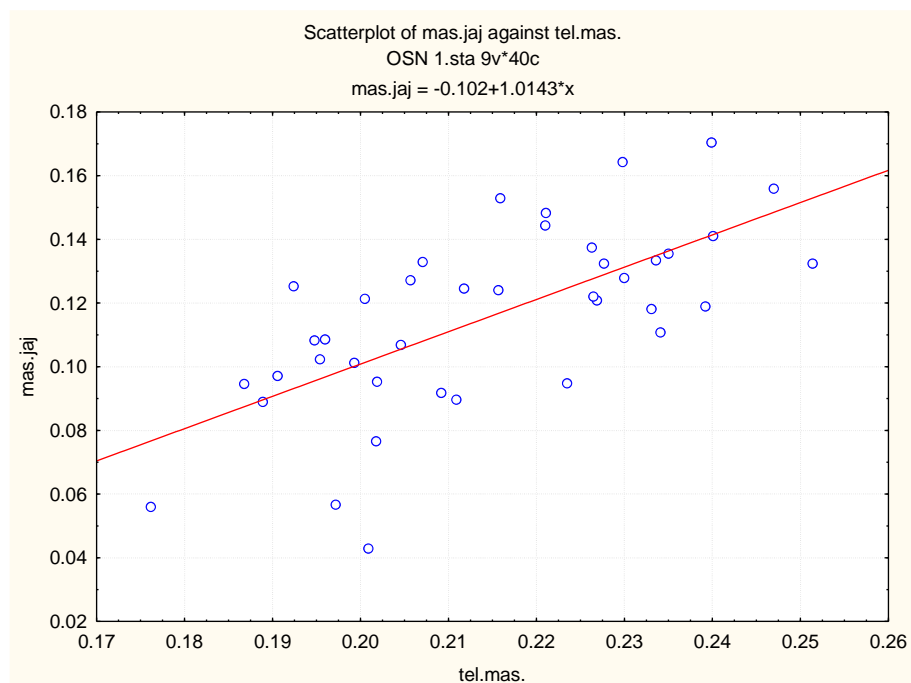
Prema sakupljenim podacima nije uočena ni jedna korelacija između matice različitih grupa i jačine nukleusa. Da bi se pojavile korelacije i da bi mogli da donosimo sud o kvalitetu matice preko njene kompaktnosti legla i broja pčela, zaključujemo da je maticu potrebno testirati duži vremenski period, gde bi se troramni nukleusi sa pripadajućim maticama i pčelama proširivala i razvijala u proizvodna društva, kao i njihovo dalje praćenje što dodatno poskupljuje ceo ogled i uključivanje više ljudi za njegovu realizaciju. Ovu dinamiku razvoja nukleusa trebalo bi ispratiti prihranom istim tipom hrane kao u odgajivačkim društvima koja su proizvodila eksperimentalne matice. U šestonedeljnom startu nosivosti, sve mlade matice, koje su se sparile i pronele, ispoljavaju podjednak efekat nosivosti sudeći prema kompaktnosti i broju pčela.

Tabela 14. Korelacije između osobina matice i društava

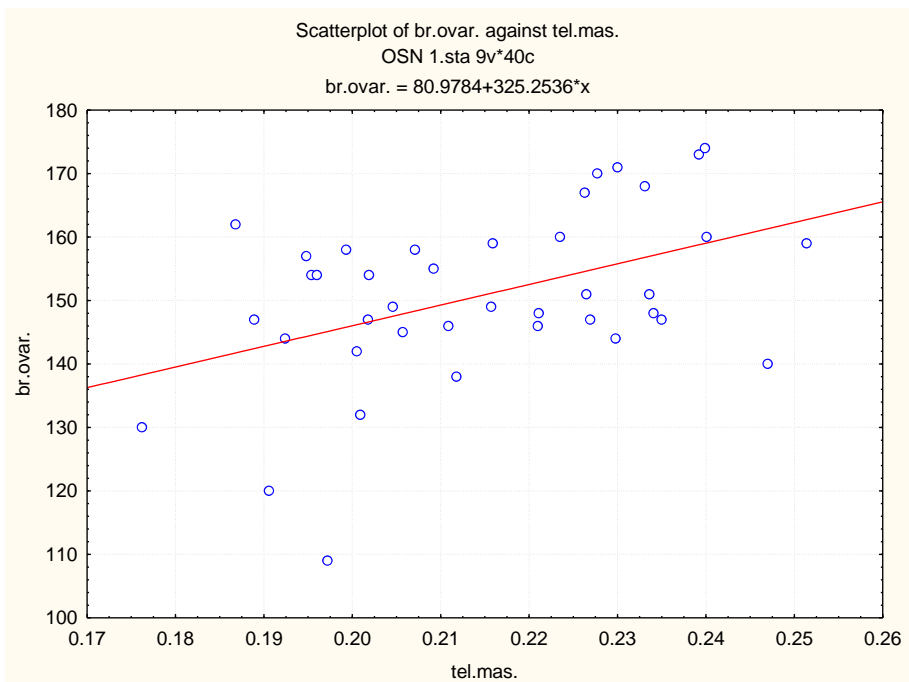
	tel.mas.	mas.jaj	br.ovar.	sperm.	k.max.	k.X	pčela
tel.mas.	--	0,666***	0,452**	0,364*	0,010	0,028	-0,086
mas.jaj		--	0,465**	0,0194	-0,060	-0,0428	-0,102
br.ovar.			--	0,260	0,084	0,057	-0,188
sperm.				--	-0,088	-0,019	0,084
k.max.					--	0,975***	-0,274
k.X						--	-0,258
pčela							--

Ove korelacije su u saglasnosti sa drugim autorima (Woyke, 1971; Akyol i sar., 2008; Kahya i sar., 2008).

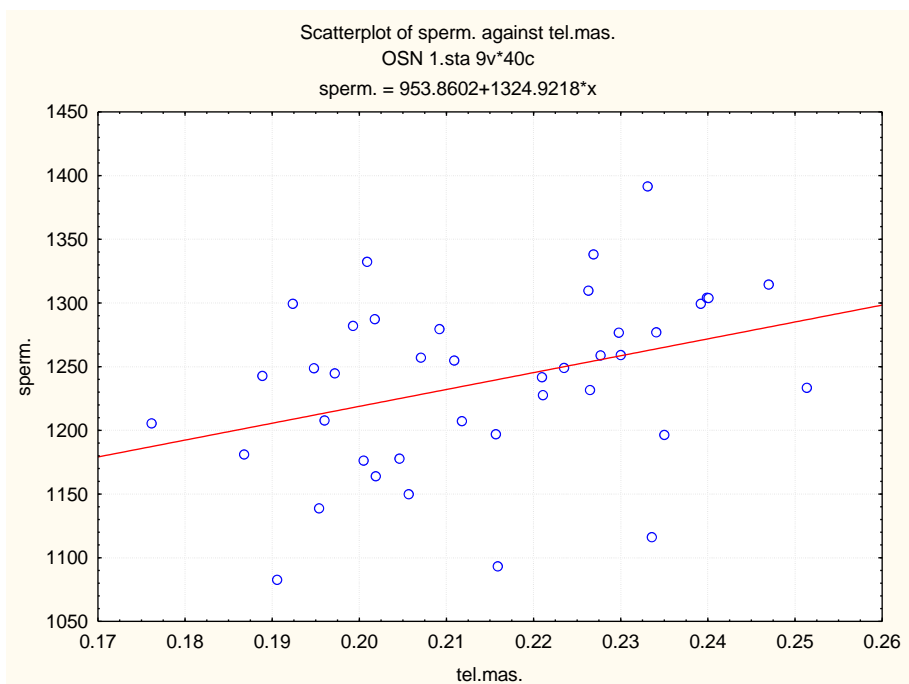
Radi vizuelizacije i razumljivijeg prikaza, u nastavku su izložena četiri grafikona (grafikon 6 - grafikon 9) linearne regresije o uticaju mase matice na masu jajnika, broj ovariola i dijametar spermateke, kao i između mase jajnika i broja ovariola.



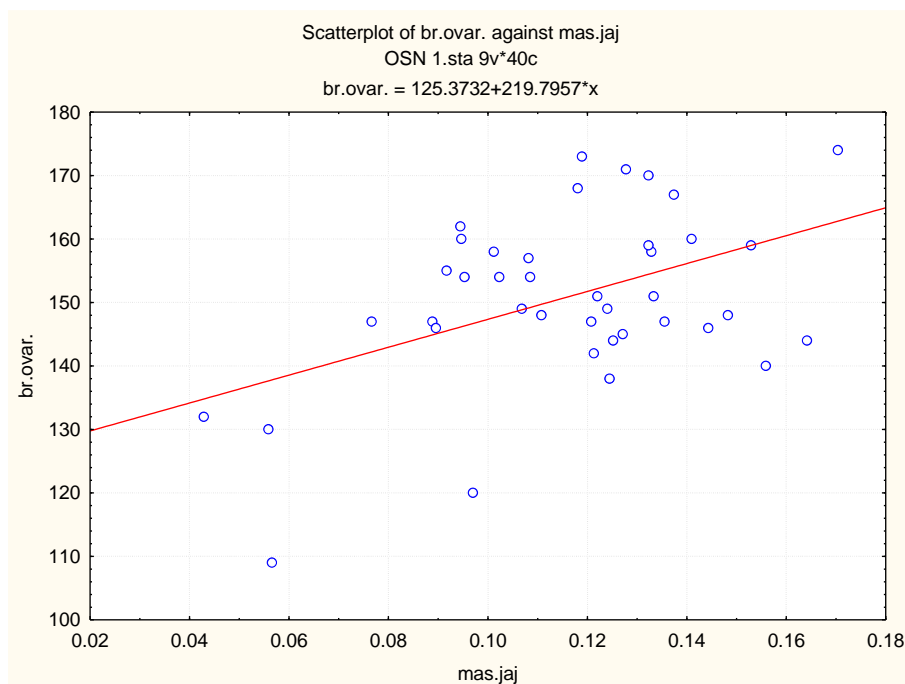
Grafikon 6. Uticaj mase matice na masu jajnika



Grafikon 7. Uticaj mase matica na broj ovariola



Grafikon 8. Uticaj mase matica na dijаметar spermateke



Grafikon 9. Uticaj mase jajnika na broj ovariola

Navedene korelacije između navedenih svojstava bile su očekivane s obzirom na njihovu međusobnu, samorazumljivu, povezanost (veća masa matice usloviće veću masu jajnika, broj ovariola itd). Dobijene korelacije su u skladu sa drugim autorima (Tarpy i sar., 2013; Kaftanoglu i sar., 2000; Collins i Pettis, 2013; Woyke, 1971).

5.4. Analiza vitelogenina

Kod prikaza podataka (grafički i tabelarno) u tabelama su dati proseci, standardne devijacije, koeficijenti varijacije i standardne greške proseka, dok su u grafikonima izloženi vrednosti za prosek, prosek \pm standardna greška i interval poverenja za $p = 0,05$, na osnovu standardne greške. Pošto su vrednosti $2^{-\Delta\Delta Ct}$ računane kao povećanje ili smanjenje ekspresije vitelogeninskog gena u odnosu na kontrolu, kod nje je ta vrednost uvek jednaka jedinici, pa pokazatelji varijacije ne postoje (jednaki su nuli) i nisu prikazani.

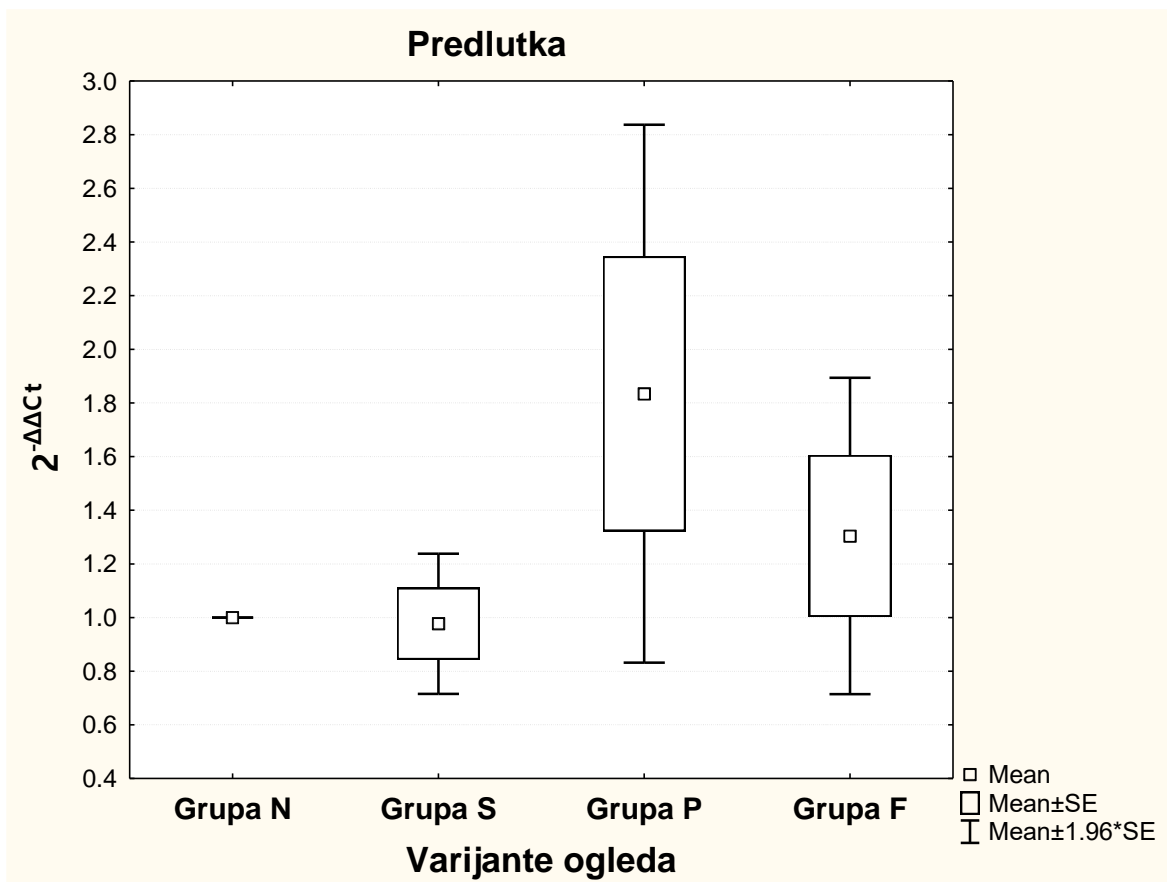
Tabela 15. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama u odnosu na N grupu (kontrola; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$)

Poreklo uzoraka	Vrednost	Varijante ogleđa ¹			
		N grupa	S grupa	P grupa	F grupa
Predlutka	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,00 ²	0,98	1,83	1,30
	SD	--	0,38	1,45	0,85
	CV%	--	38,60	78,87	65,27
	SE($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	--	0,13	0,51	0,30
Lutka	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,00 ²	0,82	2,38	0,82
	SD	--	0,58	3,05	0,55
	CV%	--	71,50	128,27	66,87
	SE($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	--	0,21	1,08	0,19
Matica	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,00 ²	3,77	1,87	3,95
	SD	--	7,38	3,29	7,86
	CV%	--	195,98	175,63	199,22
	SE($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	--	2,61	1,16	2,78
Jajnik	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,00 ²	1,63	1,40	0,63
	SD	--	1,66	1,74	0,76
	CV%	--	102,14	109,94	87,21
	SE($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	--	0,59	0,54	0,27

¹ N grupa – kontrola bez prihrane; S grupa – prihrana šećernim sirupom; P grupa – prihrana medom i polenom; F grupa – prihrana polenskom zamenom.

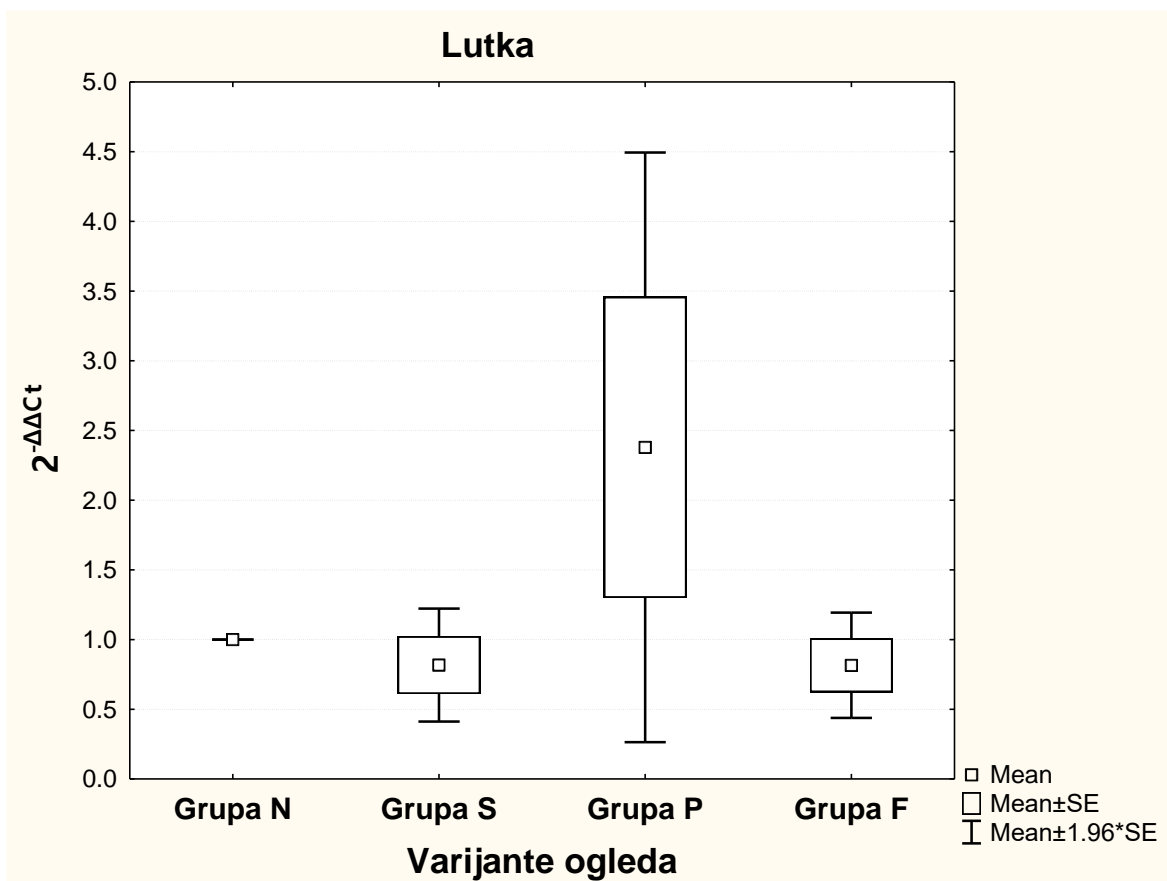
² Razlike između vrednosti $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nisu bile značajne na osnovu *Kruskal-Wallis* testa i *Mann-Whitney U* testova ($\alpha = 0,05$).

U tabeli (tabela 15) dat je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama u odnosu na N grupu. Iako postoje uslovi za primenu parametrijskih testova značajnosti, zbog visokih vrednosti standardne devijacije i koeficijenta varijacije, rađeni su neparametrijski testovi značajnosti (*Kruskal-Wallis* test i *Mann-Whitney U* test), mada je i *t*-test davao isti rezultat. Ni u jednom ispitivanom stadijumu razvića nije utvrđena statistički značajna razlika u nivou ekspresije vitelogeninskog gena između ispitivanih tretmana u odnosu na kontrolu (N-grupa). Kada se pogledaju vrednosti, naročito u stadijumu matice, gde je kod S i F grupe ekspresija vitelogeninskog gena bila gotovo četiri puta veća u odnosu na kontrolu, vidi se da ispitivani tretmani povećavaju nivo ekspresije, ali su istovremeno, zbog visoke standardne devijacije, te razlike beznačajne. Visoka standardna devijacija je bila izazvana razlikama u vrednosti Ct između pojedinačnih uzoraka unutar istog stadijuma razvića i ispitivanog tretmana. To ukazuje na mogućnost dalje optimizacije procesa izolacije iRNK, reverzne transkripcije i same PCR reakcije. Grafički prikaz navedenih vrednosti dat je u grafikonima (grafikon 10 – grafikon 13).



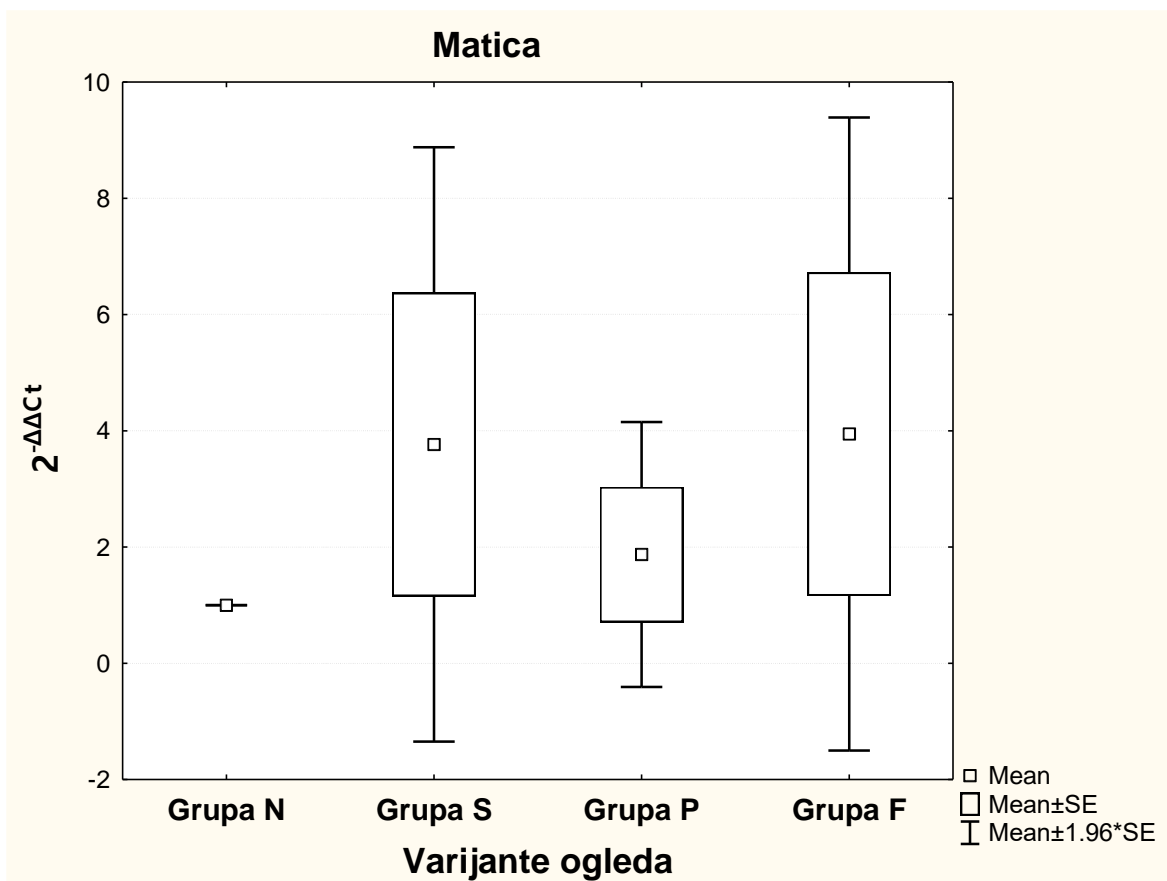
Grafikon 10. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena kod predlutki u odnosu na N grupu

U grafikonu 10. predstavljen je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) kod predlutki, normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama u odnosu na N grupu (kontrola; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$).



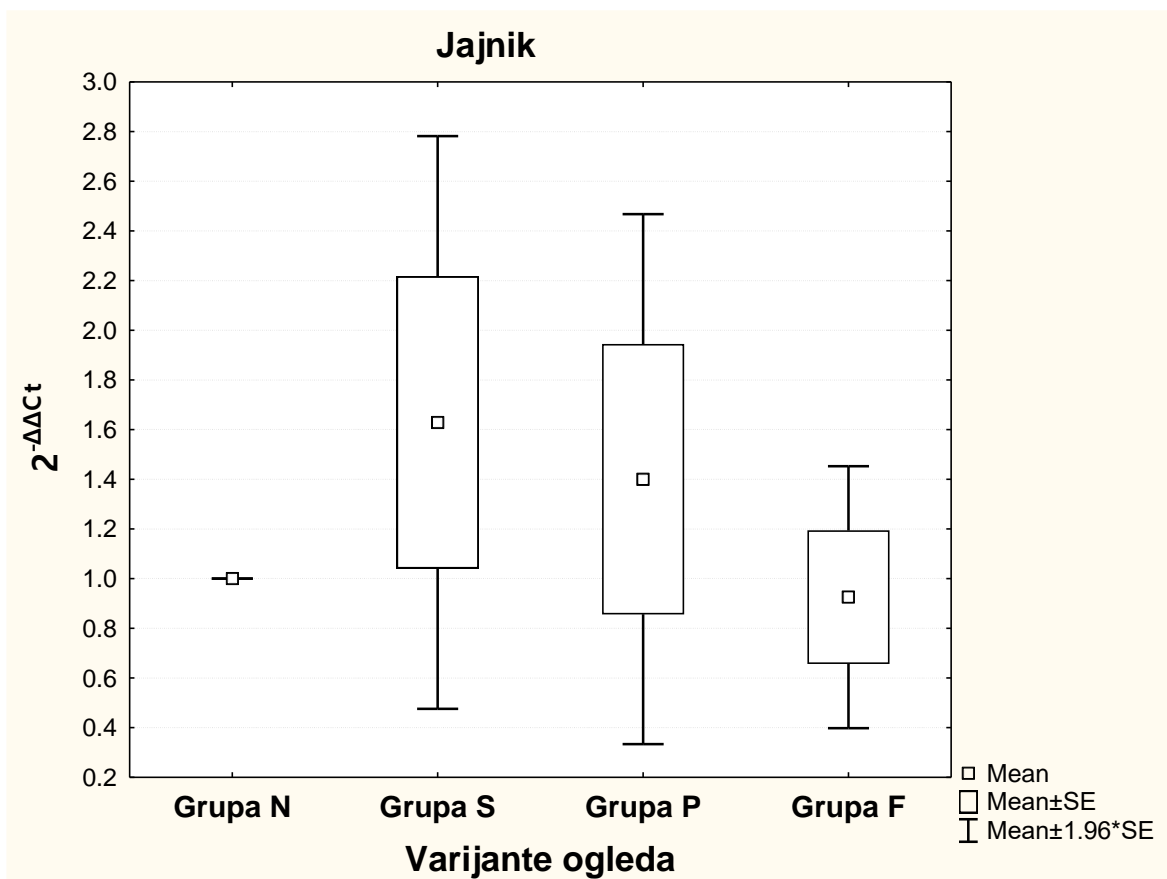
Grafikon 11. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena kod lutki u odnosu na N grupu

U grafikonu 11. predstavljen je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) kod lutki, normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama u odnosu na N grupu (kontrola; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$).



Grafikon 12. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena kod matica u odnosu na N grupu

U grafikonu grafikonu 12. predstavljen je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) kod matica, normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama u odnosu na N grupu (kontrola; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$).



Grafikonu 13. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena u jajnicima u odnosu na N grupu

U grafikonu 13. predstavljen je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) u jajnicima, normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama u odnosu na N grupu (kontrola; $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$).

Literaturni podaci navode da ishrana utiče na sintezu vitelogenina, jer je dokazano da sa povećanjem količine polena dolazi do povećanja nivoa vitelogenina, kao i da polen značajno povećava ekspresiju gena za vitelogenin, a posebno polen bogat proteinima (npr. polen *Rubus sp.*) i lipidima (npr. polen *Erica sp.*), što je razumljivo s obzirom da polen podstiče razvoj masnih tela koja su mesta sinteze ovih jedinjenja (Alaux i sar., 2010, Di Pasquale i sar., 2013, Wang i sar., 2014). Naši dobijeni rezultati nisu pokazali statističku značajnu razliku u ekspresiji gena za vitelogenin navedenih stadijuma između tretmana.

Corona i sar. (2005) navode da ekspresije gena ne zavise samo od ishrane već i od dela tkiva u kome se date ćelije nalaze, kao i starosti organizma. Tako je između matica starih jedan dan i matica starih jednu godinu razlika bila i do 20x u ekspresiji

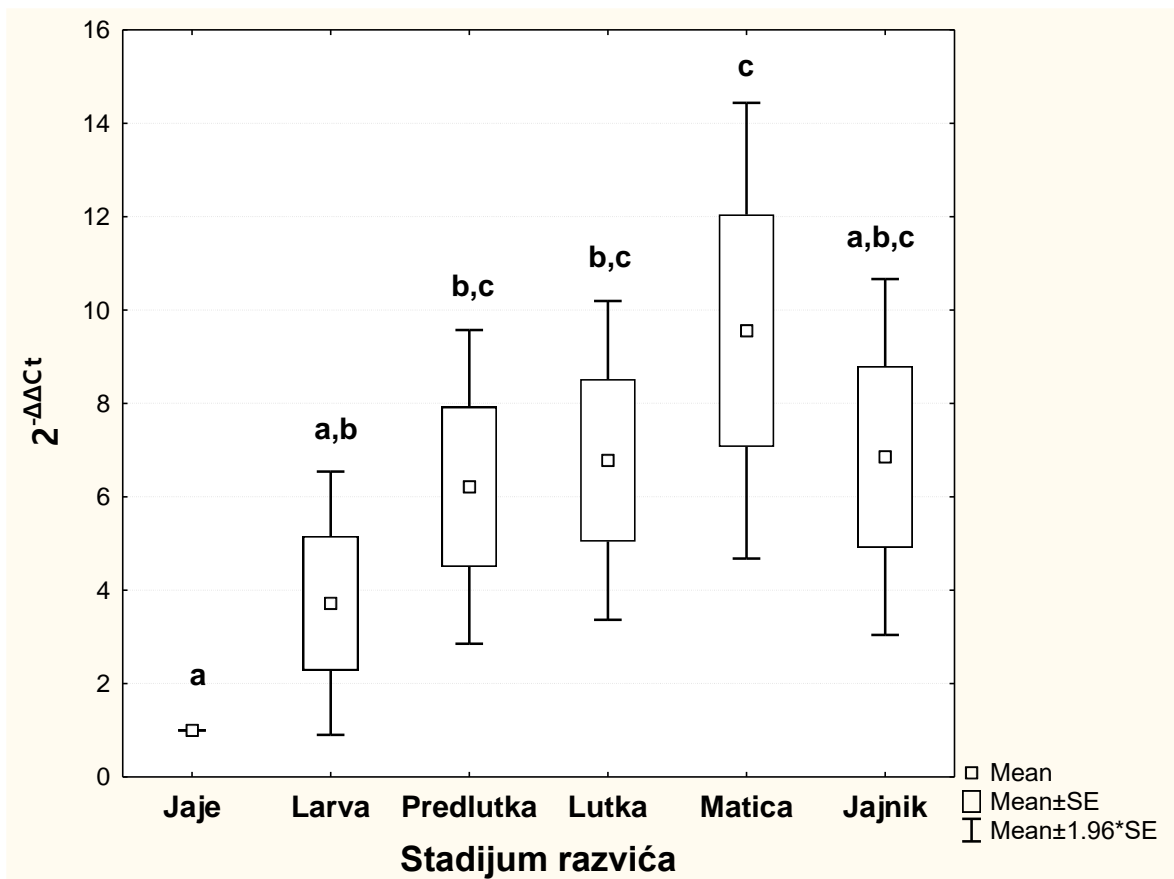
određenih gena, zapravo došlo je do razlika u mozgu i abdomenu dok u toraksu nije (Corona i sar., 2005). U našem radu nisu vršena poređenja tokom starenja samih matica i razlike u tkivnim celinama. Imajući u vidu navedeno, moguće da bi do razlike došlo tokom starenja matica, kao i u komparaciji jajnika sa drugim delovima njenog tela.

Tabela 16. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u različitim stadijumima razvića u odnosu na jaje (kontrola; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$)

Stadijum razvića	Vrednost			
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	SD	CV%	SE($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
Jaje	1,00 ^a	--	--	--
Larva	3,72 ^{a,b}	4,07	109,30	1,44
Predlutka	6,21 ^{b,c}	4,85	78,02	1,71
Lutka	6,78 ^{b,c}	4,93	72,64	1,74
Matica	9,56 ^c	7,04	73,66	2,49
Jajnik matice	6,85 ^{a,b,c}	5,50	80,25	1,94

^{a,b,c...} Vrednosti za aritmetičku sredinu su grupisane na osnovu *Mann-Whitney U* testova ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istoj koloni koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.

U tabeli 16. prikazan je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) praćen u kontrolnoj (N) grupi, normalizovan prema genu za β -aktin, u različitim stadijumima razvića u odnosu na jaje. Primetan je porast aktivnosti vitelogeninskog gena prema adultnom stadijumu. Najveća aktivnost ovog gena bila je zabeležena kod celih matica (9,56 x u odnosu na jaje), koja se značajno razlikovala od stadijuma jajeta (1 x) i larve (3,72 x), ali se nije značajno razlikovala u odnosu na stadijum predlutke (6,21 x), lutke (6,78 x) i u odnosu na jajnik matice (6,85 x). U odnosu na jaje, značajno veća aktivnost vitelogeninskog gena uočena je kod stadijuma predlutke i lutke. Grafički prikaz navedenih vrednosti dat je u sledećem grafikonu (grafikon 14).



Grafikon 14. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena u različitim stadijumima razvića u odnosu na jaje

U grafikonu 14. predstavljen je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u različitim stadijumima razvića u odnosu na jaje (kontrola; $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$).

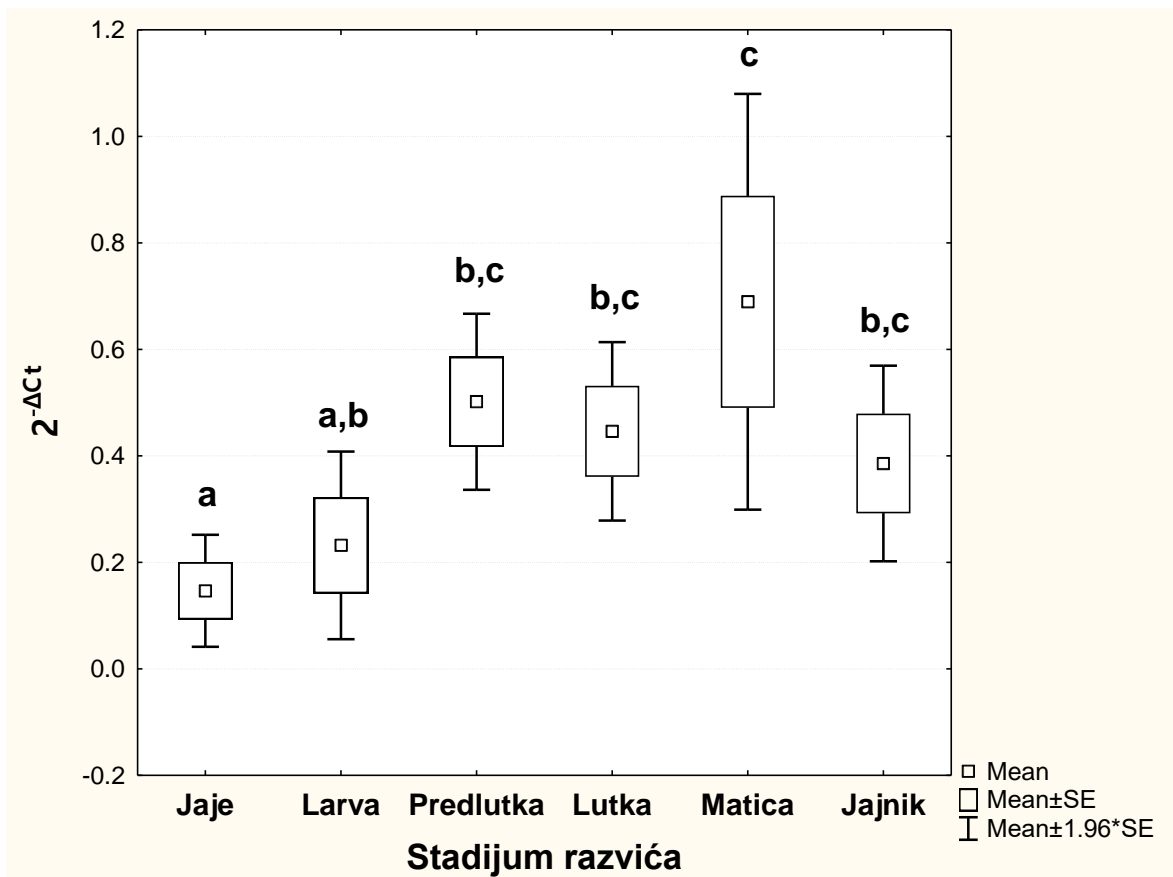
U narednoj tabeli (tabela 17) data je analiza istog poređenja sa transformacijom $2^{-\Delta C_t}$, normalizovan prema genu za β -aktin, sa apsolutnim vrednostima (bez upoređivanja sa stadijumom jaje). Primetno je, za razliku od prethodne obrade, da se u ovom slučaju ispoljila signifikantna razlika u ekspresivnosti vitelogenina između stadijuma jajeta i jajnika (sparenih) matica.

Tabela 17. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta Ct}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u različitim stadijumima razvića

Stadijum razvića	Vrednost			
	$2^{-\Delta Ct}$	SD	CV%	SE($2^{-\Delta Ct}$)
Jaje	0,15 ^a	0,15	103,59	0,05
Larva	0,23 ^{a,b}	0,25	109,57	0,09
Predlutka	0,50 ^{b,c}	0,24	47,53	0,08
Lutka	0,45 ^{b,c}	0,24	54,18	0,09
Matica	0,69 ^c	0,56	81,73	0,20
Jajnik matice	0,39 ^{b,c}	0,26	68,68	0,09

^{a,b,c...} Vrednosti za aritmetičku sredinu su grupisane na osnovu *Mann–Whitney U* testova ($\alpha = 0,05$), gde između vrednosti u istoj koloni koje su označene različitim slovima postoje statistički značajne razlike.

U tabeli 17. date su vrednosti za nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta Ct}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u različitim stadijumima razvića. Ekspresije prikazane kao $2^{-\Delta Ct}$ predstavljaju apsolutne vrednosti. Do najveće ekspresije i aktivnosti ispitivanog gena ispoljilo se kod adultnih, nesparenih matice. Kod matice zabeležena je 4,6 puta veća ekspresija nego kod stadijuma jajeta. U poređenju sa larvama, ekspresija ispitivanog gena kod matice bila je tri puta veća. Statistički značajna razlika je i u komparaciji jajeta sa stadijumima predlutke, lutke, matice i jajnika sparenih matice. Stadijum jajeta u ovim poređenjima je zabeležilo najmanju ekspresivnost. Iz izloženog se vidi da dolazi do značajne razlike u ekspresiji vitelogeninskog gena pri različitim stadijumima razvitka pčelinje matice. Grafički prikaz navedenih vrednosti dat je u grafikonu 15.



Grafikon 15. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena u različitim stadijumima razvića

U grafikonu 15. predstavljen je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta Ct}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u različitim stadijumima razvića.

Prema *Corona i sar.* (2007) transkripcija Vg u glavi i grudima čini 25% ukupne transkripcijske aktivnosti, dok su, prema svim tkivima, jajnici zabeležili najveći nivo. Iako nismo poredili ekspresiju u različitim tkivima (izuzev samog jajnika), iz naših dobijenih vrednosti se uočava da su jajnici, u komparaciji sa jajetom, larvom, predlutkom i lutkom, ispoljili najviše vrednosti.

Veoma važan segment našeg istraživanja se ogleda u tome da smo uspeli da detektujemo ekspresiju vitelogenina i u najranijim stadijumima razvitka pčelinje matice. Prema navodima *Barchuk i sar.* (2002) kod matice, vitelogenin se prvi put pojavljuje u fazi braon očiju sa srednje pigmentiranom kutikulom, dok se kod radilica vitelogenin kasnije pojavljuje u fazi tamne kutikule gde lutka ima izgled adulta, odnosno,

vitelogenin se prvi put pojavljuje kod matica otprilike 60 časova, a kod radilica oko 10 časova pre izvođenja.

Takođe prema navodima *Piulachs i sar.* (2003) navodi se da je kod matica iRNK vitelogenina najpre detektovana u stadijumu rane-srednje faze lutke, dok je kod radilica prvi put detektovana u kasnoj fazi lutke. U našoj studiji, uspeli smo, i dokazali, ekspresiju vitelogenina u ranijim fazama razvoja od gore navedenih.

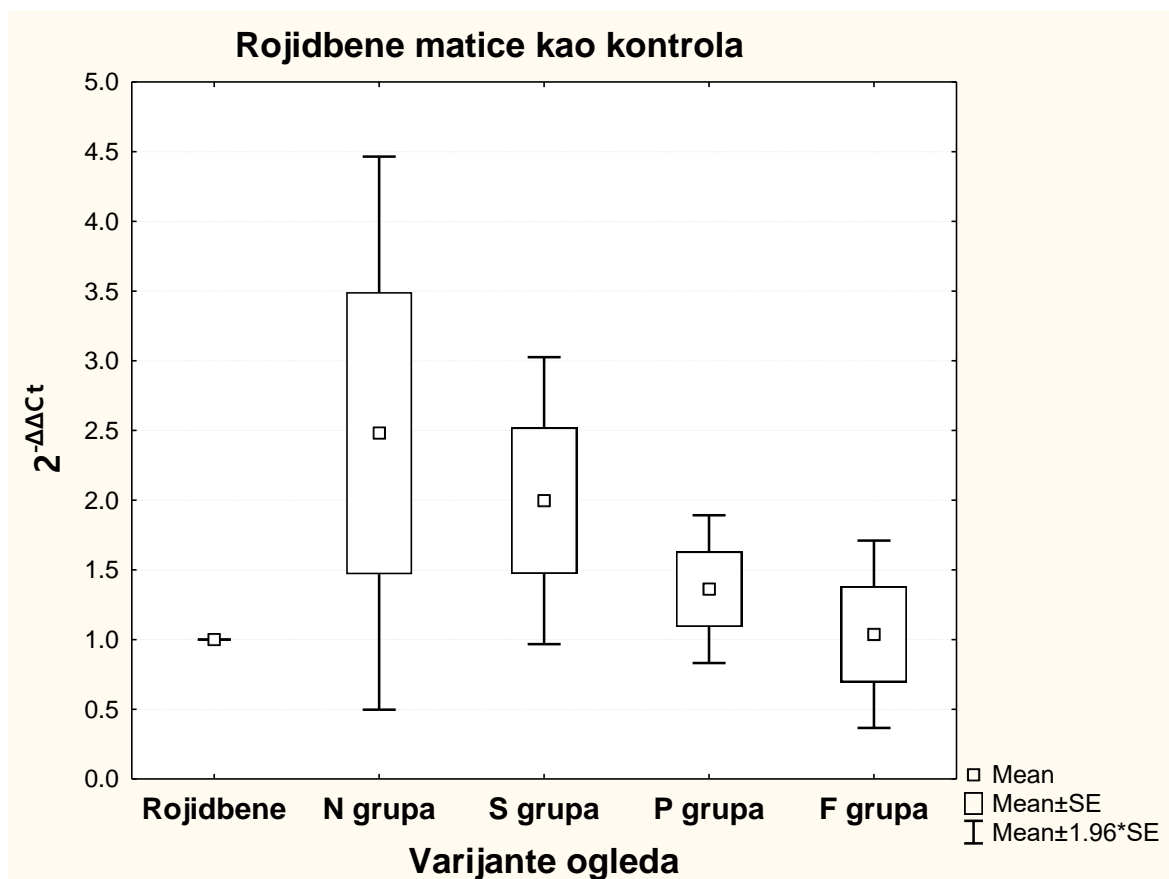
Tabela 18. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama u odnosu na rojdbene matice (kontrola; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$)

Poređenje prema	Vrednost	Varijante ogleda ¹				
		Rojdbene	N grupa	S grupa	P grupa	F grupa
Rojdbene	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	1,00 ²	2,48	2,00	1,36	1,04
	SD	--	2,86	1,49	0,77	0,97
	CV%	--	115,39	74,39	56,19	93,45
	SE($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	--	1,01	0,53	0,27	0,34

¹ Rojdbene – rojdbene matice; N grupa – kontrola bez prihrane; S grupa – prihrana šećernim sirupom; P grupa – prihrana medom i polenom; F grupa – prihrana polenskom zamenom.

² Razlike između vrednosti $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nisu bile značajne na osnovu *Kruskal-Wallis* testa i *Mann-Whitney U* testova ($\alpha = 0,05$).

U tabeli 18. dat je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama u odnosu na rojdbene matice (kontrola; $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$). Pored navedenih četiri grupa (N, S, P i F) gde su se, pod uticajem različite ishrane, veštačkim putem dobijale matice, ispitivane su i prirodno dobijene matice. Njihovo poređenje, pored morfološko-reproduktivnih osobina, vršeno je i na osnovu vitelogenske ekspresije. Koliko je nama poznato, trenutno ne postoji ni jedan rad koji vrši poređenje u ekspresiji gena prirodno i veštački dobijenih matica, te su poređenje i diskusija sa dobijenim rezultatima drugih autora neizvodljiva. Dobijeni rezultati navode da ne postoje značajne razlike u ekspresiji vitelogeninskog gena kod veštački i prirodno dobijenih matica. Grafički prikaz navedenih vrednosti dat je u grafikonu 16.



Grafikon 16. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena u eksperimentalnim grupama u odnosu na rojdbene matice

U grafikonu (grafikon 16) predstavljen je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama u odnosu na rojdbene matice (etalon; $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1$).

Navedeni rezultati govore o nepostojanju razlike u ekspresiji vitelogeninskog gena kod prirodno i veštački dobijenih matice, u odnosu na rojdbene matice kao etalona. U narednoj tabeli data je analiza istog poređenja sa transformacijom $2^{-\Delta C_t}$, normalizovan prema genu za β -aktin, sa apsolutnim vrednostima (bez etalona).

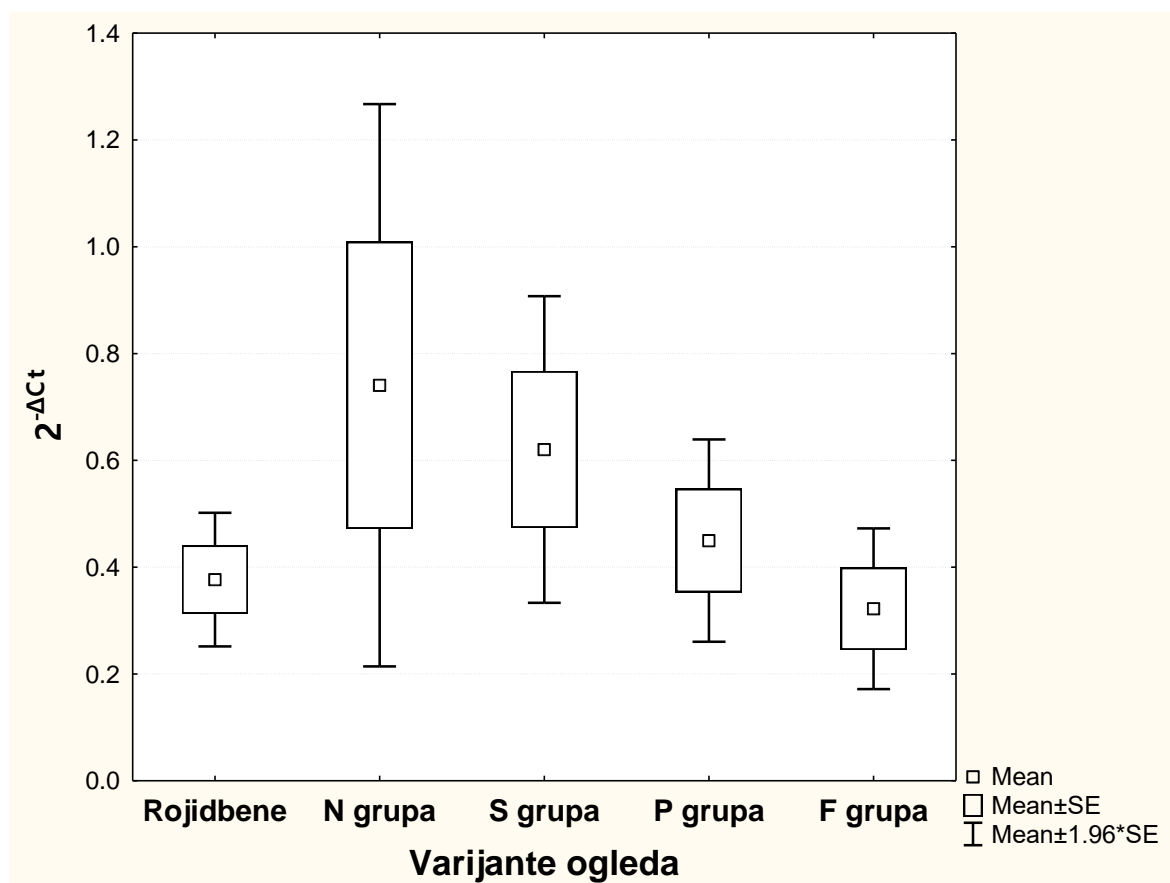
Tabela 19. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta Ct}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama

Vrednost	Varijante ogleda ¹				
	Rojidbene	N grupa	S grupa	P grupa	F grupa
$2^{-\Delta Ct}$	0,38 ²	0,74	0,62	0,45	0,32
SD	0,18	0,76	0,41	0,27	0,22
CV%	47,92	102,56	66,78	60,78	67,40
SE($2^{-\Delta Ct}$)	0,06	0,27	0,15	0,10	0,08

¹ Rojidbene – rojidbene matice; N grupa – kontrola bez prihrane; S grupa – prihrana šćernim sirupom; P grupa – prihrana medom i polenom; F grupa – prihrana polenskom zamenom.

² Razlike između vrednosti $2^{-\Delta Ct}$ nisu bile značajne na osnovu *Kruskal-Wallis* testa i *Mann-Whitney U* testova ($\alpha = 0,05$).

Ni u ovom slučaju, na osnovu navedenih testova značajnosti, nije došlo da signifikantnih razlika u ispitivanim grupama poređenjem njihovih apsolutnih vrednosti $2^{-\Delta Ct}$. Grafički prikaz navedenih vrednosti dat je u grafikonu 17.



Grafikon 17. Nivo ekspresije vitelogeninskog gena u eksperimentalnim grupama

U grafikonu 17. predstavljen je nivo ekspresije vitelogeninskog gena ($2^{-\Delta Ct}$), normalizovan prema genu za β -aktin, u eksperimentalnim grupama.

S obzirom da izloženi rad pripada ogledu tzv. „field experiment“ teško je potpuno kontrolisati sve uslove kako bi razlike postale izraženije. Iako neadekvatna ishrana tokom odgajivanja matičnjaka može uticati negativno na proizvodnju i kvalitet budućih matica, društvo će uvek pokušavati da se „bori“ raznim mehanizmima kako bi nadoknadilo određene nedostatke kojim smo ga prisilno izložili. Jedan od načina borbe se ogleda u mogućnosti radilica da mobilišu endogene rezerve kako bi nadoknadile neophodne materije koje nisu bile prisutne u datim hranama. Takođe, u ekstremnim situacijama, dolazi do pojave kanibalizma kao proteinske nadoknade (*Schmickl i Crailsheim, 2002*). Navedeni, kao i mnogi drugi prirodni mehanizmi, ne sumnjivo mogu delom maskirati uticaj dodate ishrane i uticati na određene rezultate našeg ogleda. Iako bi prevazilazila okvire našeg ogleda, dublja analiza bi podrazumevala nastavak ogleda kod ispitivanih grupa u pogledu vitalnosti i pčela radilica (odgajivačkih društava) koje su prerađivale dobijenu hranu i učestvovala u produkciji matične mleči, njihovih fizioloških promena, sastava hemolimfe, njihovih telesnih rezervi, kvaliteta izlučenog mleča kao i mnogih drugih faktora koji kumulativno-poslednično utiču na dobijanje budućih matica.

Veliki uticaj na tok i rezultate našeg ogleda se ogleda u početnom povlačenju i ishrani matičnjaka od strane odgajivačkih društava. Veći broj povučenih matičnjaka utiče na slabiju ishranu i negu svakog pojedinačnog matičnjaka, tako da bi optimalno bilo ukoliko bi sva društva dala isti broj matičnjaka na samom početku ogleda. Broj povučenih matičnjaka prilikom presađivanja je parametar koji zavisi od mnogih faktora na koje dosadašnje razumevanje ovog socijalnog insekta ne može dati odgovore. Da li je veći broj prijema larvi rezultat trenutnog radnog raspoloženja pčela, ili određene realne potrebe za proizvodnjom nove matice? Da li je broj prijema larvi odluka, nama nedokučivog, pčelinjeg demokratskog odlučivanja? Uz sve ovo treba imati na umu da su društva tokom proizvodnje matičnjaka sve vreme imale prisutnu maticu gde se postavlja pitanje motiva i njihove zainteresovanosti za negovanjem novododatih matičnjaka. I pored navedenih poteškoća, rezultati ovog rada ukazuju na određene razlike ispitivanih grupa i mogu poslužiti kao uporište za dalja istraživanja.

Matice iz P grupe bile su u proseku superiornije od drugih grupa kao i prirodno dobijenih matica. Način dobijanja matica (komercijalno ili prirodno) nije dalo bitnu razliku u korist prirodno dobijenih matica. Hranjenje zajednica polenskom substitucijom, u našem ogledu, ne predstavlja rešenje problema ka dobijanju kvalitetnijih matica poboljšanih reproduktivnih sposobnosti. Polen je glavni i najbolji izvor proteina za medonosne pčele, a njegova upotreba, zajedno sa medom, važan segment pri komercijalnoj proizvodnji pčelinjih matica. Očekivali smo, i potvrdili, da su matice iz P grupe dale najbolje rezultate o morfološko-reproduktivnim osobinama kvaliteta matica.

Dobijanje kvalitetne matice predstavlja krunu pčelarstva i jedno je od najvažnijih pitanja u apitehnici. Svi napori uloženi u otkrivanju mehanizama i pojedinostima u dobijanju kvalitetnijih matica su od velike važnosti kako za nauku tako i za pčelarsku praksu. Međutim, malo je podataka o direktnoj vezi između tipa ishrane i kvaliteta dobijenih matičnjaka-matica, kao i nutrigenomskim istraživanjima tokom ontogeneze pčelinjih matica i njenih budućih performansi. Ipak, činjenica je da je prihranjivanje odgajivačkih zajednica prilikom komercijalne proizvodnje matica prihvaćeno kao rutinska mera u pčelarskoj praksi.

6. Zaključak

Tokom ogleda došlo se do sledećih zaključaka:

1. Ishrana odgajivačkih pčelinjih društava šećerom značajno je stimulisala prijem matičnjaka, jer je u grupi hranjenoj šećerom bio najbolji prijem matičnjaka (85,8%) u odnosu na sve ostale grupe i procenat i pri tome značajno veći ($P < 0.05$) u odnosu na kontrolnu grupu (45,0%), ukazujući da je prihranjivanje pčela tokom proizvodnje matičnjaka neophodno kako bi se poboljšao procenat prijema.

2. Ishrana odgajivačkih društava šećerom pozitivno je uticala na težinu novoizleženih pčelinjih matica jer je u grupi hranjenoj šećerom prosečna telesna masa tih matica bila značajno veća ($P < 0.001$) u odnosu na sve ostale grupe.

3. Ishrana odgajivačkih društava medom i polenom dala je najbolji efekat kada je u pitanju masa sparenih matica, jer su matice iz grupe hranjene medom i polenom imale značajno veću ($P < 0.05$) telesnu masu od matica iz grupe koja je dobijala FeedBee®, kao i od matica iz rojidsbene grupe.

4. Ishrana medom i polenom doprinela je povećanju broja ovarijalnih cevčica i dijametra spermateke, s obzirom da je kod matica iz grupe hranjene medom i polenom zabeleženo značajno više ($P < 0.01$) ovarijalnih cevčica u odnosu na matice iz svih ostalih grupa, odnosno 8% više u odnosu na grupu koja je dobijala samo šećer, 14% više u odnosu na grupu koja je dobijala FeedBee® i 10% više u odnosu na kontrolnu i rojidsbenu grupu. Takođe, matice iz grupe hranjene medom i polenom imale značajno veću ($P < 0.05$) vrednost ovog parametra u poređenju sa rojidsbenim maticama. Ovim je dokazano da dodatkom prirodne hrane (meda i polena) bitno možemo povećati reproduktivni potencijal matica.

5. Tip ishrane nije statistički značajno uticao na kompaktnost legla sparenih matica u prvih šest nedelja njihove nosivosti.

6. Rojidsbene matice su imale značajno veći broj pčela ($P < 0.05$) u odnosu na matice iz grupe koja je dobijala FeedBee®, dok između svih ostalih grupa nije bilo značajnih razlika u pogledu ovog parametra.

7. Rojidsbene matice imale su značajno manji ($P < 0.01$) broj jajnih cevčica i značajno manje vrednosti ($P < 0.05$) telesne mase i dijametra spermateke u poređenju sa maticama iz grupe koja je hranjena medom i polenom. To znači da pri komercijalnom

uzgoju matica sa adekvatnom stimulativnom ishranom (med i polen) mogu da se ostvare bolji rezultati, nego pri dobijanju rojidbenih matica.

8. FeedBee® nije ispoljio pozitivan efekat na dužinu matičnjaka, obzirom da su matičnjaci iz grupe koja je dobijala FeedBee® bili značajno kraći ($P < 0.01$) u odnosu na matičnjake iz grupe hranjene šećerom i kontrolne grupe.

9. Širina matičnjaka je bila u slaboj pozitivnoj korelaciji sa telesnom masom matica ($r = 0,271$) kao i dužinom matičnjaka ($r = 0,241$), dok je dijametar otvora matičnjaka bio u srednjoj pozitivnoj korelaciji sa dužinom matičnjaka ($r = 0,332$).

10. Značajna korelacija utvrđena je između telesne mase matica i mase jajnika ($r = 0,666$), broja ovariola ($r = 0,452$) i dijametra spermateke ($r = 0,364$), kao i između mase jajnika i broja ovariola ($r = 0,465$).

11. Tip ishrane nije uticao na ekspresiju gena za vitelogenin jer nisu nađene statistički značajne razlike u nivou ekspresije gena za vitelogenin u svim ispitivanim razvojnim stadijuma između tretman grupa i kontrolne (N) grupe.

12. Između stadijuma pčelinjih matica utvrđene su značajne razlike ($P < 0.05$) u nivou ekspresije gena za vitelogenin, pri čemu je aktivnost gena za vitelogenin rasla tokom ontogeneze kontrolne (N) grupe.

13. Najveća aktivnost vitelogeninskog gena bila je kod adultnih matica i bila značajno ($P < 0.05$) veća u odnosu na stadijum jajeta i larve, ali se nije značajno razlikovala u odnosu na stadijum predlutke, lutke i u odnosu na ćelije jajnika matice. Aktivnost vitelogeninskog gena bila je značajno veća ($P < 0.05$) i kod stadijuma predlutke i lutke u odnosu na jaje.

14. Između veštački uzgojenih i rojidbenih adultnih matica nisu utvrđene statistički značajne razlike u ekspresiji vitelogeninskog gena kod ćelija jajnika sparenih matica.

7. Literatura

1. Abbasi, K.H., Shafiq, M., Ahmad, K.J., Razzaq, A., Saleem, M., Ullah, M.A. (2015): Performance of larval grafted queen vs queen produced through natural method in *Apis mellifera*. J. Entomo. Zotech. Stud, 3(2), 47-49.
2. Abdulaziz, S.A., Hassan, M.B., Ayman A.O. (2013): Queen morphometric and reproductive characters of *Apis mellifera jemenitica*, a native honey bee to Saudi Arabia. Bulletin of Insectology 66 (2), 239-244.
3. Akyol, E., Yeninar, H., Kaftanoglu, O. (2008): Live weight of queen honey bees (*Apis Mellifera* L.) predicts reproductive characteristics. J. Kans. Entomol. Soc. 81, 92–100.
4. Alaux, C., Dantec, C., Parrinello, H., Le Conte, Y. (2011): Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. BMC Genomics 12, 496.
5. Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y. (2010): Diet effects on honeybee immunocompetence. Biology letters, p.rsbl20090986.
6. Al-Fattah, M.A.A., Mazeed, A.M., Al-Hady, N.A. (2011): Quality and quantity of honeybee queens as affected by the number and distribution of queen cells within queen rearing colonies. J. Apic. Sci., 55(2), 31-41.
7. Amdam, G.V., Norberg, K., Hagen, A., Omholt, S.W. (2003): Social exploitation of vitellogenin. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 1799–1802.
8. Amdam, G.V., Omholt, S.W. (2003): The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. J. Theor. Biol. 223, 451–464.
9. Amdam, G.V., Simoes, Z.L.P., Hagen, A., Norberg, K., Schroder, K., Mikkelsen, O., Kirkwood, T.B.L., Omholt, S.W. (2004): Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. Exp. Gerontol. 39, 767–773.
10. Amro, A., Omar, M., Al-Ghamdi, A. (2016): Influence of different proteinaceous diets on consumption, brood rearing, and honey bee quality parameters under isolation conditions. Turk. J. Vet. Anim. Sci., 40(4), 468-475.
11. Andi, M.A., Ahmadi, A. (2014): Influence of vitamin C in sugar syrup on brood area, colony population, body weight and protein in honey bees. Int. J. Biosci., 4(6), 32-36.
12. Anisimov, S.V. (2008): Serial Analysis of Gene Expression (SAGE): 13 years of application in research. Curr. Pharm. Biotechnol. 9(5), 338-350.
13. Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J., Michaud, B., Odoux, J. Pham-Delegue, M. (2005): Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. Bull. Insect., 58(2), 107.
14. Avetisyan, G. A. (1961): The relation between interior and exterior characteristics of the queen and fertility and productivity of the bee colony. Proceedings of XVIII International Beekeeping Congress, 44-53.

15. Babendreier, D., Kalberer, N., Romeis, J., Fluri, P., Bigler, F. (2004): Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie*, 35, 293–300.
16. Barchuk, A. R., dos Santos Cristino, A., Kucharski, R., Simoes, Z.L.P., Maleszka R. (2007): Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera*. *BMC Dev. Biol.* 7: 70.
17. Barchuk, A.R., Bitondi, M.M.G. Paulino, Z.L.S. (2002): Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *J. Insect Sci.* 2(1), 1.
18. Barker R.J., Lehner Y. (1978): Laboratory comparison of high fructose corn syrup, grape syrup, honey, and sucrose syrup as maintenance food for caged honey bees, *Apidologie* 9, 111–116.
19. Belles, X. (2003): Vitellogenesis directed by juvenile hormone. In: Raikhel, A. (Ed.), *Reproductive Biology of Invertebrates*, vol. 9. Recent progress in Vitellogenesis. Wiley, New York.
20. Bitondi, M.M.G., Z.L.P. Simoes. (1996): The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titers in Africanized *Apis mellifera* workers. *J. Apic. Res.* 35, 27-36.
21. Bloch, G., Wheeler, D.E., Robinson, G.E. (2002): Endocrine influences on the organization of insect societies. *Hormones, Brain, and Behavior*, Vol. 3, 195–237.
22. Brodschneider, R., Crailsheim, K. (2010): Nutrition and health in honey bees. *Apidologie*, 41(3), 278-294.
23. Brodschneider, R., Hrassnigg, N., Vollmann, J., Petz, M., Riessberger-Gallé U., Crailsheim K. (2007): Liquid nutrition within a honeybee colony – who feeds? *Apidologie* 38, 492.
24. Büning, J., (1994): *The Insect Ovary, Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution*. ISBN 978-94-011-0741-9.
25. Burzynski, S.R., Patil, S., Ilkowska-Musial, E., Chitur, S., et al. (2008): Pathway analysis of the effect of chromatin remodeling agent phenylbutyrate on the brains of honeybees. *Society for Neuroscience*, Abstract 494.2/UU42.
26. Byrne, B.M., Gruber, M., (1989): The evolution of egg yolk proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 53, 33–69.
27. Capella, S. I.C., Hartfelder, K., *Cell Tissue Res.* (2002): 307: 265.
28. Carreck, N. L., Andree, M., Brent, C. S., Cox-Foster, D., Dade, H.A., Ellis, J. D. Hatjina, F., VanEngelsdorp, D. (2013): Standard methods for *Apis mellifera* anatomy and dissection. In: Dietemann V., Ellis J. D., Neumann P. (Eds.) *The Colloss beebook, Volume I: standard methods for Apis mellifera research*. *J. Apic. Res.* 52(4), 1-40.
29. Cengiz, M., Emsen, B., Dodologlu, A. (2009): Some characteristics of queen bees (*Apis mellifera* L.) rearing in queenright and queenless colonies. *J. Anim. Veterin. Adv.* 8(6), 1083-1085.

30. Chaimanee, V., Evans, J.D., Chen, Y., Jackson, C. Pettis, J.S. (2016): Sperm viability and gene expression in honey bee queens (*Apis mellifera*) following exposure to the neonicotinoid insecticide Imidacloprid and the organophosphate acaricide coumaphos. *J. Insect Phys.* 89, 1-8.
31. Chaud-Netto, J., Bueno, O.C. (1979): Number of ovarioles in workers of *Apis mellifera adansonii* and *Apis mellifera ligustica*: a comparative study. *J. Apic. Res.* 18, 260–263.
32. Chen, J.S., Sappington, W., Raikhel, A.S. (1997): Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals common ancestry. *J. Mol. Evol.* 44, 440–451.
33. Collins, A.M., Pettis, J.S. (2013): Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. *Apidologie*, 44, 351–356.
34. Contreras-Martinez, C.A., Contreras-Escareño, F., Macias-Macias, J.O., Tapia-Gonzalez, J.M., Petukhova, T. Guzman-Novoa, E. (2016): Effect of different substrates on the acceptance of grafted larvae in commercial honey bee (*Apis mellifera*) queen rearing. *J. Apic. Sci.* 61(2), 245-251.
35. Corona, M., Hughes, K.A., Weaver, D.B. Robinson, G.E. (2005): Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mechanisms of ageing and development*, 126(11), 1230-1238.
36. Corona, M., Velarde, R.A, Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A, Robinson, G.E. (2007): Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104(17), 7128-7133.
37. Crailsheim, K. (1992): The flow of jelly within a honeybee colony. *J. Comp. Physiol. B* 162, 681-689.
38. Crailsheim, K. Schneider L.H.W., Hrassnigg N., Bühlmann G., Brosch U., Gmeinbauer R., Schöffmann B. (1992): Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*) Dependence on individual age and function. *J. Insect Physiol.* 38, 409–419.
39. Crailsheim, K., Schneider, L.H.W., Hrassnigg, N., Bühlmann, G., Brosch, U., Gmeinbauer, R., Schömann, B. (1992): Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *J. Insect Physiol.* 38, 409–419.
40. Cremonz, D., De Jong M., Bitondi, M. G. (1998): Quantification of hemolymph proteins as a fast method for testing protein diets for honey bees (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entom.*, 91(6), 1284–1289.
41. De Grandi-Hoffman, G., Wardell, G., Ahumada-Secura, F., Rinderer, T.E., Danka, R., Pettis, J. (2008): Comparisons of pollen substitute diets for honeybees consumption rates by colonies and effects on brood and adult populations. *J. Apic. Res.* 47, 265-270.
42. De Jong, D., da Silva, E.J., Kevan, P.G., Atkinson, J.L. (2009): Pollen substitutes increase honey bee haemolymph protein levels as much as or more than does pollen. *J. Apic. Res.* 48, 34–37.

43. Delaney, D.A., Keller, J.J., Caren, J.R., Tarpy, D.R. (2011): The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 42, 1–13.
44. Delaplane, K.S., van der Steen, J. and Guzman-Novoa, E. (2013): Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *J. Apic. Res.* 52(1), 1-12.
45. Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtye, A., et al. (2013): Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? *PLoS One* 8(8): e72016.
46. Dodologlu, A., B. Emsen, F. Genc (2004): Comparison of some characteristics of queen honey bees (*Apis mellifera* L.) reared by using Doolittle method and natural queen cells. *J. Applied Anim. Res.* 26: 113-115.
47. Dolasevic, S., Stevanovic, J., Aleksic, N., Glavinic, U., Deletic, N., Mladenovic, M., Stanimirovic, Z., (2020): The effect of diet types on the some quality characteristics of artificially reared *Apis mellifera* queens. *J. Apic. Res.* 59 (1) 115-123.
48. Doolittle, G.M. (1899): Doolittle's queen rearing methods. *Am. Bee J.* 39, 435-436.
49. Eckert, J.E. (1934): Studies in the number of ovarioles in queen honeybees in relation to body size. *J. Econ. Entomol.* 27: 629-635.
50. Emsen, B., A. Dodologlu, F. Genc, (2003): Effect of larvae age and grafting method on the larvae accepted rate and height of sealed queen cell (*Apis mellifera* L.). *J. Anim. Res.* 24: 201-206.
51. Engels, E. (1974): Occurrence and significance of vitellogenins in female castes of social Hymenoptera. *Am. Zool.* 14:1229-1237.
52. Engels, W. (1974): Occurrence and significance of vitellogenin in female castes of social Hymenoptera. *Am. Zool.* 14: 1229-1237.
53. Engels, W., Kaatz, H., Zillikens, A., Paulino Simões Z.L., Trube, A., Braun, R., Dittrich, F. (1990): Honeybee reproduction: Vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In Hoshi M and Yamashita O (Eds). *Advances in Invertebrate Reproduction* 5. Elsevier, Amsterdam, 495-502.
54. Evans, J.D., Wheeler, D.E. (1999): Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85, 5738-5742.
55. Fahrback, S.E., Giray, T., Robinson, G.E. (1995): Volume changes in the mushroom bodies of adult honey bee queens. *Neurobiology of learning and memory*, 63(2), 181-191.
56. Fievet, J., Tentcheva, D., Gauthier, L., de Miranda, J., Cousserans, F., Colin, M.E., Bergoin, M. (2006): Localization of deformed wing virus infection in queen and drone *Apis mellifera* L. *Virol. J.* 3, 16.
57. Fleig, R. (1995): Role of the follicle cells for yolk uptake in ovarian follicles of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Intern. J. Ins. Morph. Embryol.* 24, 4, 427-433.

58. Free, J.B. (1965): The behaviour of honeybee foragers when their colonies are fed sugar syrup, *J. Apic. Res.* 4, 85–88.
59. Free, J.B., Spencer-Booth, Y. (1961): The effect of feeding sugar syrup to honey-bee colonies. *The Journal of Agricultural Science*, 57(2), 147-151.
60. Garedew, A., Schmolz, E., Lamprecht, I. (2004): The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie* 35:419-430.
61. Gauthier, L., Ravallec, M., Tournaire, M., Cousserans, F., Bergoin, M., Dainat, B., et al. (2011): Viruses associated with ovarian degeneration in *Apis mellifera* L. Queens. *PLoS One* 6(1): e16217.
62. Gençer, H.V., Shah, S.Q. (2000): Firatli, Ç. Effects of supplemental feeding of queen rearing colonies and larval age on the acceptance of grafted larvae and queen traits. *Pakistan J. Biolog. Sci.* 3, 1319–1322.
63. Gilley, D.C., Tarpy, D.R. (2005): Three mechanisms of queen elimination in swarming honey bee colonies. *Apidologie* 36 (3): 461-474.
64. Glavinic, U., Stankovic, B., Draskovic, V., Stevanovic, J., Petrovic, T., Lakic, N., Stanimirovic, Z., (2017): Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. *PLoS One* 12 (11), e0187726.
65. Glavinic, U., Tesovnik, T., Stevanovic, J., Zorc, M., Cizelj, I., Stanimirovic, Z., Narat, M., (2019): Response of adult honey bees treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae*. *PeerJ*, 7: e6325.
66. Goodwin, R.M., Ten Houten, A. (1991): Feeding sugar syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies to increase kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) pollen collection: effects of frequency, quantity and time of day. *J. Apic. Res.* 30:1, 41-49.
67. Gregorc, A., Smodiš Škerl, M. I. (2015): Characteristics of honey bee (*Apis mellifera Carnica*, Pollman 1879) queens reared in Slovenian commercial breeding stations. *J. Apic. Sci.* Vol. 59 No. 2.
68. Guidugli, K.R., Nascimento, A.M., Amdam, G.V., Barchuk, A.R., Omholt, S., Simões, Z.L., Hartfelder, K. (2005a): Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS letters*, 579(22), 4961-4965.
69. Guidugli, K.R., Piulachs, M.D., Bellés, X., Lourenço, A.P, Simões, Z.L.P. (2005b): Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Archives of Ins. Bioch. Phys.*, 59 (4) 211-218.
70. Haarmann, T., Spivak, M., Weaver, D., Weaver, B., Glenn, T. (2002): Effects of fluvalinate and coumaphos on queen honey bees (Hymenoptera: Apidae) in two commercial queen rearing operations. *J. Econ. Entom.* 95, 28-35.
71. Hanover, L. M., White, J. S. (1993): Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am. J. Clin. Nutr.* 58, 724S–732S.
72. Harano, K., K. Sasaki, T. Nagao (2005): Depression of brain dopamine and its metabolite after mating in european honeybee (*Apis mellifera*) queens. *Naturwissenschaften* 92 (7), 310-313.

73. Harano, K.I., Sasaki, M., Sasaki, K. (2007): Effects of reproductive state on rhythmicity, locomotor activity and body weight in European honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apini) queens. *Sociobiology*, 50, 189–200.
74. Hartfelder, K., Engels, W. (1998): Hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. *Soc. Insect Polymorph.* 40, 45-77.
75. Hatch, S., Tarpy, D. R., Fletcher, D. J. C. (1999): Worker regulation of emergency queen rearing in honey bee colonies and the resultant variation in queen quality. *Insect. Soc.*, 46, 372-377.
76. Hatjina, F., Bien'kowska, M., Charistos, L., Chlebo, R., Costa, C., Dražić, M.M., Filipi, J., Gregorc, A., Ivanova, E.N., Kezić, N., et al. (2014): A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *J. Apic. Res.* 53, 337–363.
77. Herbert, E.W., Shimanuki, H., Caron, D. (1977): Optimum protein levels required by honey bees (Hymenoptera, Apidae) to initiate and maintain brood rearing. *Apidologie*, 8, 141-146.
78. Hoopingarner, R., Farrar, C. (1959): Genetic control of size in queen honey bees. *J. Econ. Entomol.* 52, 547–548.
79. Hoover, S. E. R., Higo H. A., Winston M. L. (2006): Worker honey bee ovarian development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. *J. Comp. Physiol. B* 176, 55–63.
80. Hrassnigg, N., Crailsheim, K. (2005): Differences in drone and worker physiology in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 36, 255-277.
81. Huang, Z. (2012): Pollen nutrition affects honey bee stress resistance. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 5(2), 175-189.
82. Huang, Z.Y., Robinson, G.E. (1995): Seasonal changes in juvenile hormone titers and rates of biosynthesis in honey bees. *J. Comp. Physiol. B* 165, 18–28.
83. Huang, Z.Y., Robinson, G.E. (1996): Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 39, 147–158.
84. Human, H., Nicolson, S.W., Strauss, K., Pirk, C.W.W., Dietemann, V. (2007): Influence of pollen quality on ovarian development in honeybee workers (*Apis mellifera scutellata*). *J. Insect Phys.*, 53(7), 649-655.
85. Jackson, T.J., Tarpy, R.D. (2011): Fahrbach, E.S. Histological estimates of ovariole number in honey bee queens, *Apis mellifera*, reveal lack of correlation with other queen quality measures. *J. Insect Sci.* 11, 1–11.
86. Jehlík, T., Kodrík, D., Křišťůfek, V., Koubová, J., Sábová, M., Danihlík, J., Tomčala, A., Frydrychová, R.Č., (2019): Effects of *Chlorella* sp. on biological characteristics of the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 50(4) 564-577.
87. Kaftanoglu, O., E. Akyol, H. Yeninar. (2000): The effects of juvenile hormone analog on the development time and the quality of queen honeybees (*Apis mellifera* L.). II. International Congress on Africanized Honeybees and Bee Mites. 351-357.

88. Kahya, Y., Gençer, H.V., Woyke, J. (2008): Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasica*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating periods. *J. Apic. Res.* 47, 118–125.
89. Kang, H.L., Benzer, S., Min K.T. (2002): Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 838–843.
90. Kocher, S.D., Richard, F.J., Tarpy, D.R., Grozinger, C.M. (2008): Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC genomics*, 9(1), 232.
91. Kovačić, M., Puškadija, Z. (2016): Effect of Queen Cell Preparation on Larvae Acceptance in Starter Honeybee Colonies. *Proceedings of 5th International Conference "Valis Aurea" focus on research and innovation, Požega - Vienna*, 229-233.
92. Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R. (2008): Nutritional control of reproductive status in honey bees via DNA methylation. *Science* 319, 1827–1830.
93. Kunert, K., Crailsheim, K. (1988): Seasonal changes in carbohydrate, lipid and protein content in emerging worker honeybees and their mortality. *J. Apic. Res.* 27, 13–21.
94. Lee, K.P., Simpson, S.J., Wilson, K. (2008): Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Funct. Ecol.* 22, 1052-1061.
95. Li, P., Yin, Y.L., Li, D., Kim, S.W., Wu, G. (2007): Amino acids and immune function. *Brit. J. Nutr.*, 98, 237-252.
96. Lin, H., Winston, M.L. (1998): The role of nutrition and temperature in the ovarian development of the worker honey bee (*Apis mellifera*) *J. Can. Entomol.* 130(06), 883–891.
97. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001): "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method." *methods* 25, 4 402-408.
98. Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., et al. (2010): The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers. *PLoS Biol.* 8(11), e1000506.
99. Mahbobi, A., Farshineh-Adl, M., Woyke, J., Abbasi, S. (2012): Effects of the age of grafted larvae and the effects of supplemental feeding on some morphological characteristics of Iranian queen honey bees (*Apis mellifera meda* Skorikov, 1929). *J. Apic. Sci.* 56(1), 93-98.
100. Maleszka, R. (2008): Epigenetic integration of environmental and genomic signals in honey bees: the critical interplay of nutritional, brain and reproductive networks. *Epigenetics* 3, 188–192.
101. Masry, S., El-Wahab, T.A., Hassona, N.M. (2015): Origin, weight at emergence of virgin honey bee queens and its effect on acceptance during introduction. *Acad. J. Entomol.* 8, 174–182.
102. Medina, L.M., Gonçalves, L.S. (2001): Effect of weight at emergence of Africanized (*Apis mellifera*) virgin queens on their acceptance and beginning of oviposition. *Am. Bee J.* 141(3), 213–215.

103. Mirjanić, G., Nedić, N. (2016): Nivo i kvalitet ishrane pčela kao bitan faktor uspjeha u pčelarstvu. Znanstveno posvetovanje o čebelah in čebelarstvu, 75-80.
104. Mladenović, M., Nedić, N., Rašić, S. (2007): Kontrola matica iz selekcijskih centara u masovnoj proizvodnji. XV Naučno savetovanje sa međunarodnim učešćem, Proizvodnja i promocija meda i pčela, Beograd, 1-6.
105. Moritz, R.F.A., Lattorff, H.M.G., Neumann, P., Kraus, F.B., Radloff, S.E. Hepburn, H.R. (2005): Rare royal families in honey bees, *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften* 92(10), 488–491.
106. Muñoz, I., Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., De la Rúa, P. (2012): Genetic variation of *Apis mellifera* from Serbia inferred from mitochondrial analysis. *J. Apic. Sci.* 56 (1), 59-69.
107. Nachtigall, W., Rothe U., Feller P., Jungmann R. (1989): Flight of the honey bee. III. Flight metabolic power calculated from gas analysis, thermo regulation and fuel consumption. *J. Comp. Physiol.* 158B: 729D737.
108. Nedić, N., Stanisavljević, Lj., Mladenović, M., Stanisavljević, J. (2009): Molecular characterization of the honeybee *Apis mellifera carnica* in Serbia. *Arch. Biol. Sci. Belgrade*, 61 (4), 587-598.
109. Oldroyd, B.P., Goodman, R.D., Allaway, M.A. (1990): On the relative importance of queens and workers to honey production. *Apidologie*, 21, 153–159.
110. Omar, E., Abd-Ella, A.A., Khodairy, M.M., Moosbeckhofer, R., Crailsheim, K., Brodschneider, R. (2017): Influence of different pollen diets on the development of hypopharyngeal glands and size of acid gland sacs in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 48 (4), 425-436.
111. Page, J.R.E., Peng, C.Y. (2001): Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee. *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* 36, 695–711.
112. Page, R.E., Erickson, E.H. (1988): Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 23, 117.
113. Patricio, K., Cruz-Landim C. (2002): Mating influence in the ovary differentiation in adult queens of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *Braz. J. Biol.* 62, 641–649.
114. Pernal, S.F., Currie, R.W. (2000): Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 31(3), 387-409.
115. Pirk, C.W.W., Boodhoo, C., Human, H., Nicolson, S.W. (2009): The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (*Apis mellifera scutellata*). *Apidologie* 41, 62–72.
116. Piulachs, M.D., Guidugli, K.R., Barchuk, A.R., Cruz, J., Simoes, Z.L.P., Belles, X. (2003): The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(4), 459-465.

117. Rangel, J., Keller, J., Tarpy, D. (2013): The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen reproductive potential on colony growth. *Insect Soc.* 60, 65–73
118. Rašić, S., Mladenović, M., Nedić, N., Božicković, A., Milosavljević, A. (2009a): Analiza razvoja i produktivnosti nekih selekcijskih linija medonosnih pčela u zapadnoj Srbiji. Zbornik sažetaka XIV međunarodno naučno-stručno savjetovanje 145 agronoma Republike Srpske «Poljoprivreda ruralnog područja kao faktor integracije u EU» 23.-26. Mart, Trebinje, 224.
119. Reginato, R.D., Cruz-Landim, C. (2002): Morphological characterization of cell death during the ovary differentiation in worker honey bee. *Cell Biol. Intern.* 26, 243-251.
120. Ribi, W., Senden, T.J., Sakellariou, A., Limaye, A., Zhang, S. (2008): Imaging honey bee brain anatomy with micro-X-ray-computed tomography. *J. Neurosci. Method.* 171(1), 93-97.
121. Robinson, G.E., Vargo, E.L. (1997): Juvenile hormone in adult eusocial Hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch. insect Biochem. Phys.*, 35(4), 559-583.
122. Rortais A., Arnold G., Halm M.-P., Touffet-Briens F. (2005): Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees, *Apidologie* 36, 71–83.
123. Roulston, T. H., Cane J. H., Buchmann S. L. (2000): What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen pistil interactions, or phylogeny? *Ecol. Monogr.* 70: 617–643.
124. Roulston, T.H., Cane, J.H., Buchmann, S.L. (2000): What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen–pistil interactions, or phylogeny? *Ecol. Monogr.* 70, 617–643.
125. Ruttner, F. (1983): Queen rearing, biological basis and technical instruction. Apimondia Publ. House. Bucharest. 358.
126. Saffari, A., Kevan, P.G., Atkinson, J. (2010): Consumption of three dry pollen substitutes in commercial apiaries. *J. Apic. Sci.* 54 (1) 5-12.
127. Sahinler, N., O. Kaftanoglu (2005): The effects of season and honeybee (*Apis mellifera* L.) genotype on acceptance rates and royal jelly production. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 29, 499-503
128. Sahinler, N., Sahinler, S. (2002): Effects of the number of queen cells and harvesting interval on the acceptance rates of the larvae, royal jelly quality and quantity. *J. Anim. Vet. Adv.*, 1(3), 120-122.
129. Schmickl, T., Crailsheim, K. (2002): How honeybees (*Apis mellifera* L.) change their broodcare behavior in response to non-foraging conditions and poor pollen conditions, *Behav. Ecol. Sociobiol.* 51, 415–425.
130. Schmid-Hempel, P. (2005): Evolutionary ecology of insect immune defenses. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 529–551.
131. Shehata, S.M., Townsend, G.F., Shuel, R.W. (1981): Seasonal physiological changes in queen and worker honeybees. *J. Apic. Res.* 20, 69–78.

132. Skowronek, W., Bieńkowska, M.G., Kruk, C. (2004): Changes in body weight of honey bee queens during their maturation. *J. Apic. Res.* 48, 61–68.
133. Snodgrass, R.E. (1956): *Anatomy of the Honey Bee*. Reprinted in 1985 by Cornell Univ. Press.
134. Standifer, L.N. (1980): Honey bee nutrition and supplemental feeding. *Beekeeping in the US Agriculture Handbook*, 335, 39-45.
135. Stanimirovic, Z., Glavinic, U., Ristanic, M., Aleksic, N., Jovanovic, N., Vejnovic, B., Stevanovic, J. (2019): Looking for the causes of and solutions to the issue of honey bee colony losses. *Acta Veterinaria-Beograd* 69 (1), 1–31.
136. Stanimirović, Z., Soldatović, B. Vučinić, M. (2000): *Biologija pčela-medonosna pčela*. Medicinska knjiga.
137. Stanley, R.G., Linskens, H.F. (1974): *Pollen (Biology, Biochemistry, Management)*, Springer-Verlag, Berlin.
138. Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Radakovic, M., Kovacevic, R. S. (2010): Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses. *Russ. J. Genet.* 46 (5), 603-609.
139. Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Simeunovic, P., Lakic, N., Radovic, I., Sokovic, M., Van Griensven, L.J.L.D. (2018): The effect of *Agaricus brasiliensis* extract supplementation on honey bee colonies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90 (1) 219-229.
140. Sullivan, J.P., Jassim, O., Fahrbach, S.E., Robinson, G.E. (2000): Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. *Horm. Behav.* 37, 1–14.
141. Szabo, T.I. (1973): Relationship between weight of honey-bee queens (*Apis mellifera* L.) at emergence and at the cessation of egg laying. *Am. Bee J.*, 13, 127–135.
142. Taber, S. (1979): Special problems with rearing queens in a hot dry climate, In *Apiculatura, en clima quente simposio international*, Florianopolis, SC, Brasil, 19-28, 73-76 (Apic Abst.945/1983).
143. Tanaka, D. E., Hartfelder K. (2004): *Arthropod Structure & Development*, 33 (4), 431-442.
144. Tanaka, E.D, Hartfelder, K. (2004): The initial stages of oogenesis and their relation to differential fertility in the honey bee (*Apis mellifera*) castes. *Arthropod Struct. Dev.* 33(4), 431-442.
145. Taranov, G.F. (1973): Weight of queens and their quality. *Pchelovodstvo* 92, 27–29.
146. Tarpy, D.R., Hatch, S., Fletcher, D.J.C. (2000): The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. *Anim. Behav.*, 59, 97–101.
147. Tarpy, D.R., Keller J.J., Caren, J.R., Delaney D.A. (2012): Assessing the Mating ‘Health’ of Commercial Honey Bee Queens. *J. Econ. Entom.*, 105(1), 20-25.

148. Tarpy, D.R., Keller, J.J., Caren, J.R. Delaney D.A. (2011): Experimentally induced variation in the physical reproductive potential and mating success in honey bee queens. *Insect. Soc.* (2011) 58, 569.
149. Tarpy, D.R., vanEngelsdorp, D., Pettis, J.S. (2013): Genetic diversity affects colony survivorship in commercial honey bee colonies. *Naturwissenschaften*, 100, 723–728.
150. Tesovnik, T., Zorc, M., Ristanić, M., Glavinić, U., Stevanović, J., Narat, M., Stanimirović, Z. (2019): Exposure of honey bee larvae to thiamethoxam and its interaction with *Nosema ceranae* infection in adult honey bees, *Environmental Pollution*, DOI: 10.1016/j.envpol.2019.113443
151. Thrasyvoulou, A.T., Benton, A.W. (1982): Rates of growth of honeybee larvae. *J. Apic. Res.* 21(4), 189-192.
152. Toth, A.L., Robinson, G.E. (2005): Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Anim. Behav.* 69, 427–435.
153. Uchôa, F.A.B., Souza, D.C., Alves, A.A., Silva, F.A.S., Moura, J.A., Nunes, J.R.A., Maracaja, P.B., Lima, C.J., Sousa, J.S. (2012): Effect of weight of Africanized queens (*Apis mellifera* L.) at birth in honey production in semi-arid Piauiense. *Agropecuária Científica no Semi-Árido* 8, 1-6.
154. Vandenberg, J.D., Shimanuki, H. (1987): Technique for rearing worker honeybees in the laboratory.- *J. Apic. Res.* 26, 90-97.
155. Vásquez, A., Olofsson, T.C. (2009): The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *J. Apic. Res.* 48, 189–195.
156. Velthuis, H.H.W., Clement J., Morse R.A., Laigo F.M. (1971): The ovaries of *Apis dorsata* from the Philippines. *J. Apic. Res.* 10, 63–66.
157. Wang, H., Zhang, S.W., Zeng, Z.J., Yan, W.Y. (2014): Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie*, 45(5), 618-625.
158. Wang, I.D. (1965): Growth rates of young queen and worker honeybee larvae. *J. Apic. Res.* 4(1), 3-5.
159. Wheeler, D.E. (2009): *Encyclopedia of Insects (Second Edition)*, 743–744
160. Wheeler, D.E., Kawooya, J.K. (1990): Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Arch. Insect Biochem. Phys.*, 14(4), 253-267.
161. Wheeler, M.M., Robinson, G.E. (2014): Diet-dependent gene expression in honey bees: honey vs. sucrose or high fructose corn syrup. *Scientific reports*, 4.
162. Wilkinson, D., Brown, M.A. (2002): Rearing queen honey bees in a queen right colony. *Apicult. Res.* 11, 271-274.
163. Winston, M.L. (1987): *The Biology of the Honey Bee*. Cambridge, Harvard Univ. Press.
164. Winston, M.L. (1987): *The Biology of the Honey Bee*. Harvard Univ. Press: London, UK.
165. Woyke, J. (1967): Rearing conditions and number of sperms double grafting. *Am. Bee J.* 128 (6): 439-440.

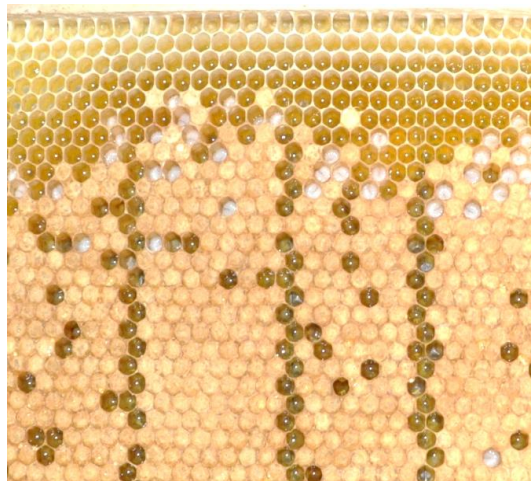
166. Woyke, J. (1971): Correlations between the ages at which honeybee brood was grafted, characteristics on the resultant queens and result of insemination. *J. Apic. Res.* 10(1), 45-55.
167. Woyke, J. (1987): Can the number of ovarioles in the ovaries be estimated by external characters of living queens. 31st Intern. Apic. Cong., 19-25, 152-155.
168. Yadava, R.P.S., Smith, M.V. (1971): Aggressive behavior of *Apis mellifera* L. workers towards introduced queens. III. Relationship between the attractiveness of the queen and worker aggression. *Can. J. Zool.* 49, 1659-1362.
169. Zheng, B., Wu, Z., Xu, B. (2014): The effects of dietary protein levels on the population growth, performance, and physiology of honey bee workers during early spring. *J. Insect Sci.* 14(1).
170. Zhu, J.J. (1981): Production of high quality queens, *Zhongguo Yangfeng* No. 3: 17-18 (*Apic. Abstr.* 916/1982).

8. Prilog doktorske disertacije

1. Foto dokumentacija:



Slika 11. Prikaz deo rama neposredno pre početka prihrane proizvodnih društava



Slika 12. Prikaz istog rama tokom prihranjivanja



Slika 13. Sakupljen polen tokom oglada pomoću polenskog hvatača



Slika 14. Izvođenje jednodnevnih matičnjaka iz matičnjaka čuvanih u inkubatoru



Slika 15. Izgled povučenih matičnjaka (njihovo brojanje)



Slika 16. Ispoliran ram koji je namenjen za izolaciju rodonačelnice radi dobijanja dovoljnog broja larvi za presađivanje



Slika 17. Izvedeni i premereni matičnjaci



Slika 18. Dodavanje prajmera

Slika 19. Proces reverzne transkripcije

Biografija autora

Slobodan Dolašević rođen je 30.10.1989. u Peći. Nakon završene Zemunske gimnazije, upisuje Poljoprivredni fakultet 2008. godine, gde 13. jula 2012. godine završava osnovne studije sa prosečnom ocenom 9.43. Nakon osnovnih studija, upisuje master studije, gde 16. oktobra 2013. završava sa prosečnom ocenom 9,50. Nakon upisivanja doktorskih studija i završene prve godine, odlazi na Novi Zeland kao stručno lice u proizvodnji matica na komercijalnom pčelinjaku u trajanju od jedne pčelarske sezone. Nakon povratka osniva pčelarsko preduzeće Golden bee doo čiji je suvlasnik i stupa u radni odnos za obavljanje poslova kao uzgajivač pčela - stručni saradnik. Slobodan Dolašević je oženjen, otac dve ćerke.

Objavljeni radovi:

1. Dolasevic S, Stevanovic J, Aleksic N, Glavinic U, Deletic N, Mladenovic M, Stanimirovic Z (2020): The effect of diet types on the some quality characteristics of artificially reared *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 59 (1) 115-123, DOI: 10.1080/00218839.2019.1673965
2. Dolašević, S, Đorđević, N., Mladenović, M. (2016): The effects of worker bee age (*Apis mellifera carnica*) in pre-winter period on crude protein content. Proceedings of the international symposium on animal science 2016 (ISAS), 459-463.
3. Dolašević, S, Nedić, N., Đorđević, N., Mladenović, M. (2016): The effect of feeding by feedbee supplement on spring development of honeybee colonies. Proceedings of the international symposium on animal science 2016 (ISAS), 464-471.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Slobodan Dolašević

Broj indeksa: ZO 15/44

Izjavljujem

Da je doktorska disertacija pod nazivom

Uticaj ishrane na kvalitet prirodno i veštački dobijenih pčelinjih matica uz praćenje stepena ekspresije gena za vitelogenin tokom razvojnih stadijuma

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, _____

Potpis autora

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime: Slobodan Dolašević

Broj indeksa: ZO 15/44

Studijski program: Zootehnika

Naslov rada: **Uticaj ishrane na kvalitet prirodno i veštački dobijenih pčelinjih matica uz praćenje stepena ekspresije gena za vitelogenin tokom razvojnih stadijuma**

Mentori:

dr Mića Mladenović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Jevrosima Stevanović, vanredni profesor, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Uticao ishrane na kvalitet prirodno i veštački dobijenih pčelinjih matice uz praćenje stepena ekspresije gena za vitelogenin tokom razvojnih stadijuma

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu** i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

U Beogradu, _____

Potpis autora
