

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΗΡΟΤΡΟΦΙΑΣ & ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΚΟΥΚΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ
ΑΘΗΝΑ 2015

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ,
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΣΗΡΟΤΡΟΦΙΑΣ & ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΑΣ

ΘΕΜΑ:

Η φυσική γονιμοποίηση και η τεχνητή σπερματέγχυση των βασιλισσών και η μελέτη του σπέρματος των κηφήνων.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΚΟΥΚΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

Τριμελής Επιτροπή

Επιβλέπων: Πασχάλης Χαριζάνης, Καθηγητής Γ.Π.Α

Μέλη: Κωνσταντίνος Φασσέας, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Χρήστος Παππάς, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
SUMMARY	7
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	9
ΜΕΡΟΣ Α΄	10
1. Εισαγωγή	11
1.1. Ανάπτυξη και κοινωνία των μελισσών	11
1.1.1. Η μέλισσα	11
1.2. Βιολογία της μέλισσας.....	13
1.2.1. Διαφοροποίηση των τριών βιολογικών μορφών στη μέλισσα.....	13
1.3. Ανατομία και φυσιολογία της μέλισσας.....	20
1.3.1. Αναπαραγωγικό σύστημα	20
1.3.2. Η μεταβίβαση των κληρονομικών ιδιοτήτων στο μελίσι	26
2.1. Ιστορική εξέλιξη της τεχνητής σπερματέγχυσης.....	28
2.1.1. Φυσική γονιμοποίηση	29
2.1.2. Τεχνικές και βελτίωση των μελισσών	31
2.1.3.1. Βελτίωση με επιλογή	33
2.1.3.2. Δοκιμή κόρντοβαν (Cordovan test)	33
2.1.3.3. Τεχνητή γονιμοποίηση – σπερματέγχυση.....	34
2.1.3.1. Συσκευές που χρησιμοποιούνται στη τεχνητή σπερματέγχυση βασιλισσών	38
3.1. Συζήτηση-Συμπεράσματα	47
Μέρος Β΄	54
1. Εισαγωγή	55
1.1. Το σπέρμα	55
1.2. Διατήρηση του σπέρματος.....	56
2. Πειραματικό μέρος	59
2.1. Υλικά και μέθοδοι.....	59
2.1.1. Αιματοκυττόμετρο	62
2.2. Στατιστική ανάλυση.....	66
3. Αποτελέσματα	66
4. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	75
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	79
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	85

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1.1.1. Συστηματική κατάταξη κοινής μέλισσας.....	7
Πίνακας 2.1.1. Υποκατάστατα και αντικατάστατα γύρης που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειραματος	
Πίνακας 3.1.1. Ανάλυση διασποράς (ANOVA) του σωματικού βάρους των κηφήνων προερχόμενων από Βασίλισσες (Q) και από Εργάτριες (W), έξι διαφορετικών ηλικιακών ομάδων (Age Group). Τιμές p μικρότερες του 0,05 δείχνουν στατιστικά σημαντική επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα ή της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων.....	66
Πίνακας 3.1.2. Ανάλυση διασποράς (ANOVA) του μήκους του σώματος των κηφήνων προερχόμενων από Βασίλισσες (Q) και από Εργάτριες (W), έξι διαφορετικών ηλικιακών ομάδων (Age Group). Τιμές p μικρότερες του 0,05 δείχνουν στατιστικά σημαντική επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα ή της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων.....	68
Πίνακας 3.1.3. Ανάλυση διασποράς (ANOVA) του μήκους της κοιλίας των κηφήνων προερχόμενων από Βασίλισσες (Q) και από ωοτόκες εργάτριες (W), έξι διαφορετικών ηλικιακών ομάδων (Age Group). Τιμές p μικρότερες του 0,05 δείχνουν στατιστικά σημαντική επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα ή της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων.....	70
Πίνακας 3.1.4. Ανάλυση διασποράς (ANOVA) του αριθμού των σπερματοζωαρίων κηφήνων προερχόμενων είτε από βασίλισσες (Q) ή από ωοτόκες εργάτριες (W), έξι διαφορετικών ηλικιακών ομάδων (Age Group). Τιμές p μικρότερες του 0,05 δείχνουν στατιστικά σημαντική επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα ή της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων.....	72

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η συνεχής έρευνα και η επιμόρφωση του ανθρώπου καθώς και η ανάγκη για εύρεση βελτιωμένων γενετικά οργανισμών καθίσταται δυνατή με τον έλεγχο των συζεύξεων και συγκεκριμένα με τη χρήση της τεχνητής σπερματέγχυσης για τον περιορισμό του αγνώστου γενετικού υλικού κατά τη διάρκεια της σύζευξης των βασιλισσών και των κηφήνων στον αέρα (φυσική γονιμοποίηση). Η τεχνητή σπερματέγχυση είναι ένας από τους τρόπους βελτίωσης με επιλογή. Αποτελεί τον αποτελεσματικότερο τρόπο για εξολοκλήρου έλεγχο των συζεύξεων καθώς καθιστά γνωστή την προέλευση των κηφήνων αλλά δεν μπορεί να αντικαταστήσει τη φυσική γονιμοποίηση. Στην διατριβή αυτή περιγράφεται η τεχνητή σπερματέγχυση όπως συμβαίνει στην πράξη χρησιμοποιώντας βιβλιογραφικά δεδομένα και μελετάται η γονιμότητα των κηφήνων που προέρχονται από βασίλισσες και από ωοτόκες εργάτριες.

Στην Ελλάδα η χρήση της τεχνητής σπερματέγχυσης είναι περιορισμένη καθώς η συγκεκριμένη τεχνική θα πρέπει να χρησιμοποιείται για ερευνητικούς και μόνο σκοπούς. Συγκρίνοντας την τεχνητή σπερματέγχυση με την φυσική γονιμοποίηση υπάρχουν διαφορές όσον αφορά την ποιότητα των βασιλισσών. Η τεχνητή σπερματέγχυση είναι ένα εργαλείο βελτίωσης του γεννητικού υλικού των παραγόμενων βασιλισσών. Στην πράξη όμως οι βασίλισσες που παράγονται για να ηγηθούν παραγωγικά μελίσσια θα πρέπει να παράγονται με φυσική γονιμοποίηση.

Οι κηφήνες μπορούν να ελεγχθούν ως προς τη γονιμότητά τους εργαστηριακά καθώς αρκετοί μπορεί είτε να μην είναι γόνιμοι είτε να είναι νεαροί σε ηλικία. Κατά τη διάρκεια της εργασίας, γενετικό υλικό κηφήνα συλλέγεται και εξετάζεται για την εύρεση της γονιμότητας με τη χρήση χρωστικών και μικροσκοπίου στο εργαστήριο. Εξετάστηκαν κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσες και από ωοτόκες εργάτριες, όσον αφορά τα χαρακτηριστικά τους (βάρος κηφήνα, μήκος σώματος κηφήνα, μήκος κοιλίας κηφήνα και αριθμού σπερματοζωαρίων κηφήνα). Βρέθηκε ότι οι κηφήνες από βασίλισσες είναι πιο μεγάλοι σε μέγεθος, βάρος και μήκος κοιλίας από τους κηφήνες που προέρχονται από ωοτόκες εργάτριες.

Οι τιμές του μέσου βάρους στους κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα κυμαίνονται από 0,175g έως 0,201g ενώ στους κηφήνες από εργάτριες το βάρος είναι μικρότερο και κυμαίνεται από 0,136 g έως 0,175 g. Οι τιμές του μέσου μήκους στους κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα κυμαίνονται από 1,53 cm έως 1,82 cm ενώ στους κηφήνες από εργάτριες το μήκος είναι μικρότερο και κυμαίνεται από 1,64 cm

έως 1.74 cm. Οι τιμές του μέσου μήκους κοιλίας στους κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα κυμαίνονται από 0,72 cm έως 0,95 cm ενώ στους κηφήνες από εργάτριες το μήκος είναι μικρότερο και κυμαίνεται από 0,67 cm έως 0,88 cm. Επίσης, βρέθηκε ότι ο μέσος αριθμός των σπερματοζωαρίων ήταν μεγαλύτερος στους κηφήνες από βασίλισσες. Οι τιμές στους κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα κυμαίνονται από 1,53 έως 6,6 εκατομμύρια ενώ στους κηφήνες από εργάτριες ο αριθμός σπερματοζωαρίων είναι μικρότερος και κυμαίνεται από 1,54 έως 5,85 εκατομμύρια σπερματοζωάρια. Κατά την χρώση νεκρών και ζωντανών σπερματοζωαρίων δεν βρέθηκαν διαφορές στα σπερματοζωάρια.

SUMMARY

Constant research and education, as well as the need for better genetically modified organisms, is being made possible with the control of mating, and in particular with the use of artificial insemination for the restriction of unknown genetic material during the free mating process of the queen and the drones (natural insemination). Artificial insemination is one of the ways for selective improvement. It constitutes the most effective means of full control of the mating, as it makes the origin of the drones known, but it cannot substitute the natural insemination. In this thesis the process of the artificial insemination is described as it happens using literature data, and the semen quality of the drones which originate from queen and laying worker bees is studied.

In Greece the use of artificial insemination is limited as this particular technique is used for research purposes only. While comparing artificial and natural insemination differences are found in regards to the quality of the queens. Artificial insemination is a way to improve the genetic material of the resulting queens. In practice however the queens born to lead productive hives must be reared by natural insemination.

The drones can be controlled in regards to their fertility in a laboratory, as a large number of them can be infertile or young in age. During the task drone semen is collected and examined in search of fertility, using dyes and a microscope. Drones originating from queens and laying workers have been examined, in regards to their characteristics (drone weight, body length, abdomen length and sperm count). It has been found that drones originating from queens are larger in size, weight and abdomen length, than drones originating from laying workers.

The mean weight values in queen originating drones varied from 0.175g to 0.201g, while in worker originating drones mean weight was less and varied from 0.136g to 0.175g. The mean length values in drones originating from queens varied from 1.53cm to 1.82cm, while in worker originating drones the length was less, and varied from 1.64cm to 1.74cm. The mean abdominal length values in drones originating from queens varied from 0.72cm to 0.95cm, while in worker originating drones the length was less, and varied from 0.67cm to 0.88cm. It has also been found that the average sperm count was larger in queen originating drones. The values found

varied from 1.63 to 6.6 millions, while in worker originating drones sperm count was less and varied from 1.54 to 5.85 millions. During dyeing of dead and live spermatozoa no differences were found (no dead sperm detect)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στα πλαίσια της μεταπτυχιακής μου διατριβής επιλέχθηκε το θέμα αυτό γιατί αποτελεί ένα πολύ σημαντικό θέμα για τη βελτίωση της παραγωγής. Όλες οι εργασίες πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών αξιοποιώντας το μελισσοκομείο του καθώς και τις εργαστηριακές του εγκαταστάσεις. Ένα μέρος των μικροσκοπικών εξετάσεων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες και το σεβασμό μου στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Πασχάλη Χαριζάνη. Τον ευχαριστώ που με καθοδήγησε και με βοήθησε για την εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου διατριβής καθώς και η βοήθεια του ήταν πολύτιμη σε όλα τα στάδια της πτυχιακής τόσο για τον σχεδιασμό και την εκτέλεση όσο και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές της τριμελούς επιτροπής κ. Κωνσταντίνο Φασσέα (Καθηγητή Γ.Π.Α.) και τον κ. Παππά Χρήστο (Επίκουρο Καθηγητή Γ.Π.Α) για το χρόνο που διέθεσαν και για τις πολύτιμες υποδείξεις και παρατηρήσεις τους στην μεταπτυχιακή μου διατριβή.

Ευχαριστώ πολύ τον επίκουρο καθηγητή κ. Σαϊτάνη Κωνσταντίνο για τη βοήθεια του στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό και τους φοιτητές του εργαστηρίου Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Γ.Π.Α. για τη φιλική διάθεση και συνεργασία κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον κ. Δημήτριο Λαζαράκη Ε.ΔΙ.Π. στο Γ.Π.Α., τους φοιτητές Δημήτρη Μαυρονάσιο, Παναγιώτη Αλεξόπουλο, Σπυρίδωνα Βλογιαννίτης, Κωνσταντίνο Βουδούρη, Ιωάννη Ρέρρα και Κατερίνα Χαλδαίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ενθάρρυνσή τους και τη συμπαράστασή τους σε όλα τα στάδια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Κούκου Εύαγγελία

ΜΕΡΟΣ Α΄

Η φυσική γονιμοποίηση και η τεχνητή σπερματέγχυση των βασιλισσών



1.Εισαγωγή

1.1. Ανάπτυξη και κοινωνία των μελισσών

1.1.1. Η μέλισσα

Η κοινή μέλισσα, *Apis mellifera* L. ανήκει στην κλάση των εντόμων, στην τάξη των υμενοπτέρων και στην οικογένεια Apidae. Οι μέλισσες είναι κοινωνικά έντομα όπως οι τερμίτες και τα μυρμήγκια και όπως σε κάθε κοινωνία υπάρχουν κοινωνικές τάξεις ή βιολογικές μορφές ή κάστες (κοινωνικός πολυμορφισμός).

Στις μέλισσες συναντάται δύο θηλυκές κάστες, η βασίλισσα και η εργάτρια καθώς και ο κηφήνας που αποτελεί το αρσενικό άτομο (δεν ανήκει σε κάστα).

Η κοινή μέλισσα όπως και γενικότερα όλα τα ολομετάβολα έντομα, για να ολοκληρώσει την ανάπτυξή της και για να γίνει ακμαίο διέρχεται από τρία στάδια το αυγό, την προνύμφη και τη νύμφη ή πλαγγόνα (η συστηματική κατάταξη της κοινής μέλισσας δίνεται στο πιν. 1.1.1.).

Βασίλειο	Ζώα (Animalia)
Φύλο	Αρθρόποδα (Arthropoda)
Κλάση	Έντομα (Insecta)
Τάξη	Υμενόπτερα (Hymenoptera)
Οικογένεια	Apidae
Γένος	<i>Apis</i>
Είδος	<i>Apis mellifera</i> Linnaeus

Σε ένα μελίτσι υπάρχει μια βασίλισσα, η οποία ελέγχει με τις φερομόνες που εκκρίνει την φυσιολογική λειτουργία ολόκληρης της κυψέλης. Η βασίλισσα ωτοκεί σε κελλιά εργατριών ή σε κηφήνων. Το γονιμοποιημένο αυγό εξελίσσεται σε θηλυκό άτομο, εργάτρια ή βασίλισσα ενώ το αγονιμοποίητο θα εξελιχθεί σε κηφήνα. Αυτό εξαρτάται από τον τύπο του κελλιού που θα γίνει η εναπόθεση του αυγού καθώς και από τη διατροφή που θα του παρέχουν οι εργάτριες. Η ποιότητα και η ποσότητα της τροφής που παρέχεται στην προνύμφη πριν σφραγιστεί το κελλί παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του γονιμοποιημένου αυγού σε βασίλισσα ή σε εργάτρια, ενώ το σχήμα του κελλιού διαχωρίζει που θα γεννηθούν τα αρσενικά άτομα από τα θηλυκά (Υφαντίδης, 2005).

Για να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη της μέλισσας από αυγό μέχρι ενήλικο απαιτούνται για τη βασίλισσα 16 ημέρες, για την εργάτρια 21 ημέρες, ενώ για τον κηφήνα 24 ημέρες.

Όπως προαναφέρθηκε, ένας άλλος παράγοντας για το διαχωρισμό και την ανάπτυξη των ατόμων σε ένα μελίσι είναι ο τύπος του κελλιού που θα τοποθετήσει η βασίλισσα το αυγό. Κατά την εναπόθεση των αυγών στα κελλιά η βασίλισσα εισέρχεται μέσα σε αυτά και αν η κοιλία της δυσκολεύεται να εισέλθει (κελλί εργάτριας) τότε εναποθέτει ένα αυγό εργάτριας (γονιμοποιημένο αυγό) αν το κελλί είναι μεγάλο (δηλαδή κηφηνοκελλί) τότε εναποθέτει ένα αυγό αγονιμοποίητο. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες οι εργάτριες μπορούν να μεταφέρουν ένα αυγό από ένα εργατικό κελλί που είχε πρωταρχικά τοποθετηθεί, σε βασιλικό κελλί και με κατάλληλες συνθήκες να αναπτυχθεί σε βασίλισσα και το αντίθετο (Χαριζάνης, 2014).

Η τροφή που παρέχεται στις εκκολαφθείσες προνύμφες είναι διαφορετικής διατροφικής αξίας. Ο βασιλικός πολτός διαφέρει από τον εργατικό πολτό, επειδή περιέχει περισσότερες εκκρίσεις του σιαγονικού αδένου και σάκχαρα. Από χημικές αναλύσεις που έγιναν, βρέθηκε ότι ο βασιλικός πολτός περιέχει 10 φορές περισσότερο παντοθενικό οξύ και 18 φορές περισσότερη βιοπτερίνη από τον εργατικό πολτό. Κατά την ανάπτυξη των προνυμφών παράγονται μεγάλα ποσά νεανικής ορμόνης που προκαλούν την διαφοροποίηση της σε βασίλισσα (Krell, 1996).

Αντιθέτως, οι εργάτριες αρχικά (3 πρώτες ημέρες) εκτρέφονται με εκκρίσεις του υποφαρυγγικού αδένου, τις επόμενες μέρες της διατροφής τους προστίθενται περισσότερο μέλι και γύρη που έχει σαν αποτέλεσμα να μειώνεται η παραγωγή της ορμόνης νεότητας, οπότε και διαφοροποιείται από προνύμφη σε εργάτρια. Οι προνύμφες που μεταφέρονται από ένα κελλί σε ένα άλλο, όταν είναι ηλικίας 3 μέχρι 4 ημερών, αναπτύσσονται σε ενδιάμεσο στάδιο μεταξύ βασίλισσας και εργάτριας.

Η διατροφή με βασιλικό πολτό, έχει ως αποτέλεσμα η βασίλισσα να διαφέρει σημαντικά από τις εργάτριες ως προς τη μορφολογία, την περίοδο ανάπτυξης, την διάρκεια ζωής και τη συμπεριφορά.

Μορφολογικά η βασίλισσα έχει αναπαραγωγικά όργανα και μεγαλύτερο μέγεθος και βάρος σε σχέση με την εργάτρια που διαθέτει όργανα που τη βοηθούν στις διάφορες εργασίες. Η βασίλισσα αναπτύσσεται σε 16 ημέρες και ζει έως και 4 χρόνια, ενώ η εργάτρια σε 21 ημέρες και μπορεί να ζήσει από κάποιες μέρες έως και 4 μήνες.

Επίσης, το κυριότερό της γνώρισμα είναι ότι η βασίλισσα εναποθέτει δεκάδες χιλιάδες αυγά κάθε χρόνο, το οποίο αποτελεί τον μοναδικό της σκοπό, εν αντιθέσει με τις εργάτριες που ασχολούνται με τις διάφορες εργασίες στην κυψέλη και ωτοκοούν μόνο περιστασιακά (Krell, 1996).

1.2. Βιολογία της μέλισσας

1.2.1. Διαφοροποίηση των τριών βιολογικών μορφών στη μέλισσα

Η βασίλισσα

Η βασίλισσα είναι η μόνη γόνιμη θηλυκή μέλισσα της κυψέλης και διακρίνεται εύκολα από τις εργάτριες και τους κηφήνες καθώς είναι πιο μεγαλόσωμη και πιο στενόμακρη καθώς, τα φτερά της είναι πιο κοντά σε σχέση με το σώμα της και η γλώσσα είναι μικρότερη από τις εργάτριες. Η βασίλισσα δεν διαθέτει κηρογόνους αδένες, ούτε τον αδένα Νασάνοφ και οι υποφαρυγγικοί αδένες της είναι πολύ μικροί αντιθέτως από τους σιαγονικούς αδένες που είναι υπερτροφικοί. Στην βασίλισσα υπάρχουν αποκλειστικά ο αδένας Dufour και Koschevnikof. Το κεντρί της μέλισσας είναι λείο, ώστε να μπορεί να κεντρίζει χωρίς να χάνει τον κεντρί της και να πεθαίνει όπως γίνεται με τις εργάτριες.

Η παρθένα βασίλισσα είναι συχνά δύσκολο να εντοπιστεί μέσα σε ένα μελίσι καθώς μοιάζει πολύ με την εργάτρια και κινείται πολύ γρήγορα. Μια βδομάδα (5-10 ημέρες) μετά την έξοδο της από το κελλί για να συζευχθεί προβαίνει στην πρώτη της πτήση. Η πτήση πραγματοποιείται τις πρώτες μεσημεριανές ώρες (12-5μμ) με θερμοκρασία 20°C, αίθριο ουρανό και ταχύτητα ανέμου μικρότερη από 28 km/h και συζευγνύεται με 8-10 κηφήνες.

Η διάρκεια της πτήσης διαρκεί από 5 έως 18 λεπτά. Αν οι καιρικές συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές και δεν της επιτρέπουν την πτήση, το γαμήλιο ταξίδι αναβάλλεται. Αν δεν συζευχθεί η βασίλισσα τις 4 πρώτες βδομάδες από την έξοδο της από το βασιλικό κελλί, λιγοστεύουν οι πιθανότητες σύζευξης και γονιμοποίησης της.

Κατά την σύζευξη, ο κηφήνας πεθαίνει λόγω της αναστροφής των γεννητικών του οργάνων. Μέρος των γεννητικών του οργάνων και βλέννη παραμένουν στο γεννητικό άνοιγμα της βασίλισσας που αποτελεί το «σημάδι ζευγαρώματος». Ο κάθε κηφήνας αφαιρεί τα γεννητικά όργανα του προηγούμενου κηφήνα που παρέμειναν στη βασίλισσα. Η σύζευξη μπορεί να ολοκληρωθεί σε μια πτήση, όμως πολλές φορές λόγω

δυσμενών συνθηκών μπορεί το γαμήλιο αυτό ταξίδι να γίνει δύο και τρεις φορές (Χαριζάνης, 2014).

Η ωοτοκία αρχίζει περίπου τρεις ημέρες μετά τη σύζευξη. Μετά τη σύζευξη της οι εργάτριες της κυψέλης την προσέχουν και την περιποιούνται. Απομακρύνουν το σημάδι ζευγαρώματος που απέμεινε στο γεννητικό άνοιγμα από τα γεννητικά όργανα του τελευταίου κηφήνα, την ταΐζουν, την καθαρίζουν και απομακρύνουν τα περιττώματά της.

Η συζευγμένη νεαρή βασίλισσα όταν αρχίσει να ωοτοκεί, μετακινείται αργά πάνω στα πλαίσια, βρίσκεται συνεχώς στην κυψέλη και βρίσκεται συνήθως πάνω ή κοντά σε κηρήθρες με ασφράγιστο γόνο περιτριγυρισμένη από νεαρές εργάτριες. Το μέγεθος της κοιλιάς της αυξάνεται αρκετά. Η βασίλισσα μπορεί να ζήσει και να ωοτοκεί 1-4 χρόνια υπό φυσιολογικές συνθήκες. Η ηλικία της όμως παίζει σημαντικό ρόλο στον πληθυσμό του μελισσιού, στην ευρωστία του και στην ζωηρότητα του. Εκτός από την ωοτοκία μια άλλη λειτουργία της βασίλισσας είναι η έκκριση φερομονών.

Οι βασιλικές φερομόνες παράγονται εν μέρει από τους σιαγονικούς αδένες και επηρεάζουν τη συμπεριφορά των εργατριών και μεταβάλλουν σημαντικά τη φυσιολογία τους. Επιδρούν στη συνοχή του σμήνους των μελισσών και στη συμπεριφορά τους. Διεγείρουν την παραγωγή κεριού και αναστέλλουν την κατασκευή βασιλικών κελλιών, καθώς επίσης και την ανάπτυξη των ωοθηκών των εργατριών. Επηρεάζουν το ποσοστό νεανικής ορμόνης που συνδέεται με τη συλλογή τροφής. Υπάρχουν και άλλοι αδένες που παράγουν φερομόνες αλλά δε γνωρίζουμε τον τρόπο που επιδρούν. Οι αδένες αυτοί είναι ο αδένας Dufour που εκκρίνει ουσίες που ενδεχομένως να παίζουν ρόλο στην αναγνώριση των αυγών από τις εργάτριες. Ο αδένας Koschevnikov παράγει εκκρίσεις για την προσέλκυση των εργατριών (Υφαντίδης, 2002).

Κατά την ωοτοκία, η βασίλισσα συνοδεύεται από μια ομάδα εργατριών μελισσών (εικόνα 1.2.1.), οι οποίες την ταΐζουν την αγγίζουν με τις κεραίες τους και με τα μπροστινά πόδια και τη γλύφουν με την προβοσκίδα τους (Υφαντίδης, 2005).



Εικόνα 1.2.1. Περιποίηση βασίλισσας από εργάτριες

Φερομόνες που παράγει η βασίλισσα

Στις εργάτριες παράγεται ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων που έχουν σχέση με λίγες λειτουργίες, ενώ στη βασίλισσα υπάρχουν λίγες προσδιορισμένες χημικές ουσίες που έχουν σχέση με πολλές λειτουργίες (Χαριζάνης, 1996). Η παρουσία της βασίλισσας υποδηλώνεται είτε μέσα στο μελίσσι, είτε και προσωρινά έξω από το ενδιαίτημά της, δηλαδή μέσα στους σχηματισμούς του αφεσμού ή στους τόπους συγκέντρωσης των κηφήνων. Ο κυριότερος αδένας παραγωγής φερομονών της βασίλισσας είναι ο σιαγονικός, ωστόσο φερομόνες παράγονται και από άλλα μέρη του σώματος της βασίλισσας. Πρόκειται στην ουσία για ένα σύνολο από 16 διαφορετικές ενώσεις, από τις οποίες έχουν προσδιοριστεί το βενζοϊκό οξύ, μια αλκοόλη και τρία άλλα οργανικά ακόρεστα οξέα με δέκα άτομα άνθρακα. Τα τελευταία είναι και τα πιο σημαντικά συστατικά της. Πρόκειται για το 9-οξο-2-δεκενοϊκό οξύ (9-ΟΔΟ), το οποίο καλείται και βασιλική ουσία, και τα δύο εναντιομερή του 9-υδροξύ-2-δεκενοϊκού οξέος

(9-ΥΔΟ). Οι φερομόνες της βασίλισσας έχουν τόση άμεση σχέση όσο και μακροχρόνια μορφή δράσης στις υπόλοιπες μέλισσες του μελισσιού (Υφαντίδης, 2002).

Οι περιπτώσεις μακροχρόνιας δράσης φερομονών της βασίλισσας είναι πολλές και σχετίζονται με τη δημιουργία νέας βασίλισσας και τη σμηνοουργία, την ανάπτυξη των ωοθηκών των εργατριών, την ελκυστικότητα των κηφήνων, τη σταθεροποίηση του σμήνους, τη διέγερση του αδένου Nasonov και την αναγνώριση της βασίλισσας (Winston, 1987).

Ακόμη και οι ανώριμες βασίλισσες παράγουν ουσίες (πιθανόν το 9-ΟΔΟ και 9-ΥΔΟ) πριν βγουν από το κελλί και οι οποίες έχουν την ίδια επίδραση. Εκτός από τις φερομόνες των σιαγονικών αδένων, σημαντικό ρόλο παίζουν και οι ουσίες των αδένων Άρνχαρτ για την κατασκευή βασιλικών κελιών. Επίσης, η φερομόνη αυτή δρα συνεργιστικά με τις ενώσεις των σιαγονικών αδένων (Winston, 1987).

Παρεμπόδιση της ανάπτυξης των ωοθηκών στις εργάτριες:

Από μελέτες βρέθηκε ότι το 9-ΟΔΟ παρεμποδίζει την ανάπτυξη των ωοθηκών στις εργάτριες, όμως όχι τόσο αποτελεσματικά όσο η παρουσία βασίλισσας, γεγονός που δείχνει ότι σε αυτό βοηθούν και άλλες φερομόνες ή δραστηριότητες εντός της κυψέλης.

Ελκυστικότητα των κηφήνων για σύζευξη:

Τους κηφήνες τους έλκουν πριν τη σύζευξη ένας αριθμός από ουσίες, όμως το 9-ΟΔΟ έχει τη μεγαλύτερη επίδραση, αφού τραβάει τους κηφήνες από απόσταση 60 μέτρων.

Ελκυστικότητα και αναγνώριση της βασίλισσας:

Κύριο ρόλο σε αυτό παίζει το 9- ΟΔΟ και λιγότερο το 9-ΥΔΟ. Συμμετοχή φαίνεται ότι έχουν και ουσίες που παράγονται από αδένες της κοιλιάς. Στην ίδια κατηγορία δράσης φερομονών της βασίλισσας φαίνεται ότι υπάγεται και η μετατόπιση του χρόνου (ηλικίας), κατά τον οποίο οι εργάτριες μέλισσες μέσα σε ένα κανονικό μελίσσι αναλαμβάνουν καθήκοντα συλλεκτριών. Η ηλικία ανάληψης καθηκόντων συλλογής τροφής φαίνεται ότι καθορίζεται από τη συγκέντρωση της νεανικής ορμόνης στην αιμολέμφο των εργατριών, την οποία συγκέντρωση με τη σειρά της επηρεάζει πάλι η βασιλική ουσία (Υφαντίδης, 2002).

Υπάρχουν και άλλες φερομόνες της βασίλισσας, πέραν των όσων παράγονται από τους σιαγονικούς της αδένες (Winston, 1987). Ο αδένας Koschevnikov φαίνεται ότι παράγει φερομόνη που ελκύει τις εργάτριες σε αυτήν. Επίσης, φερομόνη που παράγεται από τους κοιλιακούς τεργίτες τραβάει τους κηφήνες και ευνοεί τη σύζευξη, ενώ παρεμποδίζει την ανάπτυξη των ωοθηκών στις εργάτριες. Τέλος, φερομόνη που παράγεται στα πόδια της βασίλισσας αναστέλλει την παραγωγή βασιλικών κελιών από τις εργάτριες. Ο μηχανισμός διασποράς των φερομονών της βασίλισσας μέσα στην κυψέλη είναι σύνθετος και περιλαμβάνει: α) την επαφή των μελισσών με τη βασίλισσα και την μετέπειτα με άλλες μέλισσες β) την τροφάλλαξη, γ) τις πατημασιές της βασίλισσας, και δ) τη μεταφορά μορίων φερομονών της βασίλισσας με διάχυση στον αέρα μέσα στην κυψέλη. Η τελευταία περίπτωση μπορεί να ισχύει για μικρές μόνον αποστάσεις, μερικών δηλαδή εκατοστών του μέτρου από την εκάστοτε θέση της βασίλισσας (Winston, 1987).

Ο Κηφήνας

Οι κηφήνες αποτελούν τα αρσενικά άτομα ενός μελισσιού και ζουν κατά μέσο όρο 40 με 50 ημέρες. Η πρώτη πτήση τους γίνεται την 6^η – 8^η ημέρα της ηλικίας τους και ωριμάζουν αναπαραγωγικά 10-16 ημέρες μετά την έξοδό τους από το κελλί. Οι κηφήνες έχουν βρεθεί ότι ξεκινούν την πτήση τους στις 12:30 (Roberts, 1944) και επιστρέφουν στις 18:00 (Cramp, 1998).

Μορφολογικά, ο κηφήνας διαφέρει από τα θηλυκά άτομα της κυψέλης καθώς το σώμα του είναι μεγαλύτερο από της εργάτριας και μικρότερο από της βασίλισσας. Ο κηφήνας δεν φέρει κεντρί και η προβοσκίδα του είναι κοντή. Τα σύνθετα μάτια του, είναι μεγάλα και συναντιούνται στην κορυφή της κεφαλής, δεν έχει κηρογόνους αδένες ούτε υποφαρυγγικούς για την παραγωγή βασιλικού πολτού, δε συλλέγει τροφή, δεν φρουρεί την κυψέλη δεν παράγει κερι και πρόπολη ούτε φροντίζει και ταΐζει το γόνο.

Η διάρκεια της ζωής του κηφήνα όπως αναφέραμε είναι 40 με 50 ημέρες. Ο χρόνος ζωής των κηφήνων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Οι κηφήνες τρέφονται στα πρώτα στάδια της ζωής τους από τις εργάτριες (νεαρές – παραμάνες εργάτριες) με μίγμα από γύρη, βασιλικό πολτό και μέλι και στη συνέχεια τρέφονται μόνοι τους με μέλι από τα κελλιά.

Οι μεγαλύτερης ηλικίας κηφήνες που είναι αναπαραγωγικά ώριμοι τρέφονται όπως προαναφέραμε μόνοι τους με όσο μέλι χρειάζονται για να τους δώσει την ενέργεια για να πετάξουν κατά τη διάρκεια της σύζευξής τους.

Η εκτροφή των κηφήνων γίνεται νωρίς την άνοιξη και σταματά το φθινόπωρο. Όταν δεν υπάρχει μελιττοφορία τότε οι εργάτριες παύουν να τους ταΐζουν και τους διώχνουν από την κυψέλη με αποτέλεσμα να πεθαίνουν από την πείνα. Ο αριθμός των κηφήνων που υπάρχει μέσα σε ένα μελίσσι είναι μερικές εκατοντάδες και διαφέρει από περιοχή σε περιοχή καθώς έχει βρεθεί ότι σε νότιες περιοχές υπάρχουν κηφήνες σχεδόν όλο το χρόνο. Επίσης, μελίσσια τα οποία μεταφέρονται σε διαδοχικές περιοχές έχουν κηφήνες για μακρύτερο χρονικό διάστημα και κάποιες φορές όλο το χρόνο.

Μεγάλος αριθμός κηφήνων πολλές φορές παρατηρείται σε κυψέλες ορφανές όπου υπάρχουν ωοτόκος εργάτριες. Όταν η βασίλισσα αφαιρεθεί ή χαθεί από το μελίσσι, τότε οι εργάτριες αν υπάρχει γόνος προσπαθούν να θρέψουν μια καινούρια βασίλισσα, αν όμως δεν υπάρχει γόνος τότε η εκτροφή είναι σχεδόν αδύνατη (Χαριζάνης, 2014).

Φερομόνες των κηφήνων

Σε σύγκριση με τις φερομόνες των εργατριών και της βασίλισσας, οι γνώσεις για τις φερομόνες των κηφήνων είναι λιγιστές. Η χημική σύνθεση των φερομονών των κηφήνων παραμένει ακόμη άγνωστη. Διαπιστώθηκε ωστόσο ότι εκκρίσεις του σιαγονικού αδένου των κηφήνων προσελκύουν στους τόπους συγκέντρωσης τους άλλους κηφήνες. Επιπλέον, εικάζεται ότι οι φερομόνες των κηφήνων προσελκύουν στους τόπους συγκέντρωσής τους και τις βασίλισσες. Είναι προφανές ότι η επικοινωνία μεταξύ των αναπαραγωγικά ικανών μελισσών (κηφήνων με κηφήνες και κηφήνων με βασίλισσες) επηρεάζει τη συμπεριφορά σύζευξής τους, η οποία συντελείται εκτός κυψέλης (Υφαντίδης, 2002).

Η Εργάτρια

Η εργάτρια είναι μικρότερη από τον κηφήνα και τη βασίλισσα και αναπτύσσεται σε εργατικά κελιά. Η διάρκεια ζωής της ποικίλει καθώς επηρεάζεται από πολλούς διαφορετικούς παράγοντες και κυμαίνεται από μερικές ώρες μέχρι και 6 μήνες. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη χρονική διάρκεια της ζωής της, είναι η εποχή του έτους, η διαθέσιμη τροφή, οι ασθένειες, οι εχθροί καθώς και οι καιρικές συνθήκες

που επικρατούν (Χαριζάνης, 2014).

Οι εργάτριες εκτελούν σχεδόν όλες τις εργασίες που πραγματοποιούνται σε ένα μελίσσι από τη στιγμή που θα εκκολαφθούν. Ανάλογα με την ηλικία τους ορίζονται και οι δουλειές που κάνουν. Οι δουλειές που κάνουν γίνονται ηλικιακά με την παρακάτω περίπου σειρά α) καθαρισμός κελλιών, β) εκτροφή γόνου και περιποίηση της βασίλισσας, γ) υποδοχή νέκταρος από συλλέκτριες εργάτριες για επεξεργασία, δ) πακετάρισμα γύρης στα κελλιά, ε) χτίσιμο κηρήθρας, στ) σφράγισμα με κερί τα κελιά του γόνου και του ώριμου μελιού, ζ) καθάρισμα της φωλιάς, η) κάνουν αέρα με τα φτερά τους για να δροσιστεί η κυψέλη, θ) φρουρούν την κυψέλη, ι) πετούν έξω από την κυψέλη για συλλογή τροφής (γύρης και νέκταρος), νερού και πρόπολης.

Η συμπεριφορά των εργατριών αλλάζει όταν αντιλαμβάνονται την απουσία της βασίλισσας (10 πρώτες ώρες). Σε εργατικά κελιά όπου υπάρχουν νεαρές προνύμφες παρατηρείται μεγάλη τροφοδότηση με βασιλικό πολτό και τα κελιά αυτά μεγεθύνονται και μετατρέπονται σε βασιλοκύτταρα. Συνήθως, όταν η εκτροφή γίνεται σε προνύμφες έως 3 ημερών επιτυγχάνεται η σωστή εκτροφή βασίλισσας, εν αντίθεση με την εκτροφή σε μεγαλύτερες προνύμφες από 4 ημερών που είτε δεν επιτυγχάνεται η διαδικασία είτε οι βασίλισσες είναι υπανάπτυκτες. Μετά την εκκόλαψη της πρώτης βασίλισσας ακολουθεί η θανάτωση των υπολοίπων μέχρι να μείνει μια βασίλισσα στο μελίσσι.

Το μελίσσι που έχει χάσει τη βασίλισσα του, δεν έχει γόνο και αν δεν επέμβει ο ανθρώπινος παράγοντας είναι όπως αναφέραμε καταδικασμένο. Οι εργάτριες κάτω από αυτές τις συνθήκες αρχίζουν να γεννούν αυγά. Στις εργάτριες αναπτύσσονται οι ωοθήκες και δέκα ημέρες μετά σχηματίζονται τα πρώτα αυγά στις ωοθήκες. Από τα αυγά αυτά συνήθως παράγονται κηφήνες και οι εργάτριες αυτές ονομάζονται ωοτόκες.

Κατά την απώλεια της βασίλισσας, ακολουθεί το «κλάμα» των μελισσών, η επιβράδυνση στις συνήθειες διαδικασίες συλλογής γύρης και νέκταρος καθώς σταματάει και το κτίσιμο της κηρήθρας, ενώ το μελίσσι αποδιοργανώνεται και παρατηρείται λιποταξία. Η βασίλισσα εκκρίνει από τους αδένες της διάφορες χημικές ουσίες τις φερομόνες που μπορούν και κρατάνε το μελίσσι ενωμένο. Η λιποταξία γίνεται πιο αισθητή όταν οι κυψέλες είναι σε κοντινή απόσταση (η μια δίπλα στην άλλη) που παρατηρείται μετακίνηση του πληθυσμού από την ορφανή κυψέλη στην άλλη (Χαριζάνης, 2014).

1.3. Ανατομία και φυσιολογία της μέλισσας

1.3.1. Αναπαραγωγικό σύστημα

Το αναπαραγωγικό σύστημα ανήκει στα εσωτερικά συστήματα μιας μέλισσας. Η βασίλισσα και ο κηφήνας έχουν πλήρως ανεπτυγμένα τα γεννητικά τους όργανα σε αντίθεση με την εργάτρια που τα γεννητικά της όργανα είναι ατροφικά, μη πλήρως ανεπτυγμένα.

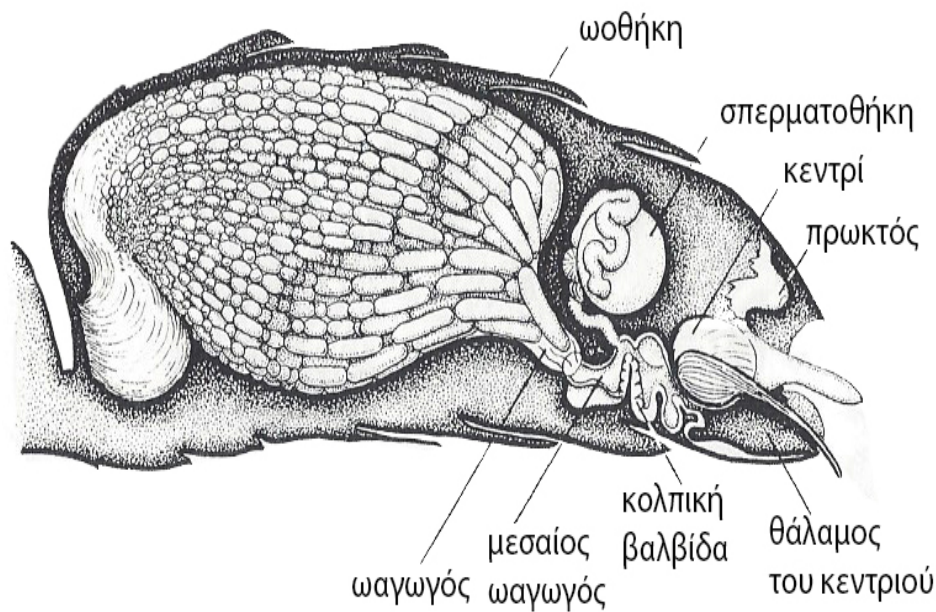
1. Αναπαραγωγικό σύστημα της βασίλισσας

Το αναπαραγωγικό σύστημα της βασίλισσας αποτελείται από δύο ευμεγέθεις αχλαδόμορφες ωοθήκες που καταλαμβάνουν μεγάλο μέρος της κοιλίας και η καθεμία περιέχει 150-180 ωοφόρους σωλήνες ή οβαριόλες. Οι οβαριόλες παράγουν μεγάλο αριθμό αυγών (που μπορεί να ξεπεράσει το ένα εκατομμύριο κατά τη διάρκεια της ζωής της).

Οι ωοθήκες συνδέονται με τη σπερματοθήκη και τον κολπικό θάλαμο μέσω των ωαγωγών, όπου γίνεται και η μεταφορά των αυγών. Η σπερματοθήκη, είναι ο χώρος αποθήκευσης των σπερματοζωαρίων των κηφήνων που αποθηκεύονται μετά τη σύζευξη της βασίλισσας με τους κηφήνες στην αρχή της ζωής της. Στη σπερματοθήκη αποθηκεύονται μέχρι και 7 εκατομμύρια σπερματοζωάρια όπου μπορούν να αποθηκευτούν εκεί μέχρι και 4 χρόνια. Για την υγιή αποθήκευση των σπερματοζωαρίων στη σπερματοθήκη παράγονται από τον αδένιο σπερματοθήκης θρεπτικά στοιχεία. Η σπερματοθήκη είναι σφαιρική και βρίσκεται όπως αναφέρθηκε πάνω από τον μεσαίο ωαγωγό και τον κολπικό θάλαμο, πριν από τον θάλαμο του κεντριού. Αποτελείται εξωτερικά από ένα λεπτό στρώμα τραχειών που διοχετεύει οξυγόνο στα σπερματοζωάρια.

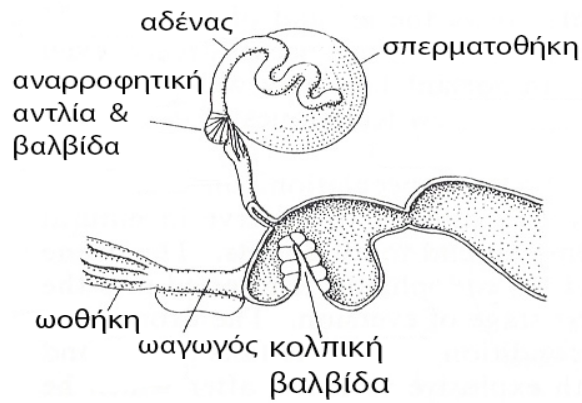
Τα όργανα στο κοιλιακό άνοιγμα της βασίλισσας βρίσκονται στο βάθος μεταξύ των τελευταίων κοιλιακών σκληριτών. Η συσκευή του κεντριού βρίσκεται στο κέντρο. Κοντά στην ραχιαία περιοχή είναι το άνοιγμα του πρωκτού και προς την κοιλιακή βρίσκεται το γεννητικό άνοιγμα. Το γεννητικό άνοιγμα καλύπτεται από την βάση του κεντριού, έτσι καθίσταται ορατό μόνο όταν μετακινηθεί όλη η βάση του κεντριού προς την ράχη. Ο θάλαμος του κεντριού καλύπτεται εσωτερικά από μαλακό υμένα που περιστοιχίζεται από κοντές σκούρες άκανθες χιτίνης, πτυχές του δέρματος που προεξέχουν οδηγούν στο κέντρο του κοιλιακού σκληρίτη σχηματίζοντας ένα τρίγωνο με τη συσκευή του κεντριού. Αυτό το τρίγωνο διαχωρίζει έναν εσωτερικό θάλαμο, τον θάλαμο οχείας, από τον θάλαμο του κεντριού. Ο θάλαμος οχείας περιλαμβάνει τον

κόλπο και τους θύλακες οχείας.

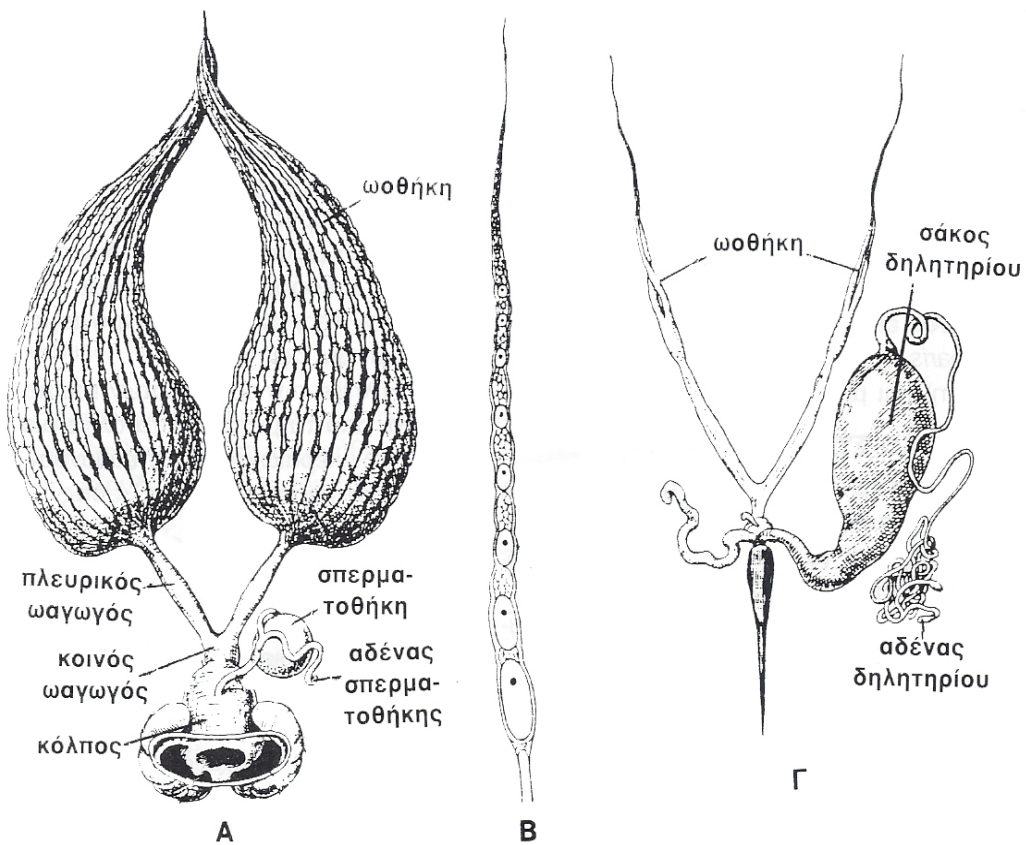


Εικόνα 1.3.1. Κατά μήκος τομή μιας γόνιμης βασίλισσας (Snodgrass, 1975).

Το κολπικό άνοιγμα έχει διάμετρο 0,65-0,68 mm είναι μια σχισμή που είναι κλειστή όταν η βασίλισσα είναι ήρεμη. Μέσα στο άνοιγμα, ένα μικρό και στενό τμήμα η κολπική δίοδος οδηγεί στον κολπικό θάλαμο μέσα στον οποίο διαμορφώνεται στο κάτω τμήμα η κολπική βαλβίδα. Στην κολπική βαλβίδα υπάρχουν ισχυρές μυϊκές ίνες έτσι ώστε να ανοίγει και να κλείνει την είσοδο προς τον αγωγό ή από τον αγωγό προς τον κόλπο. Στην κορυφή του κολπικού θαλάμου βρίσκεται το άνοιγμα του σπερματικού αγωγού που προέρχεται από την σπερματοθήκη. Αυτός ο αγωγός απότομα κάμπτεται οριζόντια και προς τα πίσω έτσι ώστε ο αναπαραγωγικός σωλήνας της βασίλισσας να μην αποτελεί μια ευθεία οδό αλλά να αποτελείται από ένα οριζόντιο και ένα κάθετο τμήμα. Το οριζόντιο τμήμα της αναπαραγωγική οδού, αντιπροσωπεύεται από το διάστημα μεταξύ της οροφής του κολπικού θαλάμου και της κολπικής βαλβίδας (Κωσταρέλου, 1988).



Εικόνα 1.3.2. Κατά μήκος τομή μέρους του αναπαραγωγικού συστήματος της βασίλισσας (Dade, 1977)



Εικόνα 1.3.3. Το αναπαραγωγικό σύστημα της θηλυκής μέλισσας. Α, Οι ωοθήκες και τα άλλα όργανα της βασίλισσας. Β, Μία οβαριόλη (ωοφόρος σωλήνας). Γ, Τα αναπαραγωγικά όργανα της εργάτριας μαζί με το κεντρί της (Χαριζάνης, 2014 ; Snodgrass, 1975)

2. Το αναπαραγωγικό σύστημα της εργάτριας

Οι εργάτριες μέλισσες, ως τα θηλυκά άτομα του μελισσιού διαθέτουν και αυτές

ωοθήκες οι οποίες έχουν κατά κανόνα υποστεί σημαντική υποπλασία.

Η υπανάπτυκτη και μη λειτουργική σπερματοθήκη και υπό ειδικές συνθήκες, κατά την ορφάνια ενός μελισσιού, κάποιες φορές ωοτοκούν αγονιμοποίητα αυγά καθώς δεν μπορούν ούτε να συζευχτούν με κηφήνες αλλά ούτε και να αποθηκεύσουν σπέρμα. Ωστόσο ένα ποσοστό από τις εργάτριες μπορεί να εμφανίσει ελαφρά ανεπτυγμένες ωοθήκες με μικρό οπωσδήποτε αριθμό οβαριόλων και τότε είναι ικανές να ωοτοκήσουν. Τα αυγά των ωοτόκων εργατριών θα δώσουν αρσενικά άτομα μπορεί όμως σε κάποιες περιπτώσεις να δώσουν θηλυκά άτομα.

α) Αρρενοτόκες εργάτριες

Εμφανίζονται σε μεγάλα ποσοστά σε ορφανά μελίσσια διότι δεν υπάρχει η επίδραση των φερομονών που παράγονται από τη βασίλισσα. Τα αυγά των αρρενοτόκων εργατριών εξελίσσονται παρθενογενετικά, όπως γίνεται με την ωοτοκία της βασίλισσας, με τα αυγά που δεν έχουν γονιμοποιηθεί (αρρενοτόκος παρθενογένεση). Η αποστασιοποίηση τους από τις δύο πηγές φερομονών, δηλαδή από τη βασίλισσα και από το γόνο επιτρέπει την παραγωγή περισσότερης νεανικής ορμόνης στην αιμολέμφο τους και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη των ωοθηκών τους.

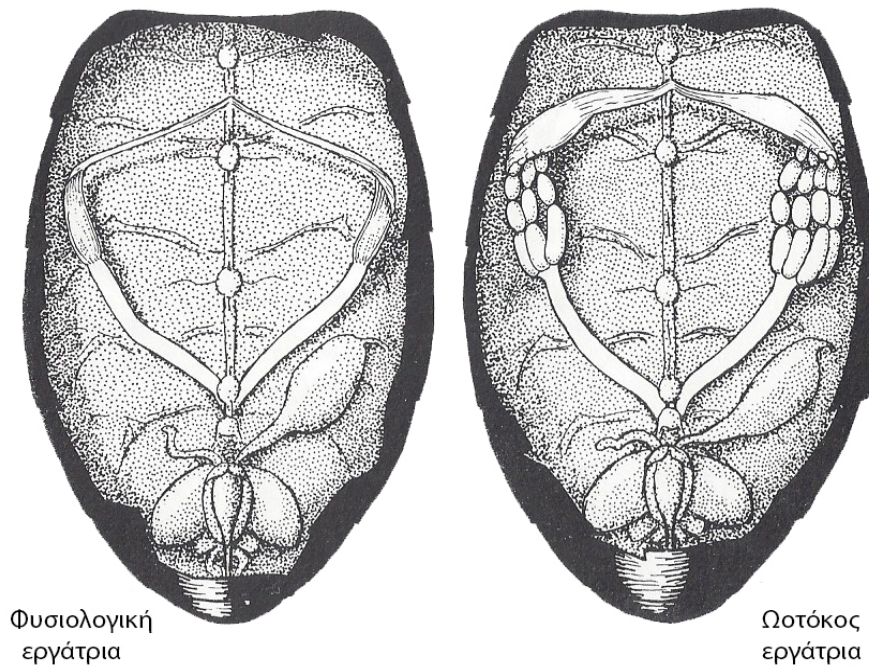
Οι ωοτόκες εργάτριες τοποθετούν άναρχα συνήθως στα τοιχώματα, μέσα σε κάθε κελλί περισσότερα του ενός αυγού, εν αντιθέσει με τη βασίλισσα που τοποθετεί στον κέντρο ένα και μόνο αυγό. Στη συνέχεια οι εργάτριες αφήνουν μόνο μια λάβρα να εξελιχθεί σε κάθε κελλί καθώς τις υπόλοιπες τις καταβροχθίζουν (κανιβαλισμός). Η άτακτη τοποθέτηση αυγών σε κάθε κελλί οφείλεται στο ότι η κοιλία της εργάτριας είναι πιο κοντή και μικρή από αυτήν της βασίλισσας. Επίσης, γίνεται διακριτή η εναπόθεση αυγού από ωοτόκο εργάτρια, καθώς το κάλυμμα του σφραγισμένου κελλιού με κηφνογόνο προεξέχει όσο και ένα κανονικό κηφνοκελλί. Επίσης, εμφανίζεται ο κηφνογόκος διάσπαρτος πάνω στην κηρήθρα.

Η ωογένεση στη βασίλισσα διεγείρεται από την παρουσία της νεανικής ορμόνης στην αιμολέμφο. Στις ωοτόκες εργάτριες διεγείρεται από τη χαμηλή περιεκτικότητα της γοναδοτρόπου ορμόνης (Robinson et al., 1992).

β) Θηλυτόκες εργάτριες

Οι ωοτόκες εργάτριες είναι δυνατόν να παράγουν παρθενογενετικά και θηλυκούς απογόνους. Σύμφωνα με τους Verma και Ruttner (1983) κατά τη μειωτική πυρηνοδιαίρεση ο πυρήνας του ωαρίου της εργάτριας συνενώνεται με τον πυρήνα ενός

από τα τρία πολικά σωματία, με αποτέλεσμα να προκύπτουν αυτομικτικά ένα διπλοειδές άτομο.

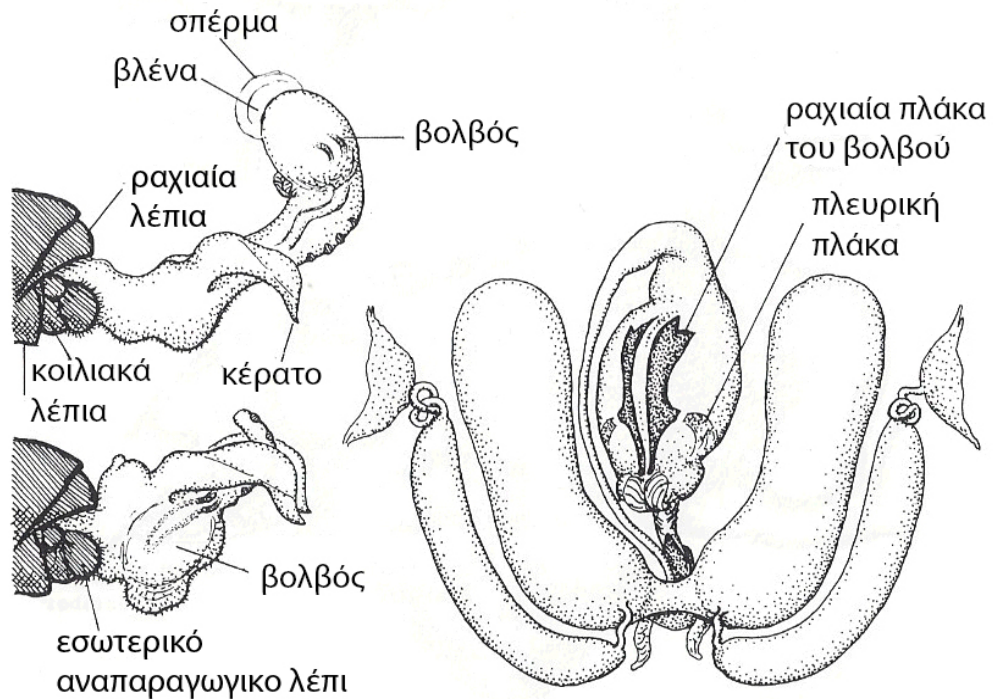


Εικόνα 1.3.4. Ωσθήκες φυσιολογικής εργάτριας και ωστόκου εργάτριας (Dade, 1977).

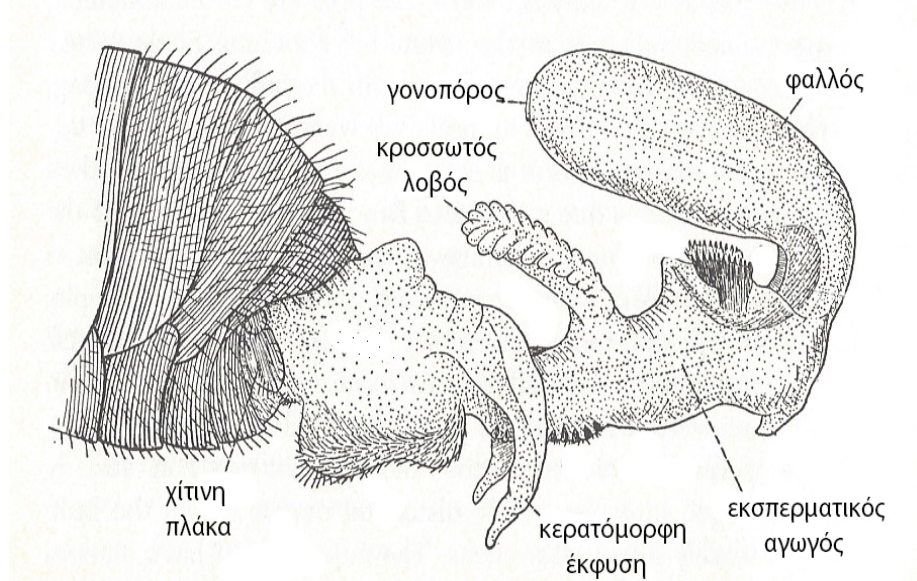
3. Το αναπαραγωγικό σύστημα του κηφήνα

Οι όρχεις είναι τα αναπαραγωγικά όργανα τα οποία περιέχουν τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα και μέσα στα οποία εξελίσσονται τα σπερματοζώαρια. Στον κηφήνα, οι όρχεις ολοκληρώνουν την ανάπτυξη τους ενώ ο κηφήνας βρίσκεται μέσα στο κελλί, πριν εξέλθει από αυτό. Οι όρχεις περικλείονται από ένα μεγάλο αριθμό σωλήνων, περίπου 200 σπερματοφόροι σωλήνες, που μέσα τους παράγονται τα σπερματοζώαρια. Αυτά αποθηκεύονται στις σπερματικές κύστες που επικοινωνούν με τους όρχεις με τον εκκριτικό αγωγό. Σε κάθε ένα από τους όρχεις ξεκινά ένας εκφορητικός αγωγός που καταλήγει στην σπερματική κύστη. Σε αυτήν αποθηκεύονται τα σπερματοζώαρια μέχρι τη σύζευξη. Από κάθε σπερματική κύστη ένα στενό κανάλι οδηγεί στην έξοδο των βλεννογόνων αδένων οι οποίοι συνενώνονται μεταξύ τους. Ο κοινός εκσπερματικός αγωγός συνδέει όλο το σύστημα με το φαλλό. Κατά τη σύζευξη εκβάλλεται ο φαλλός και το πιο εσωτερικό σακκόμορφο τμήμα του ο βολβός του ενδόφαλλου έρχεται στην άκρη του οργάνου. Μετά τον ενδοφαλλό υπάρχει μια στένωση που φέρει φτερόμορφο εξάρτημα και ακολουθούν δύο κερατόμορφες εκφύσεις.

Ο εκσπερματικός αγωγός καταλήγει στο βολβό κι από εκεί στον ενδοφαλλό. Το τμήμα αυτό αναστρέφεται κατά την σύζευξη κι επέρχεται η εκσπερμάτωση μαζί με μια προστατευτική βλέννα. Μετά από τη σύζευξη και την εκσπερμάτωση ακολουθεί ο θάνατος του κηφήνα καθώς τα όργανα αποκόβονται από το υπόλοιπο σώμα.



Εικόνα 1.3.5. Οι δύο διαδοχικές φάσεις της αναστροφής του ενδοφαλλού του κηφήνα. Πάνω αριστερά πλήρης αναστροφή. Κάτω αριστερά μερική αναστροφή. Δεξιά απεικονίζονται τα αναπαραγωγικά όργανα του κηφήνα όπως είναι μέσα στην κοιλία (Dade, 1977).



Εικόνα 1.3.6. Τα αναπαραγωγικά όργανα του κηφήνα μετά την αναστροφή (Snodgrass, 1975).

1.3.2. Η μεταβίβαση των κληρονομικών ιδιοτήτων στο μελίσι

Η μεταβίβαση των κληρονομικών ιδιοτήτων (γονιδίων) στην περίπτωση του είδους της *Apis mellifera* και σε επίπεδο πολυκύτταρου οργανισμού συντελείται με τα θηλυκά και τα αρσενικά γαμετικά κύτταρα. Η μεταβίβαση αυτή γίνεται αφενός προς τους θηλυκούς απογόνους (εργάτριες και νέες βασίλισσες), με συμμετοχή της βασίλισσας και των κηφήνων με τους οποίους αυτή είχε συζευχθεί και αφετέρου προς τους αρσενικούς απογόνους (κηφήνες) αλλά μόνο από τη βασίλισσα. Οι κηφήνες απόγονοι της βασίλισσας, δεν κληρονομούν χαρακτηριστικά από τους κηφήνες με τους οποίους έχει συζευχθεί η βασίλισσα. Σε ότι αφορά τη μεταβίβαση των κληρονομικών ιδιοτήτων από τις ωοτόκες εργάτριες, αυτή συντελείται αναγκαστικά και μόνο με τα θηλυκά γαμετικά κύτταρα (ωάρια) κατ' αποκλειστικότητα προς τους κηφήνες απογόνους τους, καθώς οι εργάτριες του μελισσιού, απόγονοι μιας συγκεκριμένης κάθε φορά βασίλισσας, έχουν κληρονομικές ιδιότητες επιπλέον και από τους κηφήνες με τους οποίους είχε συζευχθεί η βασίλισσα. Στο σύνολο του ο πληθυσμός των κηφήνων του μελισσιού, από ωοτόκες εργάτριες εκφράζει τις κληρονομικές ιδιότητες του μελισσιού, δηλαδή και αυτές της βασίλισσας και των επί μέρους γονέων κηφήνων, το σπέρμα των οποίων φέρει η συζευγμένη βασίλισσα στη σπερματοθήκη της (Υφαντίδης, 2004).



Εικόνα 1.3.7. Εργατικά κελιά με κηφηνόγονο άτακτα κατανεμημένο από φωτόκες εργάτριες

1.3.3. Περιοχές συγκέντρωσης κηφήνων

Το ζευγάρι γίνεται σε συγκεκριμένες περιοχές, ίδιες κάθε χρόνο, και μέσα σε μία απόσταση έως και μερικών χιλιομέτρων μακριά από τα φυσικά ή τεχνητά ενδιαιτήματα των μελισσιών. Οι περιοχές αυτές ονομάστηκαν «τόποι συγκέντρωσης των κηφήνων» (Loper, et al. 1987). Οι κηφήνες διανύουν αποστάσεις έως και 5 Km από τη φωλιά τους. Αντίθετα οι βασίλισσες επισκέπτονται τέτοιους τόπους, οι οποίοι βρίσκονται σε απόσταση όχι μεγαλύτερη από 2 Km από το δικό τους μελίσσι. Δεν είναι ακόμη γνωστό, αν το ανάγλυφο του εδάφους ή κάποιοι άλλοι παράγοντες, όπως ανοδικά ρεύματα αέρα, τοπικές οσμές, μαγνητικά πεδία κ.λπ., θα μπορούσαν να ευθύνονται, ώστε να καθοδηγούν τους κηφήνες κάθε χρόνο στους ίδιους τόπους.

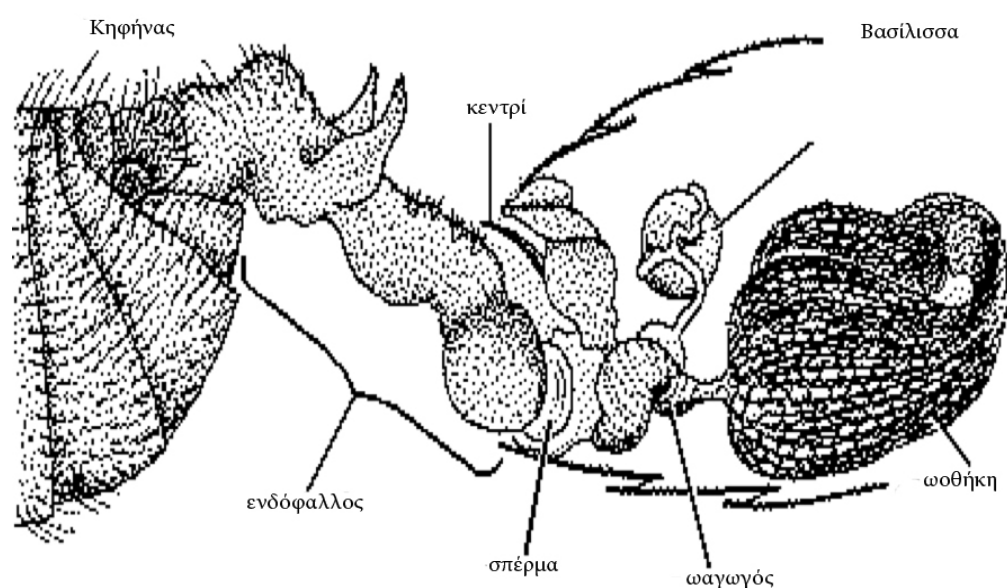
Οι βασίλισσες και οι κηφήνες έχουν την τάση να πετούν αρκετά μακριά από τη φωλιά τους, προκειμένου να πάνε στους τόπους που γίνεται η σύζευξη. Επίσης, ο αριθμός των κηφήνων που μαζεύονται σε μια τέτοια περιοχή είναι πολύ μεγάλος, συχνά πάνω από 25.000. Αυτά τα δύο γεγονότα είναι πολύ σημαντικά καθώς μειώνουν κατά πολύ την πιθανότητα συγγενούς αναπαραγωγής (Winston, 1987). Σε κάθε περίπτωση, οι κηφήνες από διάφορα μελίσσια πετούν και φθάνουν στους τόπους συγκέντρωσής τους και περιμένουν εκεί με τη μορφή σμήνους τις παρθένες βασίλισσες.

Οι πτήσεις των κηφήνων πραγματοποιούνται σε ύψος περίπου 15-20 m πάνω από την επιφάνεια του εδάφους, μέσα σε μια περιοχή με διάμετρο έως και 200 m. Η

βασίλισσα προσελκύεται από τον ιπτάμενο αυτό σχηματισμό των κηφήνων με φερομόνες, τις οποίες φαίνεται να παράγουν οι τελευταίοι, από τους σιαγονικούς τους αδένες. Ενδέχεται επίσης οι φερομόνες οι οποίες προσελκύουν τις βασίλισσες στους τόπους συγκέντρωσης των κηφήνων να προέρχονται και από αδενικά κύτταρα των κεραιών τους (Υφαντίδης, 2005).

1.3.4. Σύζευξη

Κατά τη σύζευξη, το σπέρμα εισάγεται στους ωαγωγούς κατευθείαν από τον ενδοφαλλό μέσω του κόλπου καθώς η βασίλισσα κατά τη διάρκεια της σύζευξης ανοίγει το γεννητικό άνοιγμα και χαμηλώνει την κολπική βαλβίδα. Τα σπερματοζώαρια μετακινούνται στην σπερματοθήκη με την επίδραση της έκκρισης του αδένου της σπερματοθήκης, είτε με περισταλτικές κινήσεις είτε με πίεση που οφείλεται στις κινήσεις της βασίλισσας και την αντλία σπέρματος.



Εικόνα 1.3.8. Η αναπαράσταση της σύζευξης. Απεικόνιση της θέσης του ενδόφαλλου του κηφήνα στον κόλπο της βασίλισσας κατά τη σύζευξη (Winston, 1987) .

2.1. Ιστορική εξέλιξη της τεχνητής σπερματέγχυσης

Η τεχνητή σπερματέγχυση απασχολεί πολλά χρόνια τους μελισσοκόμους σε όλο τον κόσμο. Η διαδικασία της γονιμοποίησης δεν ήταν γνωστή και πολλοί πίστευαν ότι η βασίλισσα γεννούσε τα αυγά στα κελιά και τα γονιμοποιούσαν οι κηφήνες μέσα στην κυψέλη. Ο Reaumur το 1740 τοποθέτησε μια βασίλισσα και ένα κηφήνα σε ένα

βάζο παρατηρώντας το υποτιθέμενο ζευγάρι, χωρίς βέβαια κάποια επιτυχία. Ακολούθησαν πολλές απόπειρες για σύζευξη της βασίλισσας από τους κηφίνες και ειδικότερα μετά τη γνωστοποίηση (1897) ότι η γονιμοποίηση γίνεται στον αέρα παρατηρώντας ότι οι βασίλισσες επιστρέφουν στην κυψέλη με το «σημάδι του ζευγαρώματος» δηλαδή τα γεννητικά όργανα του κηφήνα στο γεννητικό άνοιγμα της βασίλισσας. Το 1885, ο MacLain προσπάθησε γονιμοποιήσει βασίλισσα τοποθετώντας σταγόνες σπέρματος στο γεννητικό της άνοιγμα.

Εκείνος που απέδειξε ότι η τεχνητή σπερματέγχυση είναι δυνατή στις βασίλισσες και έθεσε τις βάσεις για την τεχνητή σπερματέγχυση ήταν ο Watson το 1927. Χρησιμοποίησε μικροσύριγγα για την έγχυση του σπέρματος και σταθεροποίησε την βασίλισσα σε μια ξύλινη συσκευή. Στην συνέχεια, ο Nolano το 1932 και αργότερα ο Laidlaw το 1934 βελτίωσαν την συσκευή και την τεχνική καθώς βελτίωσε κατάλληλα το κολπικό ραβδί για τον παραμερισμό της κολπικής βαλβίδας βοηθώντας στην ευκολότερη έγχυση του σπέρματος στον ωαγωγό. Με την παρατήρηση της βασίλισσας έγινε αντιληπτό ότι η βασίλισσα συζευγνύεται από πολλούς κηφίνες και πολλές φορές ολοκληρωνόταν η σύζευξη με περισσότερες από μια γαμήλιες πτήσεις. Ακολούθησαν οι Mackensen και Roberts (1948) όπου βελτίωσαν τη συσκευή του Nolan και προσάρμοσαν τον σωλήνα CO₂ για την αναισθητοποίηση της βασίλισσας και το 1949 ο Laidlaw σχεδίασε μια συσκευή ακριβείας που περιείχε μεγάλη ακρίβεια στους χειρισμούς. Στις αρχικές αυτές συσκευές έγιναν βελτιώσεις και το 1985 ο Harbo σχεδίασε μια σύριγγα που χρησιμοποιήθηκε για την αποθήκευση του σπέρματος. Οι Kaftanoglu και Peng (1980) σχεδίασαν μια σύριγγα μεγάλης χωρητικότητας και τελειοποίησαν την τεχνική για την συλλογή του σπέρματος.

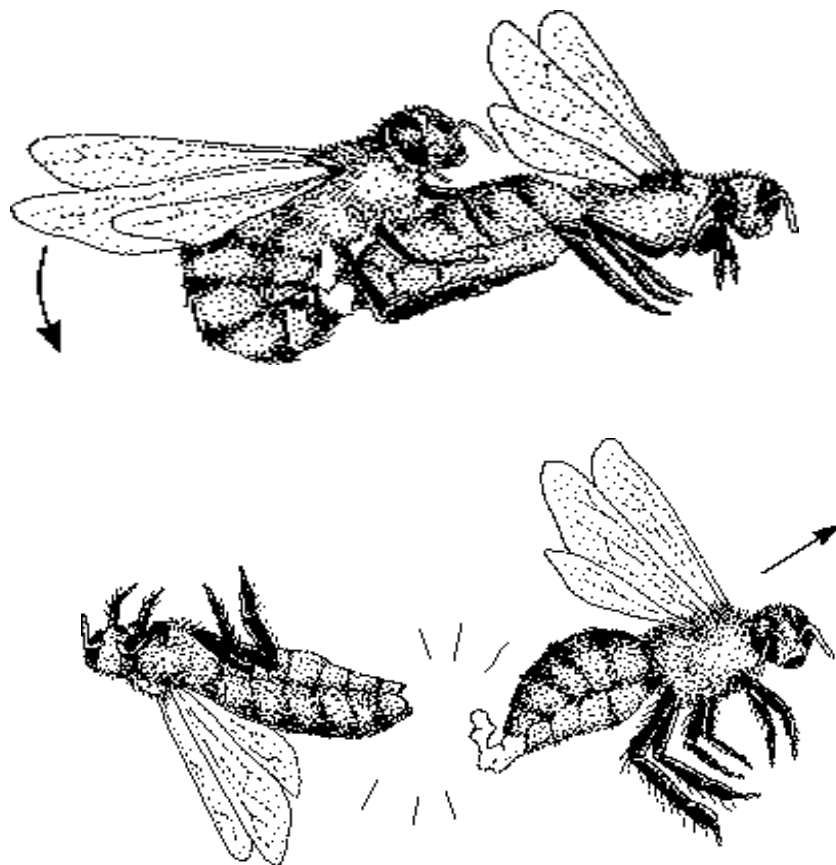
2.1.1. Φυσική γονιμοποίηση

Η παρθένα βασίλισσα μια βδομάδα (5-10 ημέρες) μετά την έξοδο της από το κελλί για να συζευχθεί, προβαίνει στην πρώτη της πτήση. Η πτήση πραγματοποιείται τις πρώτες μεσημεριανές ώρες (12:00-17:00) με θερμοκρασία υψηλότερη των 20°C, αίθριο ουρανό και ταχύτητα ανέμου μικρότερη από 28 km/h και συζευγνύεται με 8-10 κηφίνες. Η βασίλισσα πηγαίνει σε ένα σημείο συγκέντρωσης των κηφίνων το οποίο μπορεί να απέχει έως 2 με 3 km από την αποικία. Οι κηφίνες πετάνε σε υψόμετρο μεγαλύτερο των 10 μέτρων και είναι σε θέση να διανύσουν έως και 10 χλμ για να συζευχθούν. Τα σημεία όπου συγκεντρώνονται ονομάζονται χώροι συγκέντρωσης ή

σύζευξης. Οι χώροι αυτοί είναι οι ίδιοι κάθε χρόνο δεν γνωρίζουμε όμως ποιά στοιχεία τους καθορίζουν. Όταν φτάσει το σμήνος των κηφήνων αυτοί την ακολουθούν καθώς τους προσελκύει η μορφή της ή οι φερομόνες που εκκρίνει. Οι πιο γρήγοροι και εύρωστοι κηφήνες τη γονιμοποιούν. Η διάρκεια της πτήσης διαρκεί από 5 έως 18 min και αν οι καιρικές συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές το γαμήλιο ταξίδι αναβάλλεται. Αν δεν συζευχθεί η βασίλισσα τις 4 πρώτες βδομάδες λιγοστεύουν οι πιθανότητες σύζευξης της. Κατά τη σύζευξη, ο κηφήνας θανατώνεται μετά την αναστροφή των γεννητικών του οργάνων (εικ.2.1.1.) Μέρος των γεννητικών του οργάνων (βολβός και χιτινώδεις πλάκες) και βλέννη παραμένουν στο γεννητικό άνοιγμα της βασίλισσας που αποτελεί το «σημάδι ζευγαρώματος».

Η σύζευξη μπορεί να ολοκληρωθεί σε μια πτήση, όμως πολλές φορές λόγω δυσμενών συνθηκών μπορεί το γαμήλιο αυτό ταξίδι να γίνει 2 και 3 φορές.

Η ωοτοκία αρχίζει τρεις περίπου ημέρες μετά τη σύζευξη. Η βασίλισσα μπορεί να ζήσει και να ωοτοκεί για 1-4 χρόνια υπό φυσιολογικές συνθήκες.



Εικόνα 2.1.1. Φάσεις κατά τη διάρκεια της σύζευξης βασίλισσας με κηφήνα (Winston, 1987).

2.1.2. Τεχνικές και βελτίωση των μελισσών

Οι μέλισσες είναι κοινωνικά έντομα είναι σαν μια μεγάλη οικογένεια που αποτελείται από μια βασίλισσα, κηφήνες και εργάτριες.

Κατά την πτήση της η βασίλισσα συζευγνύεται με περισσότερους από έναν κηφήνα στον αέρα. Ερευνητές προσπάθησαν να κατανοήσουν την κληρονομικότητα των μελισσιών και το πώς μεταβιβάζονται τα χαρακτηριστικά από τους γονείς σε ολόκληρο το μέλισσι. Ο μοναχός Gregor Mendel με πειράματα προσπαθούσε να κατανοήσει την κληρονομικότητα δίχως θετικά αποτελέσματα καθώς δεν μπορούσε να ελέγξει το ζευγάρι της βασίλισσας από τα αρσενικά άτομα καθώς τα ίδια μετά την σύζευξη πεθαίνουν.

Ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στη μέλισσα είναι το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του γενοτύπου (απλοειδή και διπλοειδή άτομα) και του περιβάλλοντος (ποσότητα και ποιότητα τροφής, μέγεθος κελλιού).

Στα θηλυκά άτομα έχουμε επίδραση από παράγοντες του περιβάλλοντος όπως η τροφή και η ποσότητα που δίνεται στην προνύμφη προς κατανάλωση και το μέγεθος του κελλιού όπου και τοποθετείται. Ο διμορφισμός αυτός δηλαδή η εξέλιξη του αυγού - προνύμφης σε εργάτρια ή βασίλισσα παρουσιάζεται στις μέλισσες όπως και μεταξύ των θηλυκών ατόμων και των κηφήνων που καθορίζεται μόνο από κληρονομικούς παράγοντες (απλοειδή άτομα-προέρχονται από αγονιμοποίητα αυγά-κηφήνες, διπλοειδή - άτομα που προέρχονται από γονιμοποιημένα αυγά -εργάτριες και βασίλισσα).

Τα αγονιμοποίητα αυγά και επομένως η προέλευση ενός ατόμου από αυτά, αποτελεί μια διαδικασία την παρθενογένεση. Τα αρσενικά άτομα ενός μελισσιού εκτός από ειδικές περιπτώσεις έχουν προέλθει από το γενετικό υλικό της βασίλισσας. Αυτό το είδος της παρθενογένεσης ονομάζεται αρρενοτοκία. Οι κηφήνες έχουν 16 χρωμοσώματα που συνθέτουν το ένα μέλος κάθε ζεύγους χρωμοσωμάτων. Θηλυτοκία ονομάζεται η προέλευση θηλυκών από αγονιμοποίητα αυγά που σε πολλές περιπτώσεις παράγουν παρθενογενετικά διπλοειδείς εργάτριες και βασίλισσες καθώς και απλοειδής κηφήνες.

Οι κηφήνες που παράγονται από ωοτόκες εργάτριες μέλισσες είναι λίγο μικρότεροι σε μέγεθος από τους κανονικούς και είναι σε θέση να συζευχθούν με την βασίλισσα (Gençer and Kahya, 2011).

Είναι αδύνατο να ξεχωρίσουμε και να απομακρύνουμε τις εργάτριες μέλισσες

που γεννούν γιατί δεν διαφέρουν από τις άλλες και έχουν εξίσου την δυνατότητα να πετούν. Οι μέλισσες θεωρούν τις ωοτόκες εργάτριες μέλισσες σαν βασίλισσες γι' αυτό και δεν δέχονται καμιά άλλη βασίλισσα. Εάν τινάξουμε όλο τον πληθυσμό 25 μέτρα μακριά θα γυρίσουν στην παλιά τους φωλιά όλες οι μέλισσες συμπεριλαμβανομένων και των ωοτόκων.

Σε αρκετές περιπτώσεις οι μέλισσες ξεκινούν βασιλικά κελιά από κηφηνοκελλιά και αργότερα τα καταστρέφουν. Εάν αντικαταστήσουμε σε μερικά κελιά την προνούμφη που προήλθε από αγονιμοποίητο αυγό από μια κανονική από κάποιο άλλο μελίτσι, πιθανό οι μέλισσες να «ξεγελαστούν» και να εκθρέψουν νέα βασίλισσα. Η πρακτική έδειξε ότι δεν αξίζει τον κόπο να προσπαθεί κανείς να σώσει ένα μελίτσι που παρουσίασε ωοτόκες εργάτριες. Η καλύτερη λύση είναι η απομάκρυνσή του και το τίναγμα των μελισσών ώστε οι μέλισσες να πάνε σε διάφορα μελίτσια. Οι ωοτόκες δεν θα γίνουν δεκτές. Θα πρέπει όμως να γίνει με προσοχή καθώς υπάρχει η πιθανότητα διασποράς ασθενειών.

2.1.3. Κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη για τη βελτίωση των μελισσών

Η βελτίωση είτε με επιλογή με τις ελεγχόμενες συζεύξεις είτε με την τεχνητή σπερματέγχυση έχει σκοπό να παράγουμε μελίτσια με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Τα χαρακτηριστικά αυτά που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη είναι:

- α) ο πληθυσμός του μελισσιού να είναι μεγάλος ώστε να μπορεί να αντιμετωπίζει πιο εύκολα τους εχθρούς και να επιβιώνει σε αντίξοες συνθήκες.
- β) η παραγωγή του μελιού να είναι ικανοποιητική,
- γ) η επιθετικότητα του μελισσιού να είναι σε ανεκτά επίπεδα από τους μελισσοκόμους.
- δ) η ποσότητα και η εμφάνιση του γόνου που είναι δείκτης ποιότητας της βασίλισσας και επίσης αποδεικνύει αν το μελίτσι έχει κάποια ασθένεια.
- ε) η ανθεκτικότητα στις ασθένειες
- στ) η συλλογή γύρης και πρόπολης
- ζ) η διάθεση του μελισσιού για σμηνοουργία.

2.1.3.1. Βελτίωση με επιλογή

Όταν βρεθούν μελίτσια με άριστα χαρακτηριστικά τότε εφαρμόζονται οι ελεγχόμενες συζεύξεις για την παραγωγή απογόνων όπου θα φέρουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά προγράμματα αυτά βελτίωσης με επιλογή είναι μακροχρόνια και αυστηρά ως προς την διεκπεραίωσή τους. Για τον πλήρη έλεγχο των συζεύξεων μεταφέρονται οι αγονιμοποίητες βασίλισσες σε περιοχές απομακρυσμένες όπου δεν μπορούν να φθάσουν κηφήνες άλλοι εκτός από τους επιλεγμένους κατά τα γαμήλια ταξίδια που θα εκτελέσουν οι βασίλισσες που έχουν επιλεγεί. Συνήθως τα προγράμματα αυτά γίνονται σε νησιά και σε μεγάλα λιβάδια αλλά δεν αποτελεί ικανοποιητικό τρόπο για τους μελισσοκόμους καθώς δεν καθίσταται πρακτικός και απόλυτα επιτυχής. Ο μόνος τρόπος πλήρους ελέγχου των συζεύξεων είναι η τεχνητή σπερματέγχυση.

2.1.3.2 Δοκιμή κόρντοβαν (Cordovan test)

Η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων από τις συζεύξεις στις αναφερόμενες απομονωμένες περιοχές, πρέπει να ελέγχεται έστω κι αν σ' αυτές είναι γνωστές οι προϋποθέσεις για καθαρές συζεύξεις ή ακόμα μπορούν να δημιουργηθούν. Ποτέ δεν αποκλείεται να υπάρχει ένας άγνωστος αριθμός από ελεύθερες («άγριες») μέλισσες, στις περιοχές αυτές μέσα σε φυσικές κοιλότητες. Ο σχετικός αυτός έλεγχος γίνεται τουλάχιστον μια φορά με τη δοκιμή cordovan. Το γνώρισμα «cordovan» (χρώμα του εξωσκελετού της μέλισσας) προέρχεται από μια μετάλλαξη που κληρονομείται υποτελώς. Μια βασίλισσα cordovan (cd) δίνει μόνο καφέ χρώματος απογόνους, όταν συζευχθεί με κηφήνες cordovan, ενώ αντίθετα δίνει απογόνους με το συνηθισμένο «άγριο» χρώμα μιας συγκεκριμένης φυλής μελισσών, όταν συζευχθεί με κηφήνες αυτής της φυλής. Σε μικτές συζεύξεις οι απόγονοι είναι 105 άλλοι καφέ και άλλοι σκούρου χρώματος. Με τη μετάλλαξη αυτή που δεν είναι θανατηφόρα, μπορεί να διαπιστωθεί με μεγάλη ακρίβεια και σε φυσικές συνθήκες ο βαθμός καθαρότητας της σύζευξης που προσφέρει κάθε περιοχή η οποία επιλέγεται για το σκοπό αυτό (Χατζάκης, 2005; Υφαντίδης, 1987).

2.1.3.3. Τεχνητή γονιμοποίηση – σπερματέγχυση

Κανένας από τους τρόπους ελεγχόμενης σύζευξης στη μέλισσα, δεν μπορεί να εγγυηθεί απόλυτο έλεγχο της προέλευσης των αναπαραγωγικών ατόμων. Αυτό όμως δεν μειώνει καθόλου τη χρησιμότητα των σχετικών μεθόδων, όταν βέβαια εφαρμόζονται στο κατάλληλο στάδιο ενός προγράμματος βελτίωσης. Στα πρώτα στάδια ενός τέτοιου προγράμματος είναι αναπόφευκτη η χρησιμοποίηση της τεχνητής σπερματέγχυσης στη βασίλισσα, γιατί μόνο μ' αυτόν τον τρόπο μπορούν να επιτευχθούν οι εφικτά υψηλή βαθμοί ομοζυγωτίας με συγγενική αναπαραγωγή. Όμως ενώ με την τεχνητή σπερματέγχυση ελέγχεται απόλυτα η προέλευση της βασίλισσας και των κηφήνων δεν είναι πρακτικά δυνατόν να επεκταθεί η χρήση της και στα επόμενα στάδια του προγράμματος βελτίωσης, όπου ο αριθμός των γονιμοποιητών βασιλισσών γίνεται πολύ μεγάλος, λόγοι που δεν επιτρέπουν κάτι τέτοιο είναι όχι μόνο οι ποικίλες φροντίδες που χρειάζονται τα αναπαραγωγικά άτομα (κυρίως πριν, αλλά και μετά τη σπερματέγχυση), αλλά και ο πολύς χρόνος που απαιτείται για τη σπερματέγχυση μιας και μόνης βασίλισσας. Τέλος, υπάρχουν πολλές αμφιβολίες για το αν πρέπει η τεχνητή σπερματέγχυση να χρησιμοποιείται για μαζική παραγωγή γονιμοποιημένων βασιλισσών και άμεσα διοχέτευση αυτών στο εμπόριο. Οι βασίλισσες αυτές δημιουργούν δυνατά μελισσοσμήνη ωστοκοούν για μεγάλο χρονικό διάστημα, παρατηρείται όμως συχνά αντικατάσταση τους μέσα σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα (Υφαντίδης, 1987).

Η τεχνητή σπερματέγχυση μας δίνει τη δυνατότητα να παράγουμε βασίλισσες άριστης ποιότητας με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά και εξασφαλίζει πλήρως τον έλεγχο των συζεύξεων. Οι βασίλισσες όπως προαναφέρθηκε, 5-10 ημέρες μετά την εκκόλαψη τους από το κελλί τους είναι ώριμες αναπαραγωγικά και ξεκινούν τις γαμήλιες πτήσεις. Για την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης θα πρέπει οι βασίλισσες να παράγονται κάτω από σωστές συνθήκες και να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερες σε μέγεθος (Ruttner, 1976).

α. Εκτροφή και προετοιμασία της βασίλισσας για την πραγματοποίηση της τεχνητής σπερματέγχυσης.

Για να πραγματοποιηθεί η τεχνητή σπερματέγχυση εγκλωβίζονται οι παρθένες βασίλισσες στα κυψελίδια σύζευξης με εργάτριες παραμάνες (μικρής ηλικίας) για να τις φροντίζουν. Υπάρχουν πολλοί τρόποι εισαγωγής της βασίλισσας σε κυψελίδιο. Ο

πιο ικανοποιητικός είναι αυτός κατά τον οποίο η βασίλισσα απομονώνεται με έναν κλωβό σε ένα τμήμα της κηρήθρας όπου δεν υπάρχουν μέλισσες και υπάρχει φρεσκοεκκολαπτόμενος γόνος. Μετά από λίγες ημέρες ο κλωβός απομακρύνεται και η βασίλισσα με τις νεαρές μέλισσες που εκκολάφθηκαν ενώνονται με τον πληθυσμό του κυψελιδίου. Σύμφωνα με τους Szabo και Townsend (1974) η ηλικία των εργατριών μελισσών επηρεάζει τη συμπεριφορά και την επιθετικότητα τους κατά την εισαγωγή της παρθένας βασίλισσας. Εργάτριες ηλικίας 7 ημερών δέχονται και ταΐζουν την αγονιμοποίητη βασίλισσα που εισάγουμε στο κυψελίδιο, ενώ εργατριες ηλικίας 13 έως 21 ημερών την απορρίπτουν. Η σύλληψη της βασίλισσας γίνεται τις πρωινές ώρες (10:00) ή νωρίς το απόγευμα (16:00), για να μην ξεκινήσει την πτήση της για ζευγάρισμα. Θα πρέπει να εμποδίζουμε την πτήση της βασίλισσας με ένα διάφραγμα που θα πρέπει να τοποθετείται στην είσοδο του κυψελιδίου για να μην πετάξει και ζευγαρώσει με ανεξέλεγκτους κηφήνες.

Ο εργαστηριακός χώρος όπου διεξάγεται η τεχνητή σπερματέγχυση πρέπει να είναι καθαρός, η θερμοκρασία να είναι σταθερή στους 25°C και η σχετική υγρασία υψηλή περίπου 85% (Εικόνα 2.1.2.).



Εικόνα 2.1.2. Εργαστηριακός χώρος όπου διενεργείται η τεχνητή σπερματέγχυση

Κατά την ώρα της σπερματέγχυσης η θερμοκρασία όπως αναφέρθηκε δεν θα πρέπει να είναι κάτω από 25°C. Οι βασίλισσες που έμειναν αρκετή ώρα εγκλωβισμένες αφήνονται να πετάξουν για να αποβάλλουν τα περιττώματά τους πριν την τοποθέτηση

τους στη συσκευή, καθώς το γεμάτο απευθυσμένο της βασίλισσας πιέζει και μετατοπίζει το γεννητικό αγωγό της, ώστε να καθίσταται δύσκολη η ομαλή εισαγωγή της σύριγγας σπερματέγχυσης.

β. Εκτροφή κηφήνων και προβλήματα κατά τη διαδικασία της τεχνητής σπερματέγχυσης.

Απαραίτητο και χρήσιμο είναι να βρίσκεται το μελίσι εκτροφής κηφήνων κοντά στο χώρο του όπου γίνονται οι σπερματεγχύσεις. Για την αποτροπή της ανάμειξης των εκτρεφόμενων, κηφήνων του με εκείνους από άλλα γειτονικά μελισσοσμήνη, εφαρμόζονται διάφοροι τρόποι για τον περιορισμό τους. Τοποθετείται κατάλληλο διάφραγμα (απόσταση των συρμάτων του 5,2 mm) στην είσοδο της κυψέλης, χωρίς να παρεμποδίζεται η κυκλοφορία των εργατριών αφού έχει ευρύχωρα περάσματα γι αυτές. Στην απρόσκοπτη αναχώρηση και επιστροφή των συλλεκτριών βοηθά και η λοξή τοποθέτηση του διαφράγματος σε συνδυασμό και με το πλατύ σκέπασμα της κυψέλης στην οποία το διάφραγμα είναι προσαρμοσμένο. Με τη διάταξη αυτή οι κηφήνες δεν συνωστίζονται τόσο πολύ επάνω στο διάφραγμα, επειδή δεν βλέπουν ουρανό. Η θέα του ουρανού αποτελεί γι αυτούς έντονο ερέθισμα για πτήση οπότε και αναζητούν επίμονα τρόπο διαφυγής προς το ύπαιθρο όταν περιορίζονται. Ωστόσο ο περιορισμός των κηφήνων δεν μπορεί να διατηρηθεί πέρα από μια εβδομάδα χωρίς προβλήματα. Ιδιαίτερα τις ζεστές ημέρες οι ώριμοι για πτήση κηφήνες συνωστίζονται επάνω στο διάφραγμα και η παραμονή αυτής της κατάστασης έχει ως αποτέλεσμα να καταστραφούν πολλοί απ' αυτούς. Αν για κάποιο λόγο δεν γίνεται να χρησιμοποιηθούν τότε, μεταφέρονται τα μελισσοσμήνη εκτροφής κηφήνων σε άλλη περιοχή, χωρίς το σχετικό διάφραγμα και τοποθετούνται σε αποστάσεις τουλάχιστον 50-100 m μεταξύ τους και ακόμα καλύτερα με την είσοδο τους σε διαφορετική κατεύθυνση. Κάτω από τις συνθήκες αυτές οι κηφήνες εκτελούν πτήση και ξαναγυρίζουν στην κυψέλη τους, χωρίς κανένα φόβο να παραπλανηθούν και να μουν σε άλλη. Αν οι κηφήνες πρέπει να διατηρηθούν για κάποιο χρονικό διάστημα έξω από την κυψέλη τους, συνίσταται να προστεθεί και ένας ίσος αριθμός από εργάτριες, στο κλουβί παραμονής, για να τους φροντίζουν και να τους διατηρούν σε θερμοκρασία 25-30°C. Χωρίς εργάτριες, οι κηφήνες χάνουν τη ζωτικότητα τους μέσα σε λίγες ώρες. Αν τέλος οι κηφήνες που μεταφέρονται στο χώρο για σπερματεγχύσεις δεν είχαν καμία ευκαιρία να πετάξουν, τοποθετούνται σε κατάλληλο κλουβί που φωτίζεται και θερμαίνεται στους 25- 30°C. Αυτό επιτρέπει στους κηφήνες να αποβάλλουν τα

περιπτώματα τους, κάνοντας εκεί μέσα σε μικρές αποστάσεις πτήσεις. Μετά από πτήση πέντε ως δέκα λεπτών της ώρας αναστρέφουν ευκολότερα το γεννητικό τους όργανο. Μέσα σ' αυτό το κουτί που έχει διαστάσεις 50x40x40cm είναι εύκολο να διακριθούν οι κηφήνες από τις μέλισσες και να συλληφθούν (Υφαντίδης, 1987).

Η εκτροφή των κηφήνων είναι δυσκολότερη από εκείνη της βασίλισσας και αυτό γιατί είναι εξαρτημένη από την εποχή του έτους. Για την εφαρμογή της τεχνικής χρειαζόμαστε μεγάλο αριθμό κηφήνων αναπαραγωγικά ώριμων. Η εκτροφή και ο αριθμός των κηφήνων που παράγεται από κάθε μέλισσι επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Η ορφάνια ενός μελισσιού, η αφθονία σε τροφές και ο μεγάλος πληθυσμός ενός μελισσιού ευνοούν την παραγωγή κηφήνων (Cobey, 2013). Μια ικανοποιητική διαρκής πηγή γύρης μπορεί να επιφέρει ένα καλό πληθυσμό κηφήνων (Cobey, 2013). Σε ένα μέλισσι η ώθηση για σμηνουργία διεγείρει το κτίσιμο κηφνοκελλιών με αποτέλεσμα την παραγωγή κηφήνων (Allen, 1965) καθώς και μέλισσα με μεγάλο αριθμό από κηφήνες έχουν συνήθως μεγάλη τάση για σμηνουργία. Ο αριθμός της ποσότητας των σπερματοζωαρίων καθορίζεται τις 3 πρώτες μέρες στο στάδιο της προνύμφης. Η έλλειψη όμως τροφών δεν καθορίζει την μετέπειτα πορεία ενός κηφήνα, την αναπαραγωγική του ωριμότητα και την ποιότητα του σπέρματος παρά μόνο τον πληθυσμό των κηφήνων σε ένα μέλισσι (θανάτωση κηφήνων από εργάτριες μέλισσες) (Υφαντίδης, 1972).

Στην εκτροφή κηφήνων όπως και στην εκτροφή βασιλισσών θα πρέπει να επιλεγθούν κηφήνες από μέλισσα που φέρουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, σύμφωνα πάντα με τη βελτίωση, ως προς την χρήση που θέλουμε να κάνουμε. Εφόσον είναι επιθυμητός μεγάλος αριθμός κηφήνων θα πρέπει να επιλεγούν μέλισσα με μεγάλη διάθεση για σμηνουργία. Κατά την άνοιξη ή το φθινόπωρο τοποθετείται κηρήθρα με κηφνοκελλιά στο κέντρο της γονοφωλιάς του μελισσιού για να ωοτοκήσει εκεί η βασίλισσα. Ακολουθεί καταστροφή του υπόλοιπου κηφνογόνου που βρίσκεται στο υπόλοιπο μέλισσι. Ακολουθεί η καθημερινή τροφοδότηση του μελισσιού αν εμφανιστούν προβλήματα από επιδείνωση των καιρικών φαινομένων που δεν αφήνουν την ομαλή ανάπτυξη του μελισσιού.

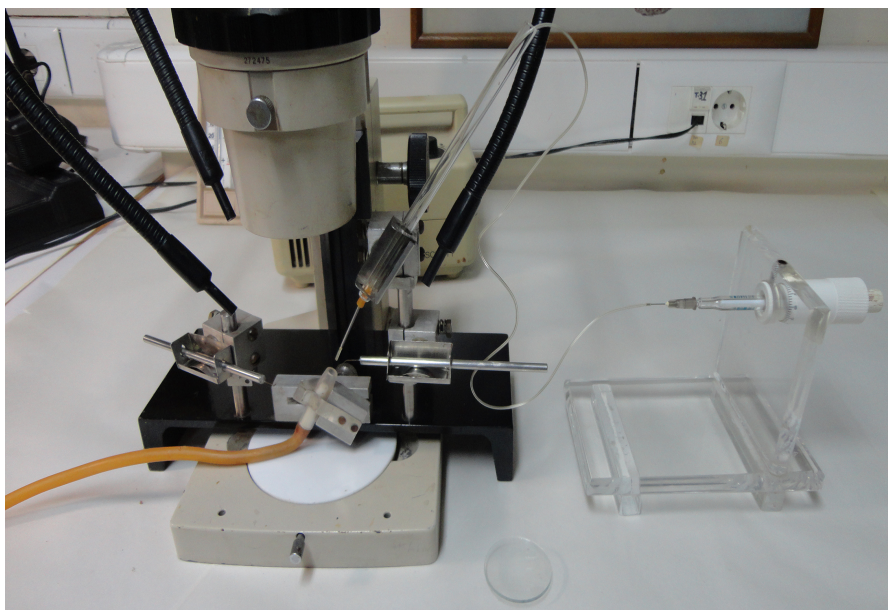
Κατά την εκκόλαψη και κατά διαστήματα 2-3 ημερών, οι εκκολαπτόμενοι κηφήνες σημαδεύονται με διαφορετικό χρώμα για να αναγνωρίζονται ευκολότερα αργότερα. Μετά τοποθετούνται σε μέλισσα με λίγους ή καθόλου κηφήνες.

2.1.3.1. Συσκευές που χρησιμοποιούνται στη τεχνητή σπερματέγχυση βασιλισσών

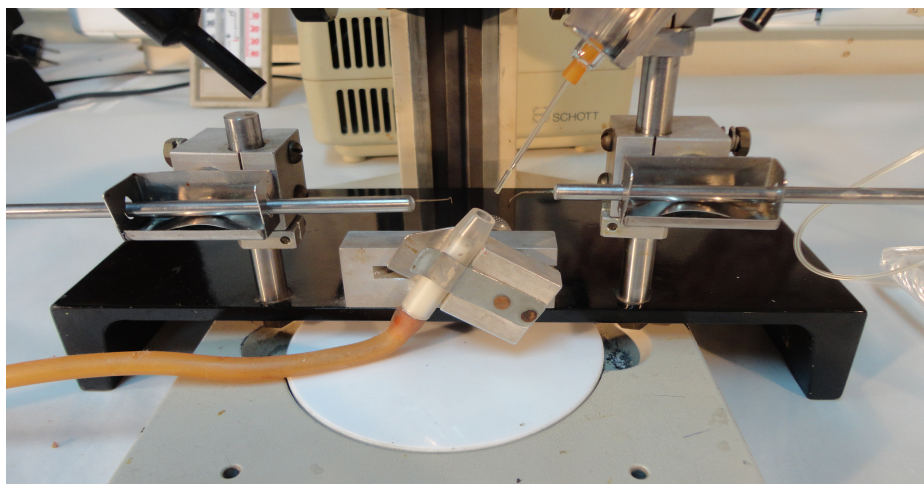
Η αποτελεσματικότητα της τεχνητής σπερματέγχυσης εξαρτάται από τη συσκευή που θα χρησιμοποιηθεί. Η συσκευή θα πρέπει να είναι εύκολη στη χρήση έτσι ώστε να γίνεται γρήγορα και εύκολα η διαδικασία. Επίσης, θα πρέπει να υπάρχει ακρίβεια στις κινήσεις των εξαρτημάτων ώστε να μειώσουμε το ποσοστό κάποιας δυσμενούς απώλειας. Οι πρώτες συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην πράξη και έχει υποστεί πολλές βελτιώσεις ήταν του Mackensen - Roberts.

Οι συσκευές που συναντούνται είναι:

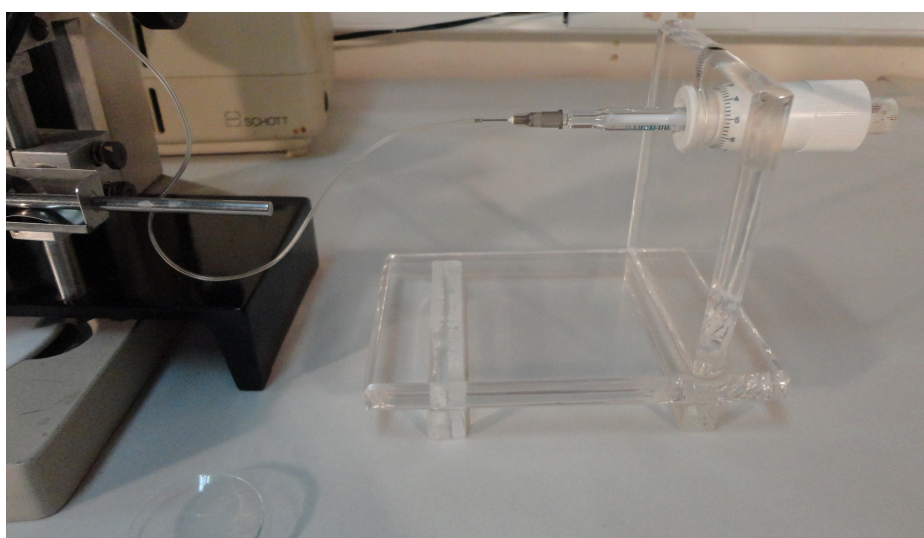
α) η συσκευή Standard που χρησιμοποιείται για την τεχνητή σπερματέγχυση και αποτελείται από: i) ένα σταθερό μέρος με δύο κάθετα στηρίγματα όπου στερεώνονται τα κινητά μέρη της συσκευής, ii) μια ειδική θήκη για την υποδοχή της βασίλισσας και το σύστημα συγκράτησης και αναισθητοποίησης της βασίλισσας, iii) τα άγκιστρα του κεντριού και το κοιλιακό άγκιστρο, με τις λαβές που είναι τοποθετημένες έτσι ώστε να μπορούν να κινούνται προς όλες τις κατευθύνσεις. Με τα άγκιστρα αυτά διανοίγεται προσεκτικά ο θάλαμος του κεντριού, iv) μια σύριγγα με διάφραγμα για την συλλογή και μεταφορά του σπέρματος. Επίσης, υπάρχει ένας συγκρατητήρας για την σύριγγα ώστε να την στηρίζει μηχανικά.
v) μία παροχή CO₂ με υψηλή πίεση που θα χρησιμοποιηθεί για την αναισθητοποίηση της βασίλισσας και τέλος vi) ένα στερεοσκόπιο με μεγέθυνση 6X ως 20X.



Εικόνα 2.1.3. Συσκευή τεχνητής σπερματέγχυσης Mackensen με σύριγγα Harbo με φωτισμό ψυχρό οπτικής ίνας και στερεοσκόπιο.



Εικόνα 2.1.4. Συγκρατητήρας και άγκιστρα Mackensen.



Εικόνα 2.1.5. Λεπτομέρεια σύριγγας Harbo για πολλαπλή συλλογή σπέρματος.



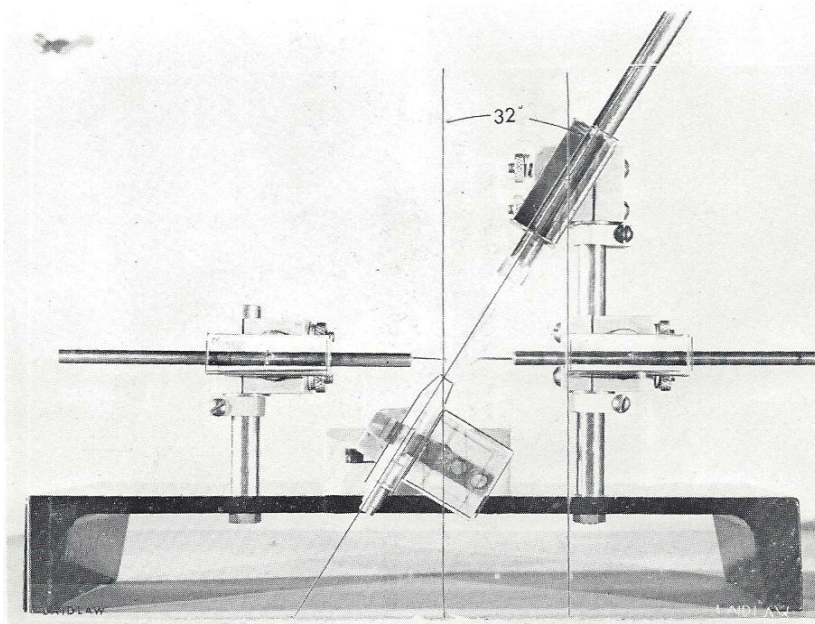
Εικόνα 2.1.6. Σύριγγα και άγκιστρα Mackensen.



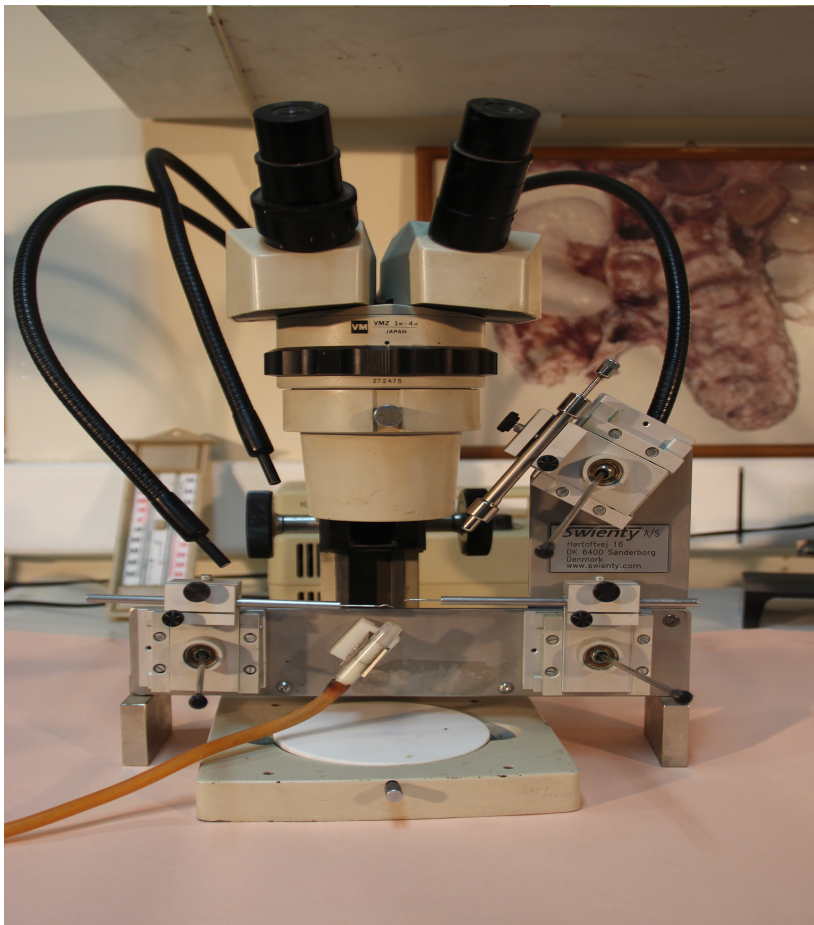
Εικόνα 2.1.7. Φιάλη CO₂ με ρολόι ρύθμισης πίεσης.



Εικόνα 2.1.8. Κλωβός πτήσης κηφίων.



Εικόνα 2.1.9. Σχεδιάγραμμα συσκευής τεχνητής σπερματέγχυσης Mackensen για την σωστή τοποθέτηση των ακίστρων και της σύριγγας κατά τη διαδικασία της τεχνητής σπερματέγχυσης.



Εικόνα 2.1.10. Σύσκευή τεχνητής σπερματέγχυσης Swienty (Δανία) με φωτισμό ψυχρό οπτικής ίνας και στερεοσκόπιο.

β) Η συσκευή Laidlaw, διαφέρει από την συσκευή Standard στο ότι όλες οι κινήσεις των εξαρτημάτων της ρυθμίζονται με κοχλίες. Η σύριγγα προσαρμόζεται σε μια βάση χωριστά από τα υπόλοιπα τμήματα της συσκευής που είναι το σύστημα για την συγκράτηση της βασίλισσας και τα δύο άγκιστρα.

Επομένως, τα απαραίτητα όργανα και εργαλεία που χρησιμοποιούνται, είναι το στερεοσκόπιο, μια φιάλη CO₂, η συσκευή τεχνητής σπερματέγχυσης που αποτελείται από α) τη βάση που στηρίζονται τα διάφορα μέρη της συσκευής, β) το σύστημα συγκράτησης και αναισθητοποίησης της βασίλισσας (συγκρατητήρας βασίλισσας), γ) τη σύριγγα για τη λήψη και μεταφορά του σπέρματος, δ) τα δύο άγκιστρα για το άνοιγμα του θαλάμου κεντρίου και το κοιλιακό ραβδί για το παραμέρισμα της κοιλιακής βαλβίδας.

Η απόληξη της σύριγγας πρέπει να είναι πολύ λεπτή ώστε να εισάγεται εύκολα στον ωαγωγό και η εσωτερική διάμετρος της αντικαταστάσιμης απόληξης της σύριγγας πρέπει να διευρύνεται απότομα για να είναι πιο εύκολη η διαδικασία μεταφοράς του σπέρματος. Στο χώρο μεταφοράς όπως προαναφέρθηκε θα πρέπει να υπάρχει σταθερή θερμοκρασία και υψηλή υγρασία για να μην αφυδατώνονται γρήγορα οι ιστοί της βασίλισσας. Με την ξηρή ατμόσφαιρα, δυσχεραίνεται η είσοδος της σύριγγας στον κόλπο της βασίλισσας αλλά και η έγχυση του σπέρματος καθώς υπάρχει πιθανότητα να στεγνώσει το άκρο της σύριγγας. Για να αποφύγουμε τυχόν προβλήματα η άκρη της σύριγγας υγραίνεται με φυσιολογικό ορό (Cobey et al., 2013).

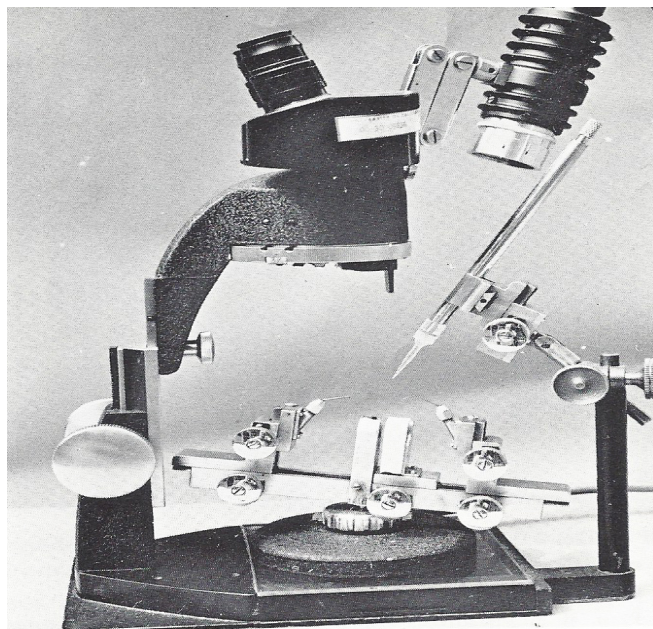
Ο σωλήνας παροχής του CO₂ προσαρμόζεται στον συγκρατητήρα της βασίλισσας. Συναρμολογείται η σύριγγα και γεμίζουμε τον υποδοχέα με φυσιολογικό ορό που μερικοί τοποθετούν και αντιβιοτικό. Το διάλυμα όπως αναφέρθηκε βοηθάει στην δημιουργία υγρασίας για την αποφυγή της αφυδάτωσης των ιστών του κοιλιακού ανοίγματος της βασίλισσας και του σπέρματος και το αντιβιοτικό προληπτικά για αποφυγή ασθενειών. Αφού γεμίσει ο υποδοχέας με το υγρό, προσαρμόζουμε την απόληξη προσεκτικά ώστε να μην πάρει αέρα. Πριν την αναρρόφηση του σπέρματος παίρνουμε μικρή ποσότητα αέρα ώστε να διαχωρίζει το σπέρμα από το αλατούχο διάλυμα.

Η σύριγγα προσαρμόζεται στη συσκευή. Η βασίλισσα που βρίσκεται στον κλωβό τοποθετείται σε ένα χαμηλό δοχείο και διοχετεύεται συνεχώς CO₂ (Laidlaw, 1977). Στη συνέχεια, τοποθετείται η βασίλισσα σε πλαστικό σωλήνα που έχει την ίδια διάμετρο με την ειδική θήκη συγκράτησης της, αλλά είναι στενός στην μια πλευρά ώστε να μην χωράει να εξέλθει. Όταν η βασίλισσα φθάσει σε αυτό το άκρο περπατάει

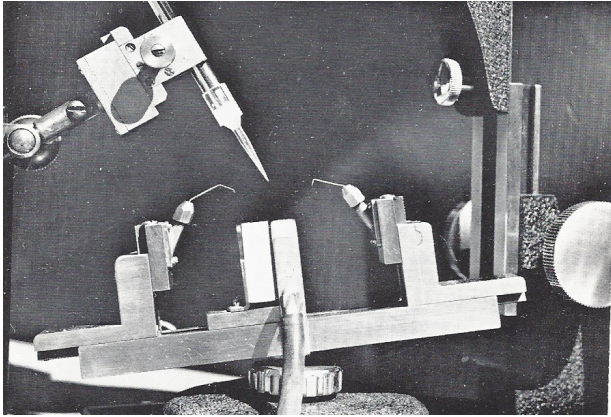
προς τα πίσω, αν τοποθετηθεί στο άλλο άκρο η ειδική θήκη. Η βασίλισσα εύκολα μετακινείται σε αυτήν με αποτέλεσμα η κοιλία της να κατευθύνεται προς το στενό άκρο της ειδικής θήκης και στη συνέχεια τοποθετείται το έμβολο μέσα από το οποίο διέρχεται το CO₂, ώστε να μην μπορεί να μετακινηθεί. Τέλος, η ειδική θήκη προσαρμόζεται στο σύστημα συγκράτησης της βασίλισσας.

Με την νάρκωση επιτυγχάνουμε την νάρκωση και ακινητοποίηση της βασίλισσας ώστε να αποφευχθούν τυχόν προβλήματα κατά την εκτέλεση της τεχνικής. Βαθμιαία ελαττώνονται οι αναπνευστικές κινήσεις της βασίλισσας μέχρι να ακινητοποιηθεί. Η ροή του CO₂ μπορεί να ρυθμιστεί καθώς μια ένδειξη μεγάλης ροής γίνεται φανερή όταν η κοιλία της βασίλισσας εκτείνεται υπερβολικά καθώς το CO₂ εισέρχεται βίαια στους κοιλιακούς αεροφόρους σάκους της (Cobey et al., 2013).

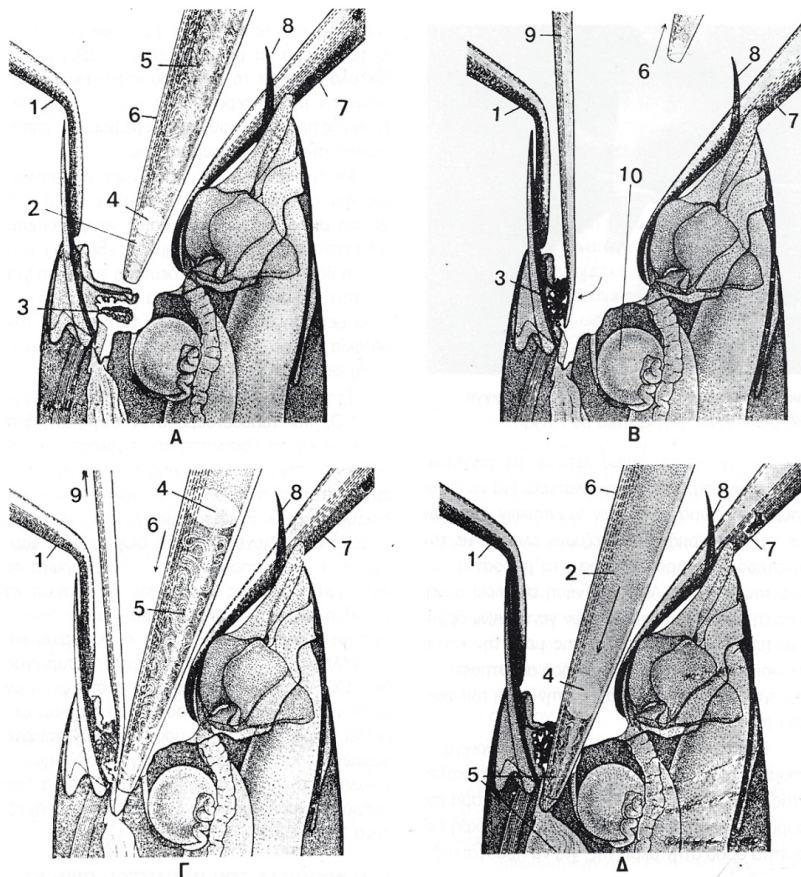
Κατά την τοποθέτηση της, θα πρέπει μόνο οι 3 τελευταίοι κοιλιακοί δακτύλιοι να προεξέχουν από αυτήν. Τα πίσω πόδια θα πρέπει να είναι εντός της θήκης. Τοποθετούνται τα δύο άγκιστρα μέσα στον θάλαμο του κεντριού, πρώτα το κοιλιακό αριστερά και μετά το άγκιστρο του κεντριού δεξιά. Τοποθετείται μετά το άνοιγμα των θαλάμου το άγκιστρο του κεντριού στη βάση του κεντριού και απομακρύνεται η βάση από το κολπικό άνοιγμα. Σύμφωνα με το Laidlaw (1976), το κοιλιακό άκρο του κολπικού ανοίγματος να είναι ορατό στα αριστερά του κεντριού σαν ένα V ενώ το ραχιαίο κολπικό τοίχωμα μοιάζει σαν μια μεμβράνη δεξιά του V.



Εικόνα 2.1.11. Συσκευή τεχνητής σπερματέγχυσης Laidlaw.



Εικόνα 2.1.12. Συσκευή τεχνητής σπερματέγχυσης Laidlaw με τοποθέτηση της βασίλισσας ανάμεσα σε δύο ελάσματα με σφουγγάρι.



Εικόνα 2.1.13. Τεχνητή σπερματέγχυση διαγραμματικά, Α) Η κοιλίας της βασίλισσας και η θέση των οργάνων της συσκευής, Β) Παραμέρισμα της κολπικής βαλβίδας με το κολπικό ραβδί. Γ) Εισαγωγή της σύριγγας. Δ) Έγχυση του σπέρματος. 1) κοιλιακό άγκιστρο 2) φυσιολογικός ορός, 3) κολπική βαλβίδα 4)φυσαλίδα αέρος 5) σπέρμα, 6) σύριγγα 7) άγκιστρο κεντριού 8) κεντρί, 9) κολπικό ραβδί 10) σπερματοθήκη κόλπος της βασίλισσας και βελόνα τεχνητής σπερματέγχυσης κατά την διαδικασία τοποθέτησης σπέρματος (Χαριζάνης, 2014; Ruttner, 1976).

Οι κηφίνες θα πρέπει να είναι αναπαραγωγικά ώριμοι (περίπου 10 ημέρες μετά την έξοδο τους από το κελλί). Τα σπερματοζωάρια μετακινούνται από τους όρχεις στις σπερματικές κύστες για να ολοκληρωθεί η αναπαραγωγική ωρίμανση με τα συστατικά που προσλαμβάνουν από τα επιθηλιακά κύτταρα της κύστης. Στις σπερματικές κύστες τα σπερματοζωάρια βρίσκονται χωμένα με την κεφαλή στα επιθηλιακά κύτταρα του τοιχώματος και παραμένουν σε αυτό το στάδιο για μερικές ημέρες. Τα αδενικά κύτταρα αδειάζουν το περιεχόμενο τους μεταξύ των σπερματοζωαρίων. Στους βλεννογόνους αδένες, γίνεται η έκκριση βλέννης από τα κύτταρα. Την 10^η με 12^η ημέρα της ηλικίας του μετά την έξοδο από το κελλί, τα σπερματοζωάρια είναι εντελώς ώριμα και κατά τη σύζευξη προωθούνται με την μυϊκή σύσπαση μέσα από τον εκφορητικό σπερματογωγό στην ελεύθερη επιφάνεια του βολβού του φαλλού.

Οι κηφίνες συλλαμβάνονται κατά τη διάρκεια της παραγωγικής περιόδου από την 12^η έως την 16^η ώρα. Εάν υπάρχει διάφραγμα τους συλλέγουμε από το άνοιγμα που υπάρχει στην κορυφή του διαφράγματος. Μετά τη συλλογή τους τοποθετούνται σε ειδικό κιβώτιο (κιβώτιο πτήσης), που φωτίζεται στο πάνω μέρος του, ώστε να μπορούν να πετούν και να τους δίνεται η ευκαιρία να αποβάλλουν τα περιττώματά τους. Τοποθετείται και ίσος αριθμός εργατριών για να τους ταΐζουν και να τους διατηρούν σε θερμοκρασία 25-30°C ώστε να μην χάνουν την ζωτικότητα τους (Ruttner, 1976). Μετά από πτήση 5-10 λεπτών αναστρέφουν ευκολότερα τα γεννητικά τους όργανα. Ακολουθεί η εκσπερμάτωσή τους με πίεση στον θώρακα κατά μήκος για να επιτευχθεί μερική αναστροφή των γεννητικών οργάνων και στη κοιλία πλαγίως ώστε να συστραφούν και να αναδιπλωθούν τα γεννητικά τους όργανα και να επιτευχθεί η εκσπερμάτωση τους (πλήρης αναστροφή). Την στιγμή της εκσπερμάτωσης αδειάζουν πρώτα οι σπερματικές κύστες και στην συνέχεια οι βλεννογόνοι αδένες. Το σπέρμα κατά την εκσπερμάτωση εμφανίζεται σαν μια καφέ κηλίδα να επιπλέει πάνω στην βλέννα πάνω στο τμήμα του βολβού του φαλλού. Το σπέρμα συλλέγεται με ειδική σύριγγα προσεχτικά από 10-17 κηφίνες και τοποθετείται είτε σε ειδικό διάλυμα Kien, για να παραμείνει ζωντανό και να χρησιμοποιηθεί αργότερα στη σπερματέγχυση, είτε με φυσιολογικό ορό. Οι κηφίνες που είναι μικρότεροι σε ηλικία (μικρότεροι από 10 με 12 ημερών) κατά την τεχνητή αναστροφή και εκσπερμάτωση από τον ανεστραμμένο ενδοφαλλό εξέρχεται μόνο βλέννη. Η βλέννη αυτή είναι υδαρής και ανομοιογενής. Κατάλληλο για σπερματέγχυση σπέρμα είναι από κηφίνες τουλάχιστον 12 ημερών (Ruttner, 1975). Οι κηφίνες που κατά την πίεση έχουν μαλακή κοιλία δεν είναι ώριμοι και είναι νεαροί σε ηλικία. Οι κερατόμορφες εκφύσεις των ώριμων αναπαραγωγικά

κηφήνων έχουν χρώμα πορτοκαλί ενώ οι ανώριμοι στερούνται αυτού του χρωματισμού (Cobey et al., 2013).

Καθώς η διαδικασία της αναστροφής προχωράει το σπέρμα εξέρχεται πρώτο και ακολουθεί η παχύρρευστη λευκή βλέννα. Οι κινήσεις των σπερματοζωαρίων συντελούν ώστε το σπέρμα να απλωθεί σαν λεπτό κάλυμμα πάνω στην βλέννα, γεγονός που κάνει δύσκολη την λήψη του. Έτσι είναι απαραίτητο να αναρροφηθεί γρήγορα το σπέρμα με την σύριγγα. Η επιφάνεια του σπέρματος έρχεται σε επαφή με το άκρο της σύριγγας που έχει μια κλίση 45° με προσεχτικούς χειρισμούς ώστε να μην διαπεράσει στο σπέρμα και να έρθει σε επαφή με την βλέννα καθώς μια τέτοια ενέργεια αχρηστεύει την σύριγγα (Cobey et al., 2013). Επειδή είναι παχύρρευστη η βλέννα δεν περνάει από το άκρο της σύριγγας και εμποδίζει την ροή του σπέρματος. Έτσι, θα πρέπει να καθαριστεί η δίοδος και η διαδικασία θα πρέπει να επαναληφθεί. Αν η επαφή του άκρου της σύριγγας διακοπεί, τότε αφήνεται μια μικρή ποσότητα σπέρματος να ακουμπήσει το σπέρμα που βρίσκεται στον φαλλό του κηφήνα και έτσι σύμφωνα με το Laidlaw (1977) αποκαθίσταται η επαφή.

Η σύριγγα και ιδιαίτερα το άκρο της θα πρέπει να καθαρίζεται με βαμβάκι εμποτισμένο με αποσταγμένο νερό (Cobey et al., 2013).



Εικόνα 2.1.14. Στάδια κατά την διαδικασία αναστροφής των γεννητικών οργάνων.

Έγχυση του σπέρματος

Η βασίλισσα που βρίσκεται αναισθητοποιημένη τοποθετείται κάτω από τον στερεοσκόπιο. Τα άγκιστρα είναι τοποθετημένα, έτσι ώστε να μπορεί η σύριγγα να περάσει στο μεσαίο ωαγωγό. Εισάγοντας την άκρη της σύριγγας στον κόλπο πρέπει να μετακινηθεί η κολπική βαλβίδα προς τα πίσω και να τοποθετηθεί η άκρη της σύριγγας στον μεσαίο ωαγωγό. Η μετακίνηση της βαλβίδας γίνεται με το κολπικό ραβδί. Το κολπικό ραβδί εισέρχεται στο ραχιαίο τμήμα του κόλπου με προσεχτικές κινήσεις, η κολπική βαλβίδα σύρεται προς την κοιλιακή πλευρά και η άκρη της σύριγγας περνάει πίσω από το κολπικό ραβδί. Τότε το κολπικό ραβδί απομακρύνεται και η σύριγγα βυθίζεται. Η σύριγγα θα πρέπει να βυθίζεται εύκολα στον κόλπο και το σπέρμα να εγχυθεί προσεκτικά (Cobey et al., 2013).

Μετά την έγχυση του σπέρματος η βασίλισσα τοποθετείται σε κλουβάκι και είτε εισάγεται σε κυψελίδιο, είτε σε χώρο με παραμάνες εργάτριες (νεαρές εργάτριες), ώστε να φροντίζουν τη βασίλισσα και γίνεται η τοποθέτηση ζαχαροζύμαρου. Η θερμοκρασία του χώρου θα πρέπει να είναι 35°C για να μπορέσει να μεταβιβάσει με επιτυχία το σπέρμα από τους ωαγωγούς στη σπερματοθήκη.

Η τάση των βασιλισσών για τη γαμήλια τους πτήση συνεχίζεται ακόμα και μετά την σπερματέγχυση, ειδικότερα εάν η ποσότητα του σπέρματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν μικρότερη από 6-8 mm³. Έτσι είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί στην είσοδο του κυψελιδίου βασιλικό διάφραγμα.

Η βασίλισσα πρέπει να τοποθετηθεί στην φωλιά του γόνου όπου η θερμοκρασία είναι κατάλληλη. Η κατάλληλη θερμοκρασία, η επαφή της με τις εργάτριες αλλά και η ελεύθερη μετακίνηση της βοηθούν στη πιο γρήγορη και ικανοποιητική μεταφορά των σπερματοζωαρίων στη σπερματοθήκη (Laidlaw, 1977). Κατά την έναρξη της ωοτοκίας αφαιρούμε το βασιλικό διάφραγμα.

3.1. Συζήτηση

Η τεχνητή σπερματέγχυση αποτελεί μια εργαστηριακή μέθοδο βελτίωσης και θα πρέπει να εκτελείται από εξειδικευμένο επιστημονικό προσωπικό για παραγωγή βασιλισσών με επιθυμητά χαρακτηριστικά. Ο εργαστηριακός χώρος που διεξάγεται η τεχνητή σπερματέγχυση, πρέπει να είναι απολυμασμένος και κάποια εργαλεία αποστειρωμένα, η θερμοκρασία να είναι σταθερή στους 25-30°C και η σχετική υγρασία

υψηλή περίπου 70-80%. Η διεξαγωγή του πειράματος θα πρέπει να γίνεται με προσοχή ώστε να αποφευχθούν τυχόν τραυματισμοί.

Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της τεχνητής σπερματέγχυση

Καθοριστικός παράγοντας, που συμβάλλει στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου, είναι η κατάλληλη ηλικία της βασίλισσας, αλλά και των κηφώνων. Οι βασίλισσες θα πρέπει να έχουν ηλικία 5 έως 14 ημερών. Μεγάλη σημασία για την επιτυχία της τεχνητής σπερματέγχυσης έχει η ηλικία της παρθένας βασίλισσας που θα δεχθεί την έγχυση του σπέρματος κατά τη διαδικασία. Βασίλισσες μεγαλύτερες των δύο εβδομάδων αποθηκεύουν μικρότερη ποσότητα σπερματοζωαρίων στην σπερματοθήκη τους, ενώ μικρότερες των τεσσάρων ημερών, έχουν μεγάλη θνησιμότητα (Woyke and Jasinski, 1976). Επίσης, καθώς οι περισσότερες παρθένες βασίλισσες πραγματοποιούν τις πτήσεις σύζευξης ανάμεσα στην 6^η και την 13^η ημέρα από την έξοδο τους από τα κελλιά, γίνονται συχνές προσπάθειες για να πετάξουν για να ζευγαρώσουν στον αέρα με αποτέλεσμα να χτυπάνε τα φτερά τους με κίνδυνο να τα σχίσουν, να χάσουν το τρίχωμα τους καθώς τρίβονται στο μεταλλικό διάφραγμα που κλείνει την είσοδο (Ruttner, 1976). Σύμφωνα με έρευνες ο Fresney (1966) αναφέρει ότι οι βασίλισσες δεν φθάνουν στην αναπαραγωγική ωριμότητα στην ίδια ηλικία και ότι εξαρτάται από την εποχή του έτους, με αποτέλεσμα βασίλισσες που παράγονται πολύ νωρίς την άνοιξη θα πρέπει να γονιμοποιούνται σε ηλικία 10-12 ημερών, ενώ αυτές που παράγονται σε πιο προχωρημένη εποχή πρέπει να γονιμοποιούνται σε ηλικία 5-6 ημερών.

Οι κηφίνες θα πρέπει να είναι αναπαραγωγικά ώριμοι (περίπου 10 ημέρες μετά την έξοδο τους από το κελλί). Οι κηφίνες μόλις εξέλθουν από το κελλί έχουν μεγάλη και μαλακή κοιλία. Οι ώριμοι κηφίνες έχουν μικρότερη κοιλία καθώς με τη μετανάστευση του σπέρματος από τους όρχεις στις σπερματικές κύστες γίνεται συρρίκνωση της κοιλιάς τους. Κηφίνες με ηλικία μικρότεροι των 10 ημερών δεν είναι αναπαραγωγικά ώριμοι, ενώ η χρησιμοποίηση κηφώνων με ηλικία μεγαλύτερη των 21 ημερών συχνά προκαλεί ασθένειες στις βασίλισσες καθώς αφήνει υπολείμματα στους ωαγωγούς. Το πρόβλημα της μεγαλύτερης ηλικίας δείχνει να εξαλείφεται αν κατά τη διαδικασία χρησιμοποιηθεί αντιβιοτικό και μικρότερη ποσότητα σπέρματος 4 μl (Harbo, 1985).

Ένας άλλος παράγοντας, σύμφωνα με έρευνες που έχουν διεξαχθεί, είναι η σωστή δοσολογία σπέρματος που χρησιμοποιείται, συνήθως 8-12 μl. Σε πείραμα με χρήση δόσης σπέρματος 4μl και 20 μl οι βασίλισσες είχαν στην σπερματοθήκη τους μικρό ποσοστό σπερματοζωαρίων αποθηκευμένο σε σχέση με βασίλισσες που είχαν δεχθεί ποσότητες 8μl και 12μl όπως και οι βασίλισσες από φυσική γονιμοποίηση. Επίσης, οι βασίλισσες που είχαν δεχθεί τεχνητή σπερματέγχυση ωοτόκησαν 28 ημέρες μετά την επέμβαση, πολύ αργότερα από τις βασίλισσες που ωοτοκούσαν με φυσική γονιμοποίηση (μέση περίοδος ωοτοκίας 10,4 ημέρες) (Gabkaj, 2013). Πολλές φορές, είναι δυνατόν να υπάρχει μικρό ποσοστό σπερματοζωαρίων στις βασίλισσες, καθώς δεν είναι γνωστό, αν οι κηφίνες που χρησιμοποιούνται είναι ώριμοι αναπαραγωγικά ή μπορεί να μην έχουν ζωντανά σπερματοζωάρια (Gencer and Kahya, 2011).

Η θερμοκρασία κατά την εκτροφή των κηφίνων θα πρέπει να είναι σταθερή καθώς μια μικρή πτώση της μπορεί να προκαλέσει καθυστέρηση στη μετακίνηση των σπερματοζωαρίων από τους όρχεις στις σπερματοδόχους κύστες. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να αντισταθμιστεί με την τροφοδότηση τους με γύρη (Cobey, 1983).

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται κατά την διάρκεια της σπερματέγχυσης, το σπέρμα και η βλέννα αποτελούν ένα ιδανικό μέσο για την μετάδοση και ανάπτυξη ασθενειών. Σύμφωνα με τον Ruttner (1976), δύο ασθένειες ενήλικων μελισσών μπορεί να μεταφερθούν με την τεχνητή σπερματέγχυση, η παράλυση και η σηψαιμία. Θα πρέπει να εξασφαλίζονται οι συνθήκες υγιεινής, να αποστειρώνονται και να καθαρίζονται όλα τα εργαλεία πριν και μετά την χρήση τους. Δεν θα πρέπει να υπάρχουν μέσα στο εργαστήριο άλλες μέλισσες νεκρές ή ζωντανές.

Πολλές φορές έχουμε απώλειες βασιλισσών μετά τη σπερματέγχυση αποτελεί μεγάλο πρόβλημα. Αυτό συμβαίνει όταν ο χειριστής της συσκευής είναι αρχάριος, με αποτέλεσμα να δημιουργεί πληγές στις βασίλισσες και με δευτερογενείς μολύνσεις να προκαλεί θνησιμότητα. Το ποσοστό αυτό όσο εξελίσσονται οι συσκευές τεχνητής σπερματέγχυσης μειώνεται (Κωσταρέλου, 1992).

Αν η τεχνική που χρησιμοποιείται είναι τελειοποιημένη και τηρούνται όλα τα μέτρα υγιεινής και έχουμε ακόμα μεγάλη θνησιμότητα τότε μπορεί να προκαλείται α) κατά τη διατήρηση των βασιλισσών β) από τα υπολείμματα σπέρματος που παραμένουν στους ωαγωγούς περισσότερο από 1-2 ημέρες και από την επιθετικότητα των εργατριών μελισσών όταν οι βασίλισσες εισάγονται στα μελίσσια (Harbo, 1985).

Η φροντίδα της βασίλισσας μετά την τεχνητή σπερματέγχυση, επηρεάζει την αποθήκευση των σπερματοζωαρίων και περαιτέρω την ωοτοκία (Woyke, 1979). Οι

βασίλισσες που παρέμειναν σε κλουβιά μετά τη σπερματέγχυση, αποθήκευαν λιγότερα σπερματοζωάρια από αυτές που τοποθετήθηκαν γρήγορα στην κυψέλη και έγιναν γρήγορα αποδεκτές από τις εργάτριες (Cobey et al., 2013).

Κατά την εισαγωγή της βασίλισσας σε ένα ορφανό μελίτσι θα πρέπει να μένει εγκλωβισμένη 1 με 2 ημέρες. Το μελίτσι θα πρέπει να έχει μεγάλα αποθέματα τροφών και ικανοποιητικό πληθυσμό έτσι ώστε να αποδεχθεί ευκολότερα την βασίλισσα από τεχνητή σπερματέγχυση. Ο Ruttner (1976) υποστηρίζει ότι δεν θα πρέπει να τοποθετούνται βασίλισσες που μόλις άρχισαν να γεννάνε σε πολύ δυνατά μελίτσια από όπου έχει πρόσφατα αφαιρεθεί μια βασίλισσα καθώς δε γίνονται εύκολα αποδεκτές από το μελίτσι αυτό.

Σύμφωνα με τους Kaftanoglou και Peng (1980), η φυσική γονιμοποίηση δεν μπορεί να αντικατασταθεί από την τεχνητή γονιμοποίηση. Η διαδικασία στη φυσική γονιμοποίηση, η πτήση, η επαφή με τους κηφήνες, οι φερομόνες που εκκρίνονται κατά την διάρκεια της σύζευξης, καθώς και το σημάδι ζευγαρώματος, όταν επιστρέφει στην κυψέλη, πιθανόν να επιφέρουν αλλαγές στον τρόπο συμπεριφοράς της βασίλισσας και των εργατριών της κυψέλης. Οι παράγοντες αυτοί συμμετέχουν στην ωτοκία που είναι μια διαδικασία πρωτεϊνικής εξάρτησης, η οποία δεν υφίσταται στις βασίλισσες που έχουν δεχθεί τεχνητή σπερματέγχυση. Η επέμβασή με CO₂ στην τεχνητή σπερματέγχυση, δεν μπορεί να αντικαταστήσει όλη τη διαδικασία της φυσικής γονιμοποίησης. Η χρησιμοποίηση του εξυπηρετεί δύο σκοπούς α) ακινητοποιεί την βασίλισσα και χαλαρώνει τους ιστούς της, ώστε να διευκολύνεται η εισαγωγή της σύριγγας και β) προκαλεί επίσπευση της ωτοκίας μετά τη σπερματέγχυση κατά την τοποθέτησή της πίσω στην κυψέλη. Οι βασίλισσες που γονιμοποιούνται τεχνητά δεν αρχίζουν να ωτοκοούν τόσο νωρίς όσο οι της φυσικής γονιμοποίησης. Πολλοί συνιστούν να γίνονται δύο αναισθητοποιήσεις με CO₂, καθώς η πρώτη να γίνεται κατά την διάρκεια της σπερματέγχυσης για την διεξαγωγή της τεχνικής και η δεύτερη γίνεται μια μέρα μετά (Schley, 1988).

Ένα πρόγραμμα βελτίωσης, για παραγωγή βασιλισσών με επιθυμητά χαρακτηριστικά, αποτελεί μια αργή και δύσκολη διαδικασία (Cobey και Lawrence, 1988) και δεν αποτελεί μια μέθοδο αντικατάστασης της φυσικής γονιμοποίησης για εμπορικούς σκοπούς, αλλά μόνο για ερευνητικούς. Το σπέρμα που συλλέγεται στο άκρο της σύριγγας πέφτει αργά και με λιγότερη πίεση στους ωαγωγούς της βασίλισσας κατά τη διάρκεια τεχνητής γονιμοποίησης σε σύγκριση με τις διαδοχικές και σπασμωδικές εκσπερματώσεις των κηφήνων κατά την φυσική γονιμοποίηση. Το

σπέρμα συλλέγεται στο άκρο της σύριγγας και δεν μπορεί δεχθεί πολύ πίεση κατά τη διάρκεια της έγχυσης εντός των πλευρικών ωαγωγών. Όμως, ο χειρισμός του σπέρματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη βιωσιμότητα του. Η ανακίνηση του σπέρματος πάνω και κάτω στο άκρο της σύριγγας κατά τη διάρκεια της συλλογής του σπέρματος προκαλεί βλάβη των σπερματοζωαρίων (Collins, 2004).

Σύμφωνα με Gencer et al. (2014) δείχνουν ότι η βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων που συλλέγονται στο άκρο της σύριγγας είναι γενικά χαμηλότερη (κάτω από 91%) από εκείνη των σπερματοζωαρίων στο σπερματική κύστη της βασίλισσας (98%) κατά την φυσική γονιμοποίηση. Τα στοιχεία μας έδειξαν ότι είναι αναπόφευκτη η απώλεια της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων που εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της αναστροφής των γεννητικών οργάνων του κηφήνα. Η συλλογή μέσα στο άκρο της σύριγγας του σπέρματος είναι ένας άλλος παράγοντας που προκαλεί το θάνατο των σπερματοζωαρίων. Πολλές εργασίες έχουν δημοσιευθεί για την βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων στους κηφήνες χωρίς να λαμβάνουν υπόψη την επίδραση της αναστροφή των γεννητικών οργάνων (αποτέλεσμα της πίεσης).

Οι τιμές της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων από το σπέρμα που συλλέγεται στο άκρο της σύριγγας είναι πάντα χαμηλότερες από τις τιμές της βιωσιμότητας των σπερματοζωαρίων που μετρήθηκαν στις σπερματοδόχες κύστεις των βασιλισσών καθώς σημαντικό ρόλο παίζει και η επίδραση της πίεσης κατά την αναστροφή των γεννητικών οργάνων.

Η εκτροφή βασιλισσών, έχει ως σκοπό την επιτυχή βελτίωση των ήδη υπάρχουσών βασιλισσών δηλαδή την αυξημένη ωοτοκία και παραγωγικότητα, την αντοχή στις ασθένειες, τον περιορισμό της επιθετικότητας των μελισσών, καθώς και την αντικατάσταση των γερασμένων (κάθε 1-2 χρόνια), τραυματισμένων και γενικά ελαττωματικών μη αποδοτικών βασιλισσών, με νέες άριστης ποιότητας και γνώστης προέλευσης βασιλισσών.

Επομένως, κατά την εφαρμογή οποιασδήποτε μεθόδου βασιλοτροφίας είναι απαραίτητο να τηρούνται ορισμένες βασικές αρχές οι οποίες είναι:

α) Η επιλογή ενός πολύ δυνατού μελισσιού έναρξης με διαπιστωμένα και καταγεγραμμένα τα άριστα ποιοτικά χαρακτηριστικά του και με ισορροπημένη σύνθεση μελισσών (εργατριών – παραμάνων)

β) Οι προνύμφες που προορίζονται για την εκτροφή βασιλισσών πρέπει να είναι ηλικίας μικρότερης των 24 ωρών, με ελαφριά κύρτωση προκειμένου να εξελιχτούν σε εύρωστες βασίλισσες με καλή σωματική διάπλαση.

γ) Οι συνθήκες διατροφής των βασιλικών κελιών να είναι άριστες στα μελίσσια εκτροφής πριν να σφραγιστούν, καθώς και μετά την έξοδο της βασίλισσας από το βασιλικό κελί και έως να ωριμάσει αναπαραγωγικά, και τέλος μετά την επιστροφή της από την πτήση σύζευξης ή την τεχνητή σπερματέγχυση, η ανάγκη για καλή διατροφή συνεχίζεται να είναι επιτακτική.

δ) Τέλος, απαιτείται χρόνος για τη σωστή εκμάθηση της τεχνητής σπερματέγχυσης και γνώσεις γενετικής.

Η αποτυχία στην εκτροφή ποιοτικών βασιλισσών συναντάται σε μεθόδους που η επιλογή των προνυμφών που προορίζονται για βασίλισσες, γίνεται από τις ίδιες τις μέλισσες και ο γόνος που περιέχει η κυψέλη είναι αγνώστου ηλικίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η επιλογή της προνύμφης από τις μέλισσες να μην είναι πάντα σωστή και πολλές φορές να χρησιμοποιούνται προνύμφες ηλικίας μεγαλύτερης των 24h (3-4 ημερών) με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται μέλισσες, σε ενδιάμεσο στάδιο εργάτριας και βασίλισσας και να απορρίπτονται νωρίς από τις παραμάνες μέλισσες. Χαμηλής ποιότητας βασίλισσες παράγονται όταν από ένα μικρό μελισσοσμήνος, με μικρό σχετικά πληθυσμό εκτρέφεται μεγάλος αριθμός βασιλικών κελιών. Αυτό έχει σαν συνέπεια να μην είναι ικανές οι παραμάνες μέλισσες να περιποιηθούν σωστά το γόνο στα βασιλικά κελιά, ούτε να δημιουργήσουν την άριστη θερμοκρασία που απαιτείται κατά την εκτροφή των βασιλισσών.

Όταν έχουμε ορφανά μελίσσια για μεγάλο χρονικό διάστημα, οι μέλισσες εργάτριες δίδουν προτεραιότητα στην εκτροφή βασιλισσών, που έχει σαν αποτέλεσμα να εγκαταλείπεται το 40-50% του εργατικού γόνου και έτσι να χάνεται. Εάν δεν υπάρχουν αυγά ή ανοιχτός γόνος στο ορφανό μελισσοσμήνος για την εκτροφή των βασιλισσών, τότε, δημιουργούνται ωοτόκες εργάτριες και τις περισσότερες φορές οδηγείται το μελίσι στον αφανισμό. Αμφιβόλου ποιότητας βασίλισσες εκτρέφονται όταν δεν είναι δυνατή η μεταφορά γόνου (προνυμφών από ελεγμένα και με καταγεγραμμένα τα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους μελισσοσμήνη), με γνώστης προέλευσης θηλυκών και αρσενικών γονέων, σε μελίσι) που έχουν την ικανότητα να εφοδιάζουν με άφθονο βασιλικό πολτό τις νεαρές προνύμφες κατά την εξέλιξή τους.

Δεδομένο ότι το μελίσι παραγωγής βασιλοκυττάρων, είναι επιλεγμένο για τα άριστα ποιοτικά χαρακτηριστικά του και οι συνθήκες διατροφής, σ' όλα τα στάδια εξέλιξης της βασίλισσας έως και την έναρξη της ωοτοκίας θα είναι πρέπει να είναι

άριστες. Για την απόκτηση βασιλισσών άριστης ποιότητας σπουδαίο ρόλο έχουν οι κηφήνες, όσο αφορά την επάρκεια τους, αλλά και την ποιότητα τους (σωματική ευρωστία και κυρίως γενετική προέλευση). Η εκτροφή κηφήνων είναι δυσκολότερη από εκείνη των βασιλισσών, επειδή είναι περισσότερο εξαρτημένη από την εποχή, ο αριθμός κηφήνων είναι μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των βασιλισσών και τέλος ο χρόνος που απαιτείται για την εκτροφή κηφήνων είναι σχεδόν διπλάσιος από το χρόνο που απαιτείται για την εκτροφή βασιλισσών. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούμε την τεχνητή σπερματέγχυση καθώς κατά την φυσική γονιμοποίηση δεν υπάρχει έλεγχος της προέλευσής των κηφήνων. Η εργασία αυτή θέλει να δώσει πληροφορίες για την πραγματική βιολογία της βασίλισσας και τι σημαίνει αυτό στην πράξη. Κάθε χρόνο στην Ελλάδα διακινούνται πολλές χιλιάδες βασίλισσες ένα μέρος από αυτές είναι γονιμοποιημένες με τεχνητή σπερματέγχυση και μάλιστα η τιμή τους υπερτιμημένη που μπορεί να φθάσει και τη δεκαπλάσια από αυτές της φυσικής γονιμοποίησης.

Θα πρέπει να γνωρίζει ο μελισσοκόμος ότι οι βασίλισσες που προέρχονται από τεχνητή σπερματέγχυση δεν μπορούν να ανταγωνιστούν αυτές της φυσικής γονιμοποίησης, όπως αναφέραμε προηγουμένως και καθιστά αυτήν την πράξη μια απάτη.

Μέρος Β΄
Μελέτη του σπέρματος των κηφήνων



1. Εισαγωγή

Η βασίλισσα όπως αναφέρθηκε γονιμοποιείται κατά τη γαμήλιά της πτήση στον αέρα από μέσο όρο 12 κηφήνες και αποθηκεύονται στη σπερματοθήκη 6 εκατομμύρια σπερματοζωάρια από κάθε κηφήνα (Kerr et al., 1962).

Σε περίοδο 40 ωρών, 5,5 εκατομμύρια μεταφέρονται από τον κόλπο στη σπερματοθήκη (Laidlaw and Page, 1984). Ποσοστό μεγαλύτερο από το 90% της ποσότητας των σπερματοζωαρίων που δέχεται απορρίπτεται και μόνο περίπου το 2,5% αποθηκεύεται στη σπερματοθήκη (Sturup et al., 2013). Στη σπερματοθήκη αποθηκεύονται μόνο τα ζωντανά σπερματοζωάρια (Collins, 2000).

Η ποσότητα σπέρματος που παράγουν τα έντομα είναι πολύ μικρή με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή οι εφαρμογή των μεθόδων μέτρησης σπέρματος που υπάρχουν για τα άλλα ζώα σε αυτά. Η μέθοδος μέτρησης των σπερματοζωαρίων γίνεται με τη βοήθεια του αιματοκυττόμετρου. Η μέτρηση του σπέρματος στα έντομα είναι μια πολύ χρήσιμη διαδικασία για την εξέλιξη της έρευνας στη φυτοπροστασία, τη γενετική και τη μελισσοκομία (Χαριζάνης, 1991).

Ο σκοπός της εργασίας, είναι η μέτρηση των ποιοτικών και ποσοτικών γνωρισμάτων των κηφήνων σε σχέση με το βάρος, τον αριθμό σπερμάτων καθώς και την σήμανση τους με ειδική χρώση για την εύρεση ζωντανών και νεκρών σπερμάτων και τις διαφορές κηφήνων που προέρχονται από ωοτόκες εργάτριες και από βασίλισσες και η ανάλυση των διαφορών τους και πειραματικά αλλά και βιβλιογραφικά.

1.1. Το σπέρμα

Το σπέρμα αποτελείται από δύο συστατικά που προέρχονται από τους όρχεις και από το σπερματικό υγρό που προέρχονται από τις σπερματικές κύστες και τον βολβό του ενδοφαλλού.

Το σπέρμα διακρίνεται από την κατάλευκη βλέννα, από το κιτρινωπό του χρώμα και τη δομή του (τα σπερματοζωάρια βρίσκονται κατά δέσμες). Όσο πιο πολλά σπερματοζωάρια έχει το σπέρμα τόσο πιο σκούρο χρώμα έχει. Το σπέρμα των κηφήνων έχει pH= 6,8 -7,0 και εύκολα αναμειγνύεται με οποιοδήποτε υδαρές μέσο. Η αναλογία υγρού προς σπερματοζωάρια κατά την εκσπερμάτωση ποικίλει ανάλογα την εποχή του έτους (Κωσταρέλου, 1988).

Τα σπερματοζωάρια κινούνται με ελικοειδής κίνηση προς τα εμπρός. Η κίνηση αυτή είναι ένδειξη της γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων. Η κίνησή

τους συνεχίζει για 15 min και μετά γίνεται σπασμωδική μέχρι το θάνατό τους (Κωσταρέλου, 1988).

Σύμφωνα με τους Mackensen, Tryasko και Woyke, 1μl (mm³) σπέρματος περιέχει 7,5-9,4 εκατομμύρια σπερματοζωάρια. Ο όγκος του σπέρματος από ένα κηφήνα κατά μέσο όρο είναι 1,7μl, αλλά συνήθως μέσα στην σύριγγα μπορούμε να πάρουμε 1-1,5μl από κάθε κηφήνα.

1.2. Διατήρηση του σπέρματος

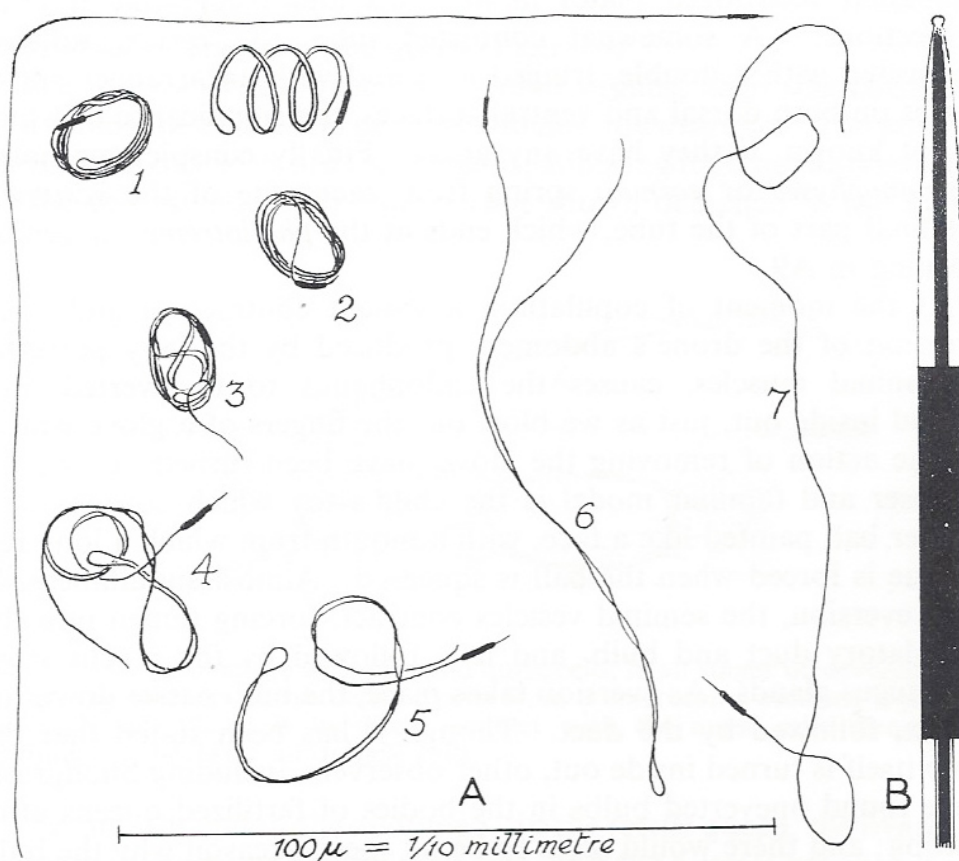
Η διάρκεια ζωής των σπερματοζωαρίων μέσα στη σπερματοθήκη της βασίλισσας είναι μεγάλη καθώς βασίλισσες ζουν και εναποθέτουν γονιμοποιημένα αυγά για περίπου 2 ή ακόμη και 4 χρόνια. Για τη διατήρηση του σπέρματος των κηφήνων και τη χρήση τους για ερευνητικούς σκοπούς χρησιμοποιήθηκαν διάφορα αραιωτικά μέσα. Για να έχει αξία για την τεχνητή σπερματέγχυση ένα αραιωτικό πρέπει να μην είναι τοξικό για μια περίοδο 6 ωρών. Μετά από αυτό το διάστημα τα σπερματοζωάρια που εισάγονται στο αναπαραγωγικό σύστημα της βασίλισσας έχουν μεταναστεύσει στη σπερματοθήκη, έχουν απορροφηθεί ή έχουν αποβληθεί. Το αραιωτικό για μεταφορά σπέρματος σε μακρινές αποστάσεις θα πρέπει να μην είναι τοξικό για μεγαλύτερο διάστημα από δύο εβδομάδες. Τα αραιωτικά σύμφωνα με τον Woyke (1983) έχουν βρεθεί ότι αυξάνουν τον όγκο του σπέρματος και ότι επηρεάζουν θετικά την τεχνητή σπερματέγχυση. Υπάρχουν πολλά αραιωτικά που χρησιμοποιούνται αλλά το καλύτερο θεωρείται το διάλυμα “Kiev” σύμφωνα με τον Ruttner (1976). Με την προσθήκη καταλάσης, παρατηρήθηκε ευνοϊκή επίδραση στην κινητικότητα του σπέρματος και στον αριθμό των σπερματοζωαρίων που φτάνουν στη σπερματοθήκη (Ruttner, 1976).

Παράγοντες που επιδρούν στην ποιότητα και στην ποσότητα του σπέρματος.

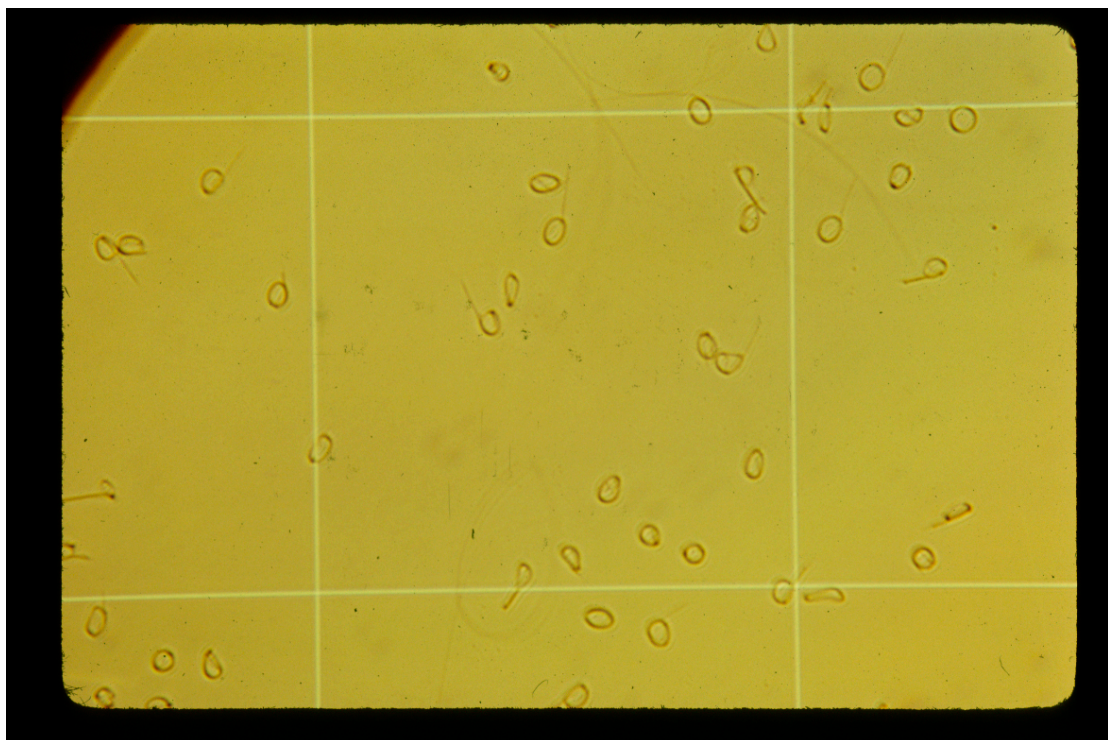
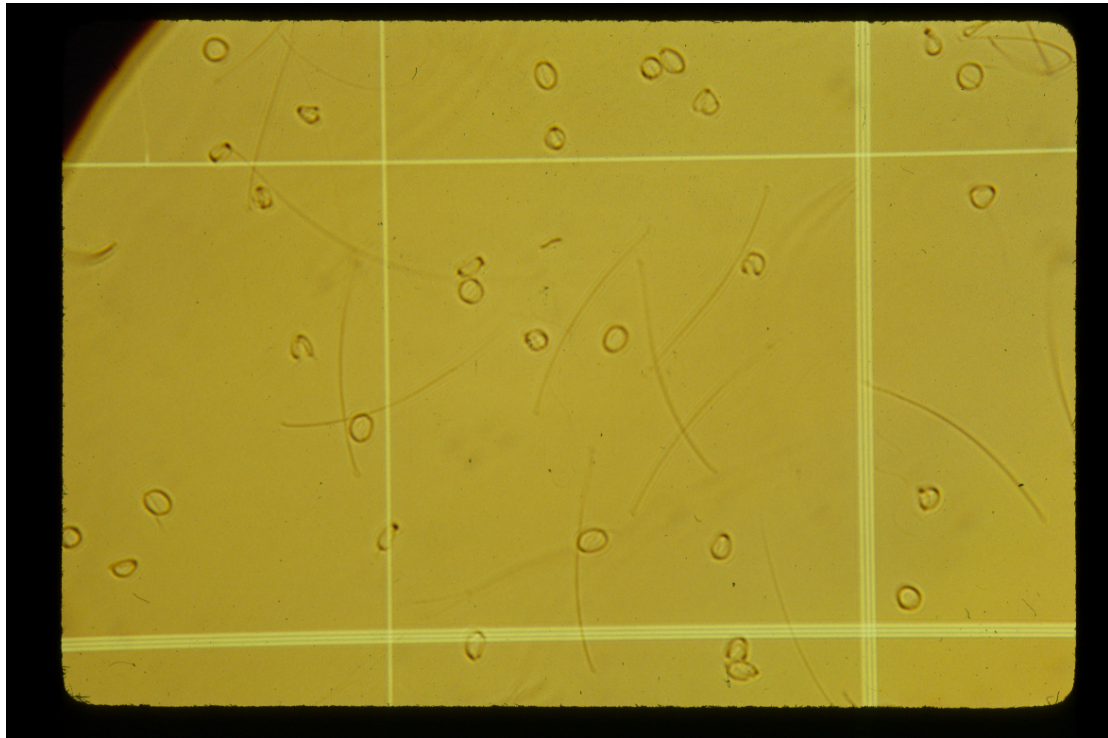
Η ηλικία των κηφήνων παίζει σημαντικό ρόλο στην ποσότητα του σπέρματος στους κηφήνες. Οι κηφήνες εκτελούν την πρώτη τους πτήση σε ηλικία 8 με 10 ημερών από την έξοδο του από το κελλί, όμως αυτός δεν είναι δείκτης αναπαραγωγικής ωριμότητας (Υφαντίδης, 2005). Σύμφωνα με τον Moritz (1989) βρέθηκε ότι κηφήνες 12 ημερών είναι ώριμοι και είναι οι καταλληλότεροι για την χρησιμοποίηση των σπερματοζωαρίων στην τεχνητή σπερματέγχυση. Ο χρόνος όμως που χρειάζεται ο κάθε κηφήνας για να ωριμάσει οφείλεται και σε γενετικούς παράγοντες -

χαρακτηριστικό της κάθε φυλής (Rhodes et al., 2010). Ο Rhodes (2002) υποστηρίζει ότι οι κηφήνες είναι αναπαραγωγικά ώριμοι σε ηλικία 16 ημερών και η ποιότητα και ποσότητα φθίνει σε ηλικία μεγαλύτερη των 28 ημερών.

Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει τη ζωή και την αναπαραγωγικότητα των κηφήνων, είναι η εποχή του έτους καθώς πολλές φορές συγχέεται και με την αφθονία ή την έλλειψη της τροφής που υπάρχει στο μελίσσι και μπορεί να παρέχεται στους κηφήνες. Η θερμοκρασία άλλος ένας παράγοντας που συσχετίζεται με την εποχή επηρεάζει την ζωή των κηφήνων. Σύμφωνα με τους Sturup et al. (2013) έκθεση κηφήνων σε θερμοκρασία πάνω από 40°C προκαλεί θνησιμότητα σε ποσοστό 77%.



Εικόνα 1.2.1. Α. Σπέρματοζώαρια όπως απεικονίζονται με τη χρήση χρωστικής. 1,2, κουλουριασμένα σπέρματοζώαρια 3 έως 7 στάδια κουλουριάσματος. Το συνολικό μήκος των σπέρματοζωαρίων είναι περίπου 1mm, το μήκος του κεφαλιού 10μ, διαμέτρου 0,5μ Β. Υποδομή του κεφαλιού και μέρος της ουράς (Dade, 1994).



Εικόνες 1.2.2. & 1.2.3. Σπέρματοζώαρια όπως απεικονίζονται με τη χρήση χρωστικής στο μικροσκόπιο σε αιματοκυττόμετρο.

2. Πειραματικό μέρος

2.1. Υλικά και μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της εργασίας τρία μελίτσια δέκα πλαισίων από το Εργαστήριο της Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, τα δύο μελίτσια είχαν βασίλισσα και ενώ το ένα ήταν ορφανο με εργάτριες ωοτόκες (αρρενοτόκο μελίτσι).

Σε κάθε μελίτσι τοποθετήθηκαν πλαισιοθήκες με κηφηνόγνο σφραγισμένο. Πραγματοποιήθηκε μαρκάρισμα των κηφών σε κάθε μελίτσι χρονολογικά και παίρνονται μετρήσεις από κηφίνες 8 έως 10 ημερών, 11 έως 13, 14 έως 16, 17 έως 19, 20 έως 22 και 23 έως 25 ημερών.

Στις 12-07-2015 τοποθετήθηκαν τροφοδότες και σιρόπι (1:1) στα μελίτσια και υποκατάστατο γύρης έτσι ώστε να έχουν τροφή για να δυναμώσουν. Σε κάθε μελίτσι επιλέχθηκε μια κηρήθρα με κηφηνόγνο και λίγο μέλι και τοποθετήθηκε σε πλαισιοθήκη. Την επόμενη μέρα και κάθε τρεις μέρες ξεκίνησε η διαδικασία του μαρκαρίσματος με την έξοδο από το κελλί των πρώτων κηφών. Με αυτόν τον τρόπο οι εργάτριες μπορούν να ταΐζουν ελεύθερα τους κηφίνες και οι κηφίνες να παραμένουν εγκλωβισμένοι. Ένα μήνα αργότερα έγινε η μέτρηση των σπερματοζωαρίων με αιματοκυττόμετρο στο μικροσκόπιο.

Πριν την αναστροφή των γεννητικών οργάνων τοποθετήθηκαν οι κηφίνες σε κλωβό ώστε να πετάνε. Μετά ακολούθησε η αναισθητοποίηση τους με χρήση CO₂ η μέτρηση του κάθε κηφήνα σε ζυγαριά ακριβείας, του μεγέθους της κοιλίας τους και ολόκληρου του σώματός τους.

Μετά την αναστροφή των γεννητικών οργάνων του κηφήνα έγινε απόπλυση με 0,5μl διάλυμα Kiev (Kaftanoglu and Peng, 1984), τοποθετήθηκε μια σταγόνα στο αιματοκυττόμετρο και μετρήθηκε ο αριθμός των σπερματοζωαρίων στο μικροσκόπιο.

Πρωτεϊνούχος διατροφή μελισσιών

Χρησιμοποιήθηκαν υποκατάστατα και αντικατάστατα γύρης με συγκεκριμένη σύνθεση όπως αναφέρεται στον πίνακα 2.1.1.

Πίνακας 2.1.1. Υποκατάστατα και αντικατάστατα γύρης που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή του πειραματος.

ΥΛΙΚΑ	ΥΠΟΚΑΤΑΣΤΑΤΟ ΓΥΡΗΣ %	ΑΝΤΙΚΑΤΑΣΤΑΤΟ ΓΥΡΗΣ %
Άχνη ζάχαρη	40	40
Σογιάλευρο	20	20
Μαγιά αρτοποιίας	5	15
Γύρη	10	0
Μέλι	10	10
Απιονισμένο νερό	15	15
Σύνολο	100	100
Πρωτεΐνες	13	13.5
Σάκχαρα	53	52

Το σογιάλευρο πρέπει να είναι πολύ καλά αλεσμένο όπως το αλεύρι σιταριού και να περιέχει λιπαρές ουσίες σε ποσοστό μικρότερο από 7%. Η μαγιά αρτοποιίας να είναι κατά προτίμηση φρέσκη και όχι αποξηραμένη, γιατί έχει πίο πολλά θρεπτικά συστατικά και είναι φθηνότερη. Η γύρη να είναι φρέσκη και διατηρημένη στην κατάψυξη. Να αποφεύγουμε την αποξηραμένη και άγνωστης προέλευσης γύρη. Ο ασφαλέστερος τρόπος είναι να τη συλλέγουμε από δικά μας υγιή μελίσσια. Επίσης το μέλι να προέρχεται από δικά μας υγιή μελίσσια.

Αντιδραστήρια και διαλύματα

Για την απόπλυση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Κίεν που περιείχε 3,6g Sodium citrate, 0,32g NaHCO₃, 0,06g KCL, 0,5g γλυκόζης και 100 mL απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό (Kaftanoglu and Peng, 1984).

Για τη χρώση των νεκρών και ζωντανών σπερματοζωαρίων χρησιμοποιήθηκαν, η χρωστική εωσίνη Y (Peng et al., 1990), 0,5% εωσίνη Y (eosin yellow) σε διάλυμα Κίεν. Κατά τη διαδικασία, ίσου όγκου διαλύματος με τη χρώση και σπέρματος κηφήνα ανακατεύεται για ένα λεπτό και μια σταγόνα του διαλύματος τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο για παρατήρηση σε μικροσκόπιο φάσης. Τα ζωντανά κύτταρα χρωματίζονται μωβ ενώ τα νεκρά κίτρινα έως πρασινοκίτρινα (Peng et al., 1990). Στην

εργασία χρησιμοποιήθηκε διάλυμα από σπέρμα πέντε κηφώνων και ίση ποσότητα εωσίνης Υ.



Εικόνα 2.1.1. Διάλυμα Κιεν και χρώση εωσίνη Υ σε διάλυμα Κιεν.

Υλικά και συσκευές

Οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (Kern, 510)
- Πιπέτες 20-200μL, 1000-5000μL
- Αιματοκυττόμετρο
- Ογκομετρικές φιάλες 25mL, 100mL, 250mL, 1000mL
- Αποστακτήρας νερού
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 50mL και 100mL
- Αντικειμενοφόρες πλάκες και καλυπτρίδες



Εικόνα 2.1.2. Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας.



Εικόνα 2.1.3. Πιπέτες

2.1.1. Αιματοκυττόμετρο

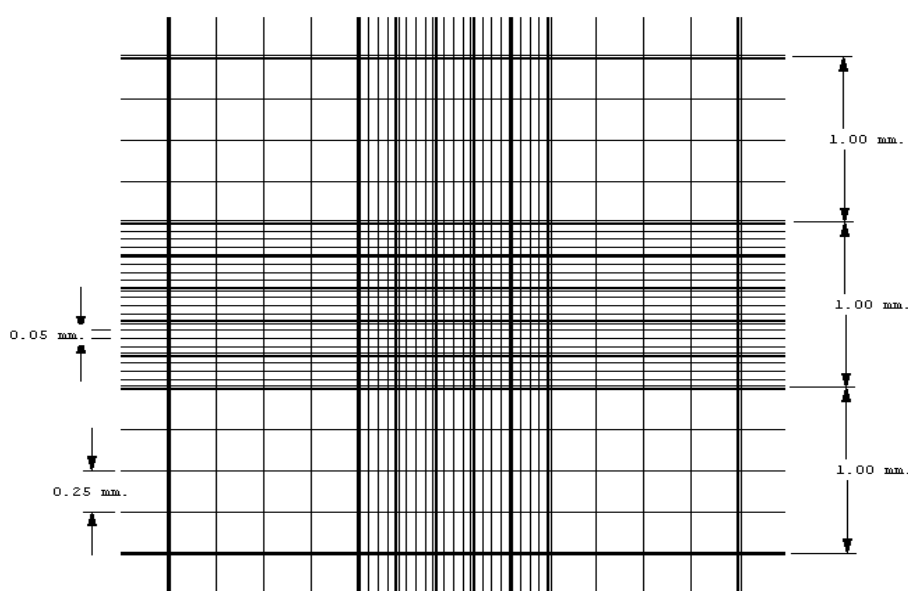
Το αιμοκυττόμετρο, είναι μια ειδικά κατασκευασμένη αντικειμενοφόρος με τη δική της καλυπτρίδα που έχει κατασκευαστεί για την καταμέτρηση των στερεών συστατικών του αίματος (ερυθρά αιμοσφαίρια, λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια) σε ορισμένο όγκο αίματος. Το όργανο όμως αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την καταμέτρηση άλλων μικροσκοπικών δομών ή κυττάρων που βρίσκονται σε εναιώρημα, όπως για παράδειγμα τα κύτταρα μιας κυτταροκαλλιέργειας ή οι γυρεόκοκκοι στο μέλι και τέλος σε αυτήν την εργασία για τη μέτρηση των σπερματοζωαρίων. Η πρώτη χρήση του αιματοκυττόμετρου για τη μέτρηση σπερματοζωαρίων της μέλισσας (*Apis Mellifera*) έγινε από τους Mackensen και Roberts το 1948.

Ο Jaycox (1961) χρησιμοποίησε διάλυμα αμύλου, για να διασκορπίσει τα συσσωματώματα των σπερματοζωαρίων και να τα κουλουριάσει φορμαλδεύδη για τη στερέωση τους πριν από τη μέτρηση, ενώ ο Kerr (1974) χρησιμοποίησε διάλυμα 0,005% Bardahl^R το οποίο είναι λιπαντικό του συστήματος ψύξης των αυτοκινήτων. Ο Harbo (1975) υπολόγισε τον αριθμό των σπερματοζωαρίων στη μέλισσα φασματοφωτομετρικώς (Χαριζάνης, 1991).

Το αιματοκυττόμετρο έχει σχεδιαστεί από τον Louis – Charles Malassez και αποτελείται από μια τροποποιημένη χοντρή αντικειμενοφόρο πλάκα που φέρει δύο ορθογώνια κοιλώματα που αποτελούν τους θαλάμους μέτρησης. Ο κάθε θάλαμος είναι

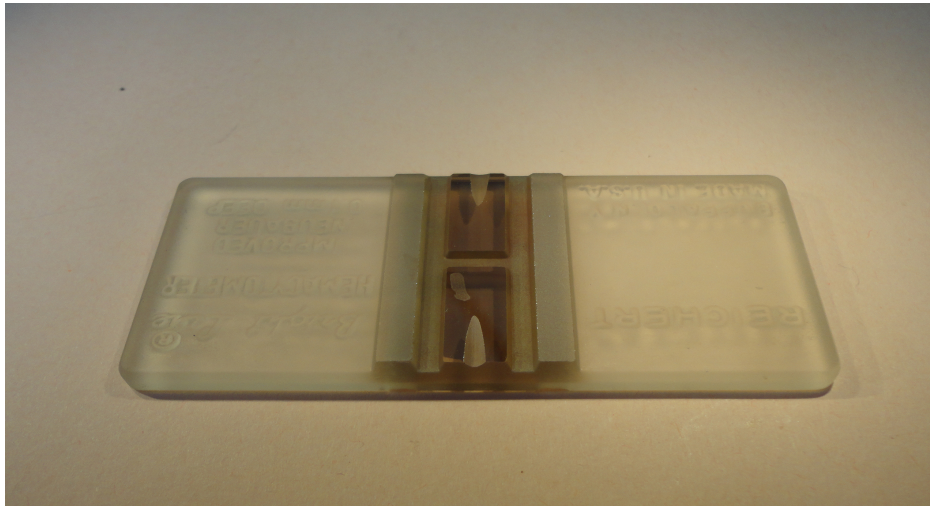
χαραγμένος με λέιζερ και σχηματίζεται σε αυτόν ένα πλέγμα κάθετων γραμμών (εικόνα 4.1.1.). Κάθε θάλαμος όπως αναφέρθηκε έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από 9 κύρια τετράγωνα με μήκος πλευράς 1mm. Το κάθε ένα από τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5 μm, που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του εάν τα κύτταρα θα θεωρηθούν ότι βρίσκονται μέσα ή έξω από πλέγμα. Επίσης κάθε ένα από τα κύρια τετράγωνα έχει επιπλέον διαβαθμίσεις για να διευκολύνεται η μέτρηση των κυττάρων.

Το επίπεδο του πλέγματος βρίσκεται 0.1 mm χαμηλότερα από δύο «ράχες» στις οποίες στηρίζεται η καλυπτρίδα. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο μέσω του τριχοειδούς φαινομένου απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια.



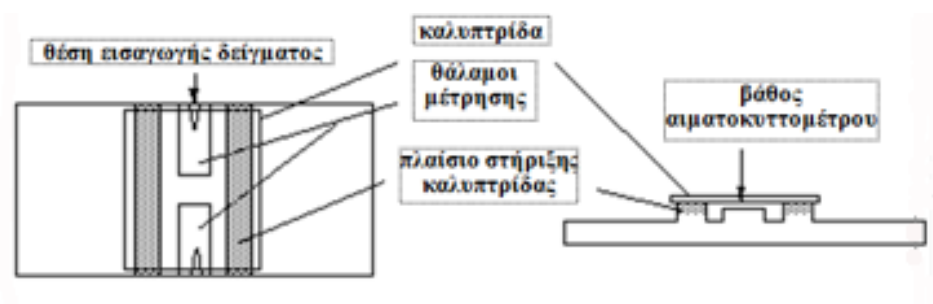
Εικόνα 2.1.4. Πλέγμα κάθετων γραμμών αιμακυττομέτρου (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το αιματοκυττόμετρο της American Optical Bright – Line^R για τη μέτρηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων των κηφίγων που έχουν προέλθει από βασίλισσες και από εργάτριες και την μεταξύ τους σύγκριση.



Εικόνα 2.1.5. Το αιματοκυττόμετρο της American Optical Bright – Line^R.

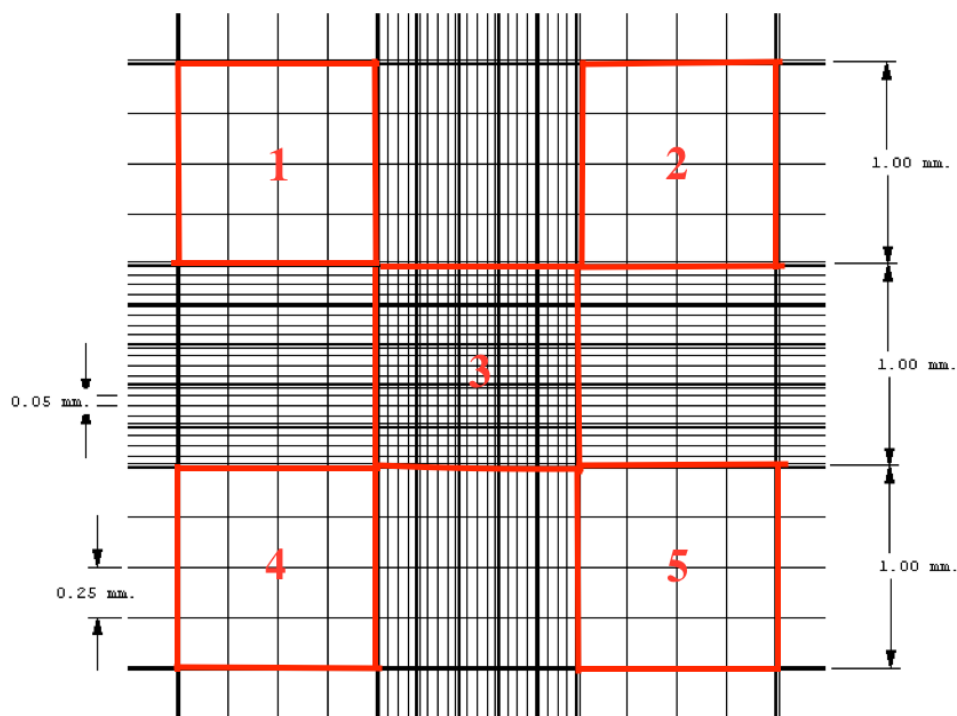
Τοποθετείται η καλυπτρίδα στο αιματοκυττόμετρο και με τη βοήθεια της πιπέτας Pasteur τοποθετείται στο χείλος της, μια σταγόνα από το αιώρημα των σπερματοζωαρίων αφού έχει προηγηθεί ανακίνηση. Το διάλυμα μόλις ακουμπήσει το αιματοκυττόμετρο καταλαμβάνει αμέσως όλο το χώρο, καλύπτοντας τα δύο πλέγματά του. Η ποσότητα του υγρού πρέπει να είναι αρκετή προκειμένου να κορεστεί ο χώρος κάτω από την καλυπτρίδα ενώ απαιτείται προσοχή προκειμένου να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες που θα αποτελέσουν εμπόδιο κατά την καταμέτρηση. Με τη βοήθεια του μικροσκοπίου (400 μεγέθυνση) μετρούμε τα πέντε (τέσσερα γωνιακά και το κεντρικό) από τα εννέα τετράγωνα, που έχουν πλευρά 1mm και των δύο πλευρών του αιματοκυττομέτρου.



Εικόνα 2.1.6. Σχηματική απεικόνιση του αιματοκυττόμετρου (Τσίπη, 2012).

Για την αποφυγή μέτρησης μερικών σπερματοζωαρίων δύο φορές, σε κάθε τετράγωνο μετράμε εκείνα που επικάθονται στην κάτω αριστερά πλευρά. Το λεπτό στρώμα υγρού κάτω από την καλυπτρίδα έχει πάχος 0,1mm και έτσι ο όγκος του αιωρήματος των σπερματοζωαρίων σε επιφάνεια ενός mm^2 είναι $0,1\text{mm}^3$.

Η μέτρηση των σπορίων γίνεται στα τετράγωνα 1, 2, 3, 4 και 5 (εικόνα 4.2.3) και στα δύο πλέγματα (Pawsey, 1974).



Εικόνα 2.1.7. Πλέγμα κάθετων γραμμών αιματοκυττώμετρου (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων (N) που περιέχονται σε ένα δείγμα μπορεί να υπολογισθεί με τον παρακάτω τύπο:

$$N = \frac{\text{αριθμός σπερματοζωαρίων που μετρήθηκαν} \times \text{αραίωση} \times 10}{\text{αριθμός μετρηθέντων τετραγώνων πλευράς 1mm}}$$

Το σπέρμα, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, συλλέχτηκε από αναπαραγωγικά ώριμους κηφίνες οι οποίοι ήταν μαρκαρισμένοι χρωματικά ώστε να είναι γνωστή η ηλικία τους. Τοποθετήθηκαν 10 ml απεσταγμένου νερού σε κάθε κηφήνα με την τεχνική της απόπλυσης (Kaftanoglu et al., 1993) και μετά από ανακίνηση τοποθετήθηκε δείγμα με τη χρήση πιπέτας στο αιματοκυττώμετρο. Ακολούθησε η μέτρηση των σπερματοζωαρίων (πιο εύκολη μέτρηση καθώς με χρήση απεσταγμένου νερού κουλουριάζονται) και στις δύο πλευρές (συνολικά 10 τετράγωνα του 1 mm) στο μικροσκόπιο του εργαστηρίου σε μεγέθυνση 400X.

2.2. Στατιστική ανάλυση

Ακολούθησε η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων με χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) του σωματικού βάρους, του μήκους ολόκληρου του σώματος, του μήκους της κοιλίας και του αριθμού των σπερματοζωαρίων των κηφίνων που προέρχονται από βασίλισσα (Q) ή από ωοτόκες εργάτριες (W), έξι διαφορετικών ηλικιακών ομάδων (Age Group). Σύμφωνα με την ανάλυση διασποράς, τιμές p μικρότερες του 0,05 δείχνουν στατιστικά σημαντική επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα ή της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων.

3. Αποτελέσματα

Βάρος κηφίνων, μήκος σώματος, μήκος κοιλίας και αριθμός σπερματοζωαρίων.

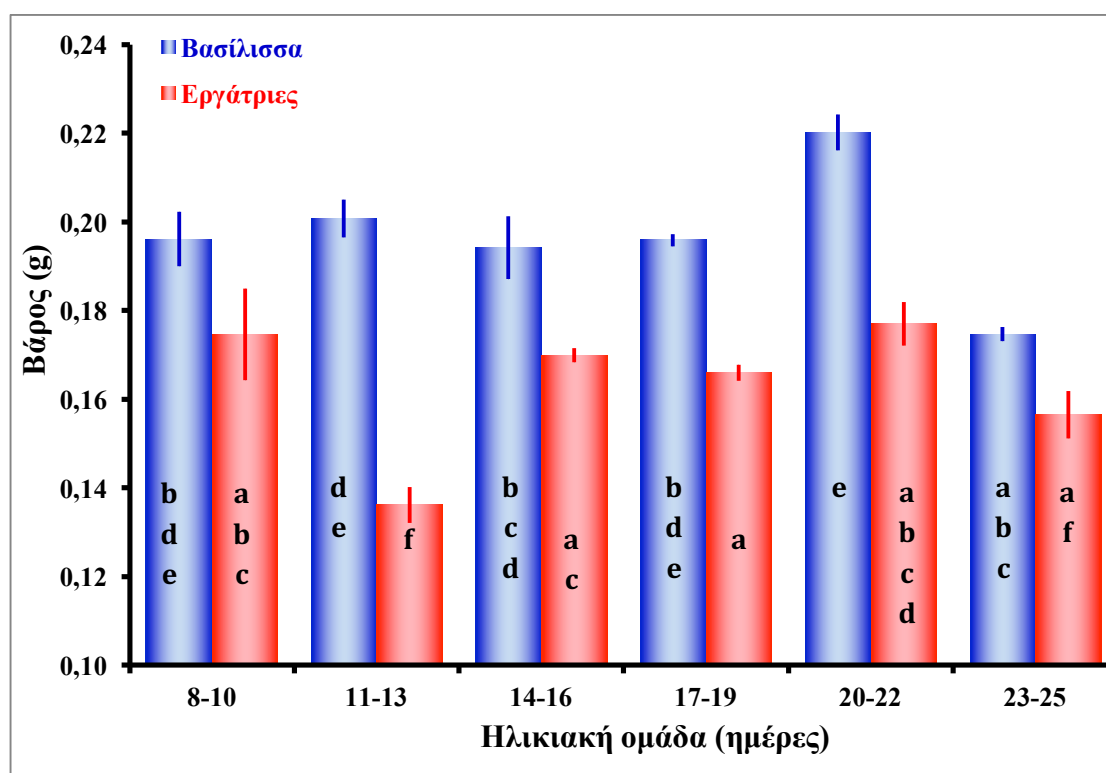
Στα διαγράμματα εμφανίζονται οι απεικονίσεις των μετρήσεων των κηφίνων. Οι γραμμές σφαλμάτων απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα (s.e.). Ηλικιακές ομάδες οι οποίες επισημαίνονται με το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς το σωματικό βάρος, το μήκος ολόκληρου του σώματος, το μήκος της κοιλίας και τον αριθμό των σπερματοζωαρίων του κηφήνα σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$, σύμφωνα με τη δοκιμασία Bonferroni.

Πίνακας 3.1.1. Ανάλυση διασποράς (ANOVA) του σωματικού βάρους των κηφίνων προερχόμενων από Βασίλισσες (Q) και από Εργάτριες (W), έξι διαφορετικών ηλικιακών ομάδων (Age Group). Τιμές p μικρότερες του 0,05 δείχνουν στατιστικά σημαντική επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα ή της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων.

	SS	Degr. of	MS	F	p
Ηλικιακή Ομάδα	0,011544	5	0,002309	11,04	0,000000
Κηφήνες από Q-W	0,027640	1	0,027640	132,14	0,000000
Ηλικιακή Ομάδα X Κηφήνες από Q-W	0,006182	5	0,001236	5,91	0,000096
Σφάλμα	0,017989	86	0,000209		

Στον πίνακα 3.1.1. φαίνεται ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικιακή ομάδα των κηφίνων σε σύγκριση με το βάρος τους, σε κηφήνες που έχουν

προέλθει από βασίλισσα και από ωοτόκες εργάτριες και ως προς τις μεταξύ τους διαφορές καθώς εμφανίζουν επίδραση στις τιμές μεταξύ αυτών των παραγόντων επειδή οι τιμές του p είναι μικρότερες από 0,05. Γενικά στον πίνακα 3.1.1. εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικιακή ομάδα μεταξύ των κηφήνων που έχουν προέλθει από ωοτόκες εργάτριες και των κηφήνων από βασίλισσες ως προς τον παράγοντα σωματικό βάρος αλλά και στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το βάρος της ηλικιακής ομάδας των κηφήνων της κάθε κατηγορίας μεμονωμένα πχ κηφήνες από ωοτόκες εργάτριες ή κηφήνες από βασίλισσα.



Εικόνα 3.1.1. Μέσο σωματικό βάρος των κηφήνων που προέρχονται από βασίλισσες και από εργάτριες διαφορετικών ηλικιακών ομάδων. Οι γραμμές σφαλμάτων απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα (s.e.). Ηλικιακές ομάδες οι οποίες επισημαίνονται με ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς το σωματικό βάρος σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$, σύμφωνα με τη δοκιμασία Bonferroni.

Στην εικόνα 3.1.1. απεικονίζεται το μέσο σωματικό βάρος των κηφήνων που έχουν προέλθει από βασίλισσες και από ωοτόκες εργάτριες για τις διάφορες ηλικιακές ομάδες. Στις ηλικίες 8-10, 14-16 και 23-25 ημερών δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στην ηλικία των 11-13, 17-19 και 20-22 ημερών υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές, καθώς οι κηφήνες που έχουν προέλθει από βασίλισσα έχουν μεγαλύτερο βάρος από τους κηφήνες που προήλθαν από ωοτόκες εργάτριες. Την μεγαλύτερη τιμή στο βάρος την έχουν οι κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα.

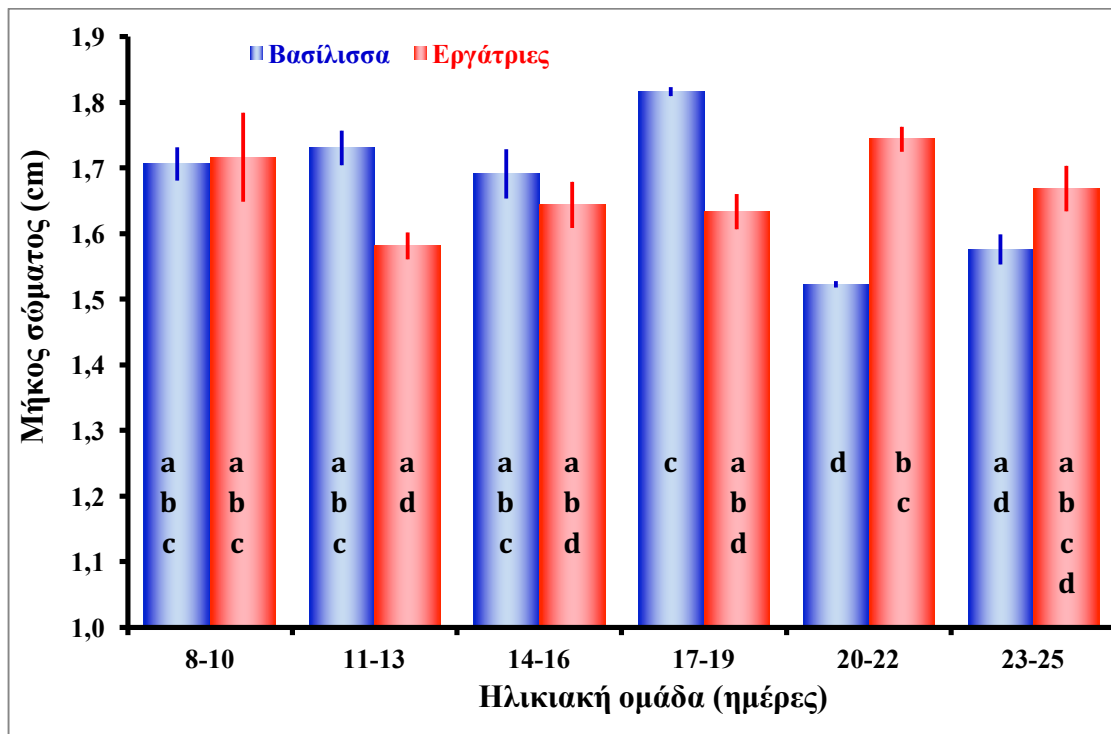
ηλικίας 20-22 ημερών και την μικρότερη οι κηφήνες από ωοτόκες ηλικίας 11-13. Οι τιμές στους κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα κυμαίνονται από 0,175g έως 0,201g ενώ στους κηφήνες από εργάτριες το βάρος είναι μικρότερο και κυμαίνεται από 0,136g έως 0,175g. Σε όλες τις μετρήσεις οι κηφήνες από βασίλισσα εμφανίζουν μεγαλύτερο σωματικό βάρος από τους κηφήνες από ωοτόκες εργάτριες.

Πίνακας 3.1.2. Ανάλυση διασποράς (ANOVA) του μήκους του σώματος των κηφήνων προερχόμενων από Βασίλισσες (Q) και από Εργάτριες (W), έξι διαφορετικών ηλικιακών ομάδων (Age Group). Τιμές p μικρότερες του 0,05 δείχνουν στατιστικά σημαντική επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα ή της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων.

	SS	Degr. of	MS	F	p
Ηλικιακή Ομάδα	0,1390	5	0,0278	3,42	0,007240
Κηφήνες από Q-W	0,0021	1	0,0021	0,26	0,612216
Ηλικιακή Ομάδα Χ Κηφήνες από Q-W	0,4674	5	0,0935	11,50	0,000000
Σφάλμα	0,6990	86	0,0081		

Στον πίνακα 3.1.2. φαίνεται ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικιακή ομάδα των κηφήνων σε σύγκριση με το μήκος του σώματος των κηφήνων που έχουν προέλθει από βασίλισσα και από ωοτόκες εργάτριες και ως προς τις μεταξύ τους διαφορές καθώς εμφανίζουν επίδραση στις τιμές μεταξύ αυτών των παραγόντων επειδή οι τιμές του p είναι μικρότερες από 0,05.

Γενικά στον πίνακα 3.1.2. εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικιακή ομάδα μεταξύ των κηφήνων που έχουν προέλθει από ωοτόκες εργάτριες και των κηφήνων από βασίλισσες ως προς τον παράγοντα σωματικό μήκος αλλά και στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το βάρος της ηλικιακής ομάδας των κηφήνων της κάθε κατηγορίας μεμονωμένα πχ. κηφήνες από ωοτόκες εργάτριες ή κηφήνες από βασίλισσα.



Εικόνα 3.1.2. Μέσο μήκος του σώματος των κηφήνων που προέρχονται από βασίλισσες και από ωοτόκες εργάτριες διαφορετικών ηλικιακών ομάδων. Οι γραμμές σφαλμάτων απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα (s.e.). Ηλικιακές ομάδες οι οποίες επισημαίνονται με ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς το μήκος του σώματος σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$, σύμφωνα με τη δοκιμασία Bonferroni.

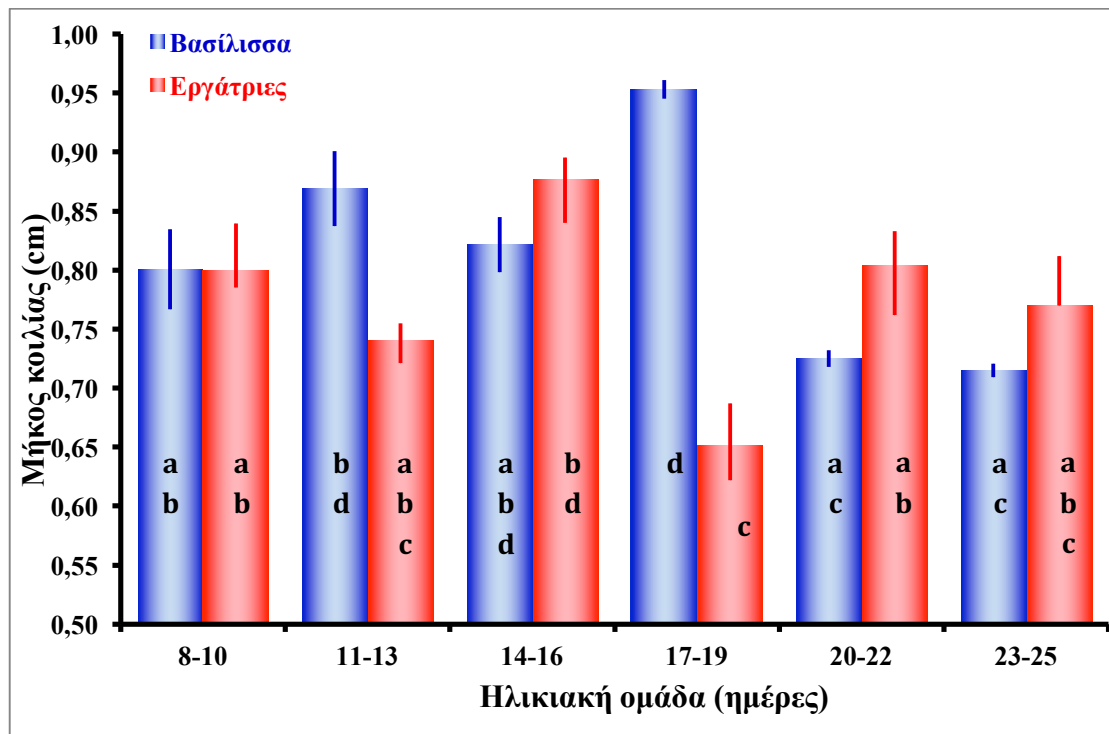
Στην εικόνα 3.1.2. απεικονίζεται το μέσο μήκος σώματος των κηφήνων που έχουν προέλθει από βασίλισσες και από ωοτόκες εργάτριες για τις διάφορες ηλικιακές ομάδες. Στις ηλικίες 8-10, 11-13, 14-16 και 23-25 ημερών δεν έχουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στην ηλικία των 17-19 και 20-22 ημερών έχουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές, καθώς οι κηφήνες που έχουν προέλθει από βασίλισσα έχουν μεγαλύτερο μήκος σώματος από τους κηφήνες που προήλθαν από ωοτόκες εργάτριες. Την μεγαλύτερη τιμή στο μήκος σώματος, την έχουν οι κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα ηλικίας 17-19 (1,82cm) ημερών και την μικρότερη οι κηφήνες από ωοτόκες ηλικίας 11-13 (1,58cm). Οι τιμές στους κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα κυμαίνονται από 1,53cm έως 1,82cm ενώ στους κηφήνες από εργάτριες το μήκος είναι μικρότερο και κυμαίνεται από 1,64cm έως 1,74 cm. Οι τιμές του μήκους του σώματος των κηφήνων που έχουν προέλθει από ωοτόκες εργάτριες έχουν πιο μικρό εύρος σε σχέση με τους κηφήνες από βασίλισσα αλλά εμφανίζουν στις περισσότερες ηλικίες μικρή διαφορά στις τιμές.

Πίνακας 3.1.3. Ανάλυση διασποράς (ANOVA) του μήκους της κοιλίας των κηφήνων προερχόμενων από Βασίλισσες (Q) και από ωοτόκες εργάτριες (W), έξι διαφορετικών ηλικιακών ομάδων (Age Group). Τιμές p μικρότερες του 0,05 δείχνουν στατιστικά σημαντική επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα ή της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων.

	SS	Degr. of	MS	F	p
Ηλικιακή Ομάδα(AgeGroup)	0,11082	5	0,02216	3,61	0,005168
Κηφήνες από Q-W	0,04006	1	0,04006	6,53	0,012383
Ηλικιακή Ομάδα X Κηφήνες από Q-W	0,45911	5	0,09182	14,96	0,000000
Σφάλμα	0,52779	86	0,00614		

Στον πίνακα 3.1.3. φαίνεται ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικιακή ομάδα των κηφήνων σε σύγκριση με το μήκος της κοιλίας των κηφήνων που έχουν προέλθει από βασίλισσα και από ωοτόκες εργάτριες και ως προς τις μεταξύ τους διαφορές καθώς εμφανίζουν επίδραση στις τιμές μεταξύ αυτών των παραγόντων επειδή οι τιμές του p είναι μικρότερες από 0,05.

Γενικά στον πίνακα εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικιακή ομάδα μεταξύ των κηφήνων που έχουν προέλθει από ωοτόκες εργάτριες και των κηφήνων από βασίλισσες ως προς τον παράγοντα σωματικό μήκος αλλά και στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το βάρος της ηλικιακής ομάδας των κηφήνων της κάθε κατηγορίας μεμονωμένα πχ κηφήνες από ωοτόκες εργάτριες ή κηφήνες από βασίλισσα.



Εικόνα 3.1.3. Μέσο μήκος κοιλίας των κηφήνων που προέρχονται από βασίλισσες και των κηφήνων που προέρχονται από ωτόκες εργάτριες διαφορετικών ηλικιακών ομάδων. Οι γραμμές σφαλμάτων απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα (s.e.). Ηλικιακές ομάδες οι οποίες επισημαίνονται με ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς το μήκος κοιλίας σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$, σύμφωνα με τη δοκιμασία Bonferroni.

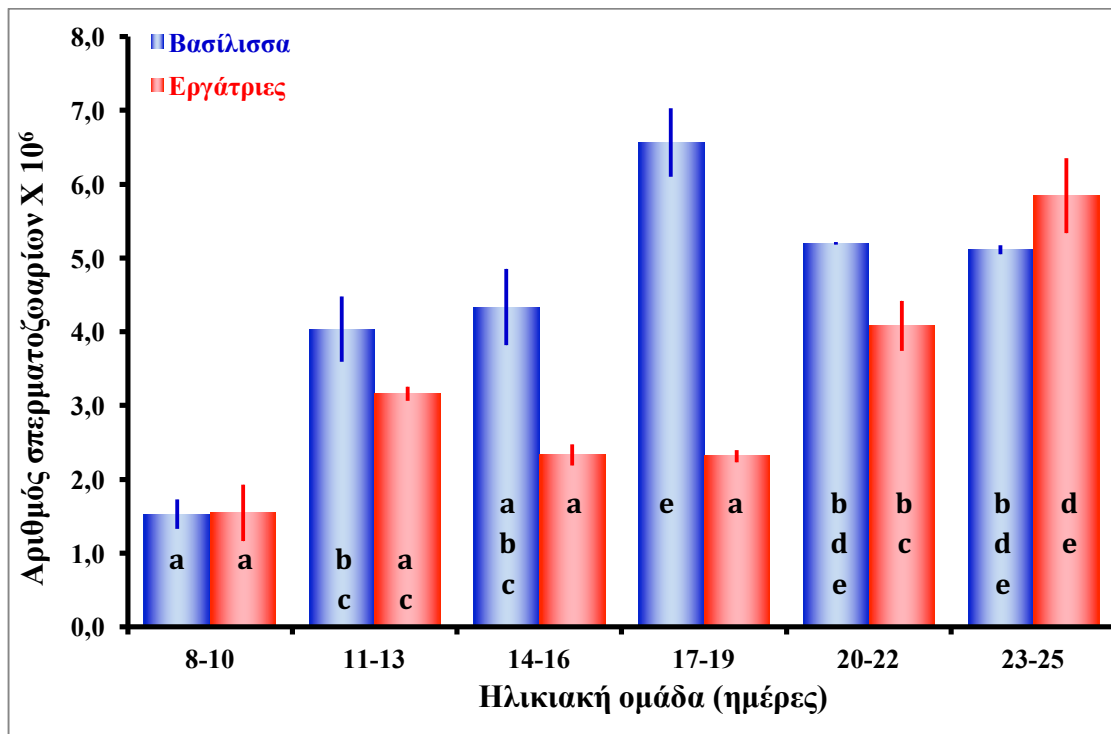
Στην εικόνα 3.1.3. απεικονίζεται το μέσο μήκος της κοιλίας των κηφήνων που έχουν προέλθει από βασίλισσες και από ωτόκες εργάτριες για τις διάφορες ηλικιακές ομάδες. Στις ηλικίες 8-10, 11-13, 14-16, 20-22 και 23-25 ημερών δεν έχουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στην ηλικία των 17-19 ημερών έχουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές, καθώς οι κηφήνες που έχουν προέλθει από βασίλισσα έχουν μεγαλύτερο μήκος σώματος από τους κηφήνες που προήλθαν από ωτόκες εργάτριες. Την μεγαλύτερη τιμή στο μήκος σώματος, την έχουν οι κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα ηλικίας 17-19 ημερών (0,95cm) και την μικρότερη οι κηφήνες από ωτόκες ηλικίας 17-19 (0,65cm). Οι τιμές στους κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα κυμαίνονται από 0,72cm έως 0,95cm ενώ στους κηφήνες από εργάτριες το μήκος είναι μικρότερο και κυμαίνεται από 0,67cm έως 0,88cm.

Πίνακας 3.1.4. Ανάλυση διασποράς (ANOVA) του αριθμού των σπερματοζωαρίων κηφώνων προερχόμενων είτε από βασίλισσες (Q) ή από ωτόκες εργάτριες (W), έξι διαφορετικών ηλικιακών ομάδων (AgeGroup). Τιμές p μικρότερες του 0,05 δείχνουν στατιστικά σημαντική επίδραση του αντίστοιχου παράγοντα ή της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων.

	SS	Degr. of	MS	F	p
Ηλικιακή Ομάδα (AgeGroup)	149,573	5	29,915	33,833	0,000000
Κηφώνες από Q-W	38,171	1	38,171	43,171	0,000000
Ηλικιακή Ομάδα X Κηφώνες από Q-W	63,313	5	12,663	14,321	0,000000
Σφάλμα	76,040	86	0,884		

Στον πίνακα 3.1.4. φαίνεται ότι υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικιακή ομάδα των κηφώνων σε σύγκριση με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων των κηφώνων που έχουν προέλθει από βασίλισσα και από ωτόκες εργάτριες και ως προς τις μεταξύ τους διαφορές καθώς εμφανίζουν επίδραση στις τιμές μεταξύ αυτών των παραγόντων επειδή οι τιμές του p είναι μικρότερες από 0,05.

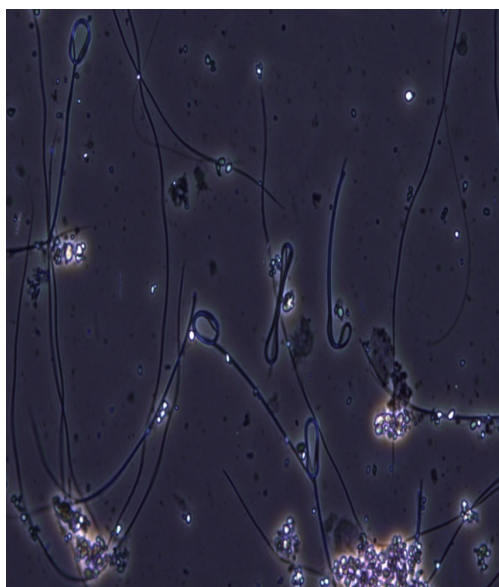
Γενικά στον πίνακα εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ηλικιακή ομάδα μεταξύ των κηφώνων που έχουν προέλθει από ωτόκες εργάτριες και των κηφώνων από βασίλισσες ως προς τον αριθμό των σπερματοζωαρίων αλλά και στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς το βάρος της ηλικιακής ομάδας των κηφώνων της κάθε κατηγορίας μεμονωμένα πχ κηφώνες από ωτόκες εργάτριες ή κηφώνες από βασίλισσα.



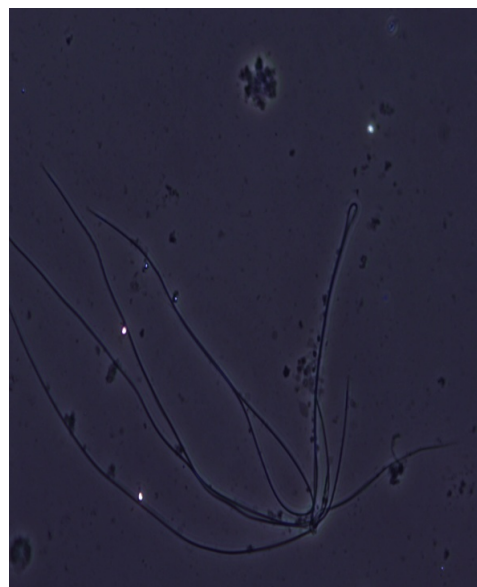
Εικόνα 3.1.4. Μέσος αριθμός σπερματοζωαρίων των κηφήνων που προέρχονται από βασίλισσες και από ωτόκες εργάτριες διαφορετικών ηλικιακών ομάδων. Οι γραμμές σφαλμάτων απεικονίζουν τα τυπικά σφάλματα (s.e.). Ηλικιακές ομάδες οι οποίες επισημαίνονται με ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά ως προς τον αριθμό σπερματοζωαρίων σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$, σύμφωνα με τη δοκιμασία Bonferroni.

Στην εικόνα 3.1.4. απεικονίζεται ο μέσος αριθμός σπερματοζωαρίων των κηφήνων που έχουν προέλθει από βασίλισσες και από ωτόκες εργάτριες για τις διάφορες ηλικιακές ομάδες. Στις ηλικίες 8-10, 11-13, 14-16, 20-22 και 23-25 ημερών δεν έχουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Στην ηλικία των 17-19 ημερών έχουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές, καθώς οι κηφήνες που έχουν προέλθει από βασίλισσα εμφανίζουν τον μεγαλύτερο μέσο αριθμό σπερματοζωαρίων από τους κηφήνες που προήλθαν από ωτόκες εργάτριες. Την μεγαλύτερη τιμή στον αριθμό των σπερματοζωαρίων την έχουν οι κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα ηλικίας 17-19 ημερών και την μικρότερη οι κηφήνες από βασίλισσα ηλικίας 8-10. Οι τιμές στους κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσα κυμαίνονται από $1,53 \times 10^6$ έως $6,6 \times 10^6$ ενώ στους κηφήνες από εργάτριες ο αριθμός σπερματοζωαρίων είναι μικρότερος και κυμαίνεται από $1,54 \times 10^6$ έως $5,85 \times 10^6$.

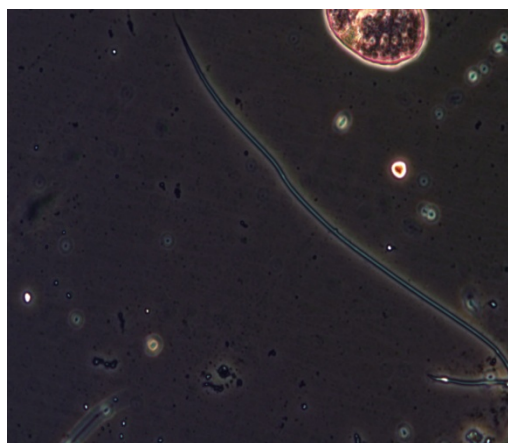
Για την χρώση των νεκρών και ζωντανών σπερμάτων χρησιμοποιήθηκαν, η χρωστική εωσίνη Y (Eliasson and Treichl, 1971; Modified by Dougherty et al., 1975), 0,5% εωσίνη Y (eosin yellow) σε διάλυμα Kiev. Τα ζωντανά κύτταρα χρωματίζονται μωβ ενώ τα νεκρά κίτρινα έως πρασινοκίτρινα (Peng et al., 1990). Κατά τη διαδικασία τα σπερματοζωάρια των κηφήνων από LQ και από LWB δεν εμφάνισαν διαφορές ως προς τη χρώση (Εικ. 6.2.1, Εικ. 6.2.2.).



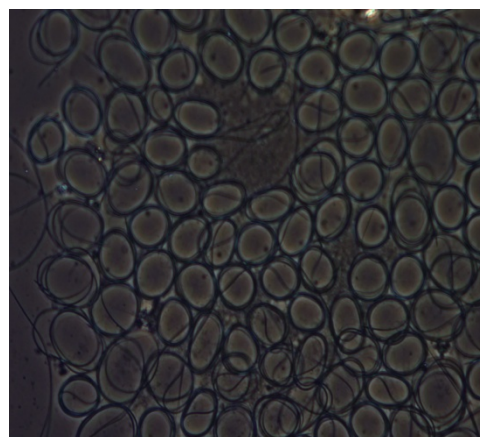
Εικόνα 3.1.5. Απεικόνιση από σπερματοζωάρια κηφήνων που έχουν προέλθει από βασίλισσα και έχουν χρωματιστεί με εωσίνη Y.



Εικόνα 3.1.6. Απεικόνιση από σπερματοζωάρια κηφήνων που έχουν προέλθει από ωστόσο εργάτριες και έχουν χρωματιστεί με εωσίνη Y.



Εικόνα 3.1.7. Απεικόνιση νεκρού σπερματοζωαρίου.



Εικόνα 3.1.8. Απεικόνιση κουλουριασμένων σπερματοζωαρίων.

4. Συζήτηση-Συμπεράσματα

Στο πείραμα καταγράφονται οι διαφορές των κηφήνων που προέρχονται από εργάτριες που υπό ειδικές συνθήκες ωτοκοούν και από βασίλισσες ως προς τα ποιοτικά (αριθμός σπερματοζωαρίων) και ποσοτικά χαρακτηριστικά τους (βάρος, μέγεθος κοιλίας, μέγεθος σώματος).

Συμφώνα με τους Woyke και Jasinski (1978) είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται κηφήνες ηλικίας 12 έως 14 ημερών. Στα αποτελέσματα για το βάρος και το μέγεθος που διεξήχθησαν από τις μετρήσεις στους κηφήνες που προήλθαν από ωτόκες εργάτριες (laying worker bees- LWB) και στους κηφήνες που προήλθαν από βασίλισσες (laying Queen- LQ) φαίνεται ότι οι κηφήνες LWB είναι μικρότεροι σε μήκος κοιλίας, σώματος και σε βάρος από τους κηφήνες LQ σχεδόν σε όλα τα στάδια της ηλικίας τους.

Οι Gençer και Kahya (2015) έδειξαν ότι οι κηφήνες που έχουν προέλθει από ωτόκες εργάτριες είναι μικρότεροι σε μέγεθος και βάρος από τους κηφήνες που έχουν προέλθει από βασίλισσες. Επίσης, βρέθηκε ότι και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων από κηφήνες LWB είναι μικρότερος σε όλες τις ηλικίες σε σχέση με τους κηφήνες LWB.

Σύμφωνα με την μελέτη των Schlüns et al. (2003), οι κηφήνες που έχουν μικρότερο βάρος και μήκος σώματος εμφάνιζαν και μεγαλύτερο αριθμό σπερματοζωαρίων. Όμως, οι Gençer και Kahya (2015) απέδειξαν ότι το βάρος και το μέγεθος των κηφήνων δεν συνδέεται με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων καθώς οι μεγαλύτεροι κηφήνες εμφάνιζαν μεγαλύτερο αριθμό σπερματοζωαρίων από αυτούς με μικρότερο μέγεθος. Το μικρότερο μέγεθος, μήκος σώματος και βάρος, των κηφήνων οφείλεται στην τοποθέτηση των αυγών από τις ωτόκες εργάτριες σε εργατικά κελλιά και όχι σε κηφηνοκελλιά (Gençer and Kahya, 2015). Σε ένα μελίτσι ορφανό οι εργάτριες δίνουν περισσότερη προσοχή στους κηφήνες από όταν έχουν βασίλισσα (Mazeed, 2011).

Η βασίλισσα πριν τοποθετήσει το αυγό της σε ένα κελλί, τοποθετεί τα μπροστινά της πόδια για να «αξιολογήσει» το μέγεθος και συνεπώς το είδος του κελλιού (Koeniger, 1970). Ανάλογα με το μέγεθος του κελλιού είτε αφήνει γονιμοποιημένα αυγά σε μικρά κελλιά (εργατικά κελλιά) είτε αγονιμοποίητα αυγά

(κηφήνα) σε μεγάλα κελλιά (κηφνοκελλιά). Κάποιες φορές, όταν η βασίλισσα δεν έχει σπερματοζώαρια στην σπερματοθήκη της τοποθετεί αγονιμοποίητα αυγά στα εργατικά κελλιά. Σε αυτά τα κελλιά οι προνύμφες των κηφήνων δεν μπορούν να αναπτυχθούν πλήρως σε μέγεθος όπως οι κανονικοί κηφήνες. Όπως αναφέρθηκε όμως οι μικροί κηφήνες μπορεί να είναι αποτέλεσμα εργατριών που ωοτοκούν και είναι μια ένδειξη ώστε να καταλάβουμε ότι το μελίτσι δεν έχει βασίλισσα και εάν δεν επέμβει ο ανθρώπινος παράγοντας το μελίτσι είναι καταδικασμένο (Page and Erickson, 1988).

Οι μικροί κηφήνες και από βασίλισσες και από ωοτόκες εργάτριες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τεχνητή σπερματέγχυση με καλά αποτελέσματα και διευκολύνουν σε εποχές που δεν έχουμε πολλούς κηφήνες αλλά θέλουμε να γονιμοποιήσουμε βασίλισσες παρθένες καθώς τα μελίτσια σε περιόδους χωρίς άφθονη τροφή και σε δυσμενείς καιρικές συνθήκες θανατώνουν τους κηφήνες αφήνοντας τους να λιμοκτονήσουν έξω από την κυψέλη, ενώ οι ωοτόκες εργάτριες αποτελούν μια πηγή κηφήνων.

Τα αποτελέσματα του πειράματος δείχνουν ότι συμφωνούν με την μελέτη των Gençer και Kahya (2011) καθώς σύμφωνα με τις μετρήσεις και τα διαγράμματα φαίνεται ότι οι μικρότεροι κηφήνες στα ποσοτικά χαρακτηριστικά (βάρος, μήκος σώματος, κοιλίας και φτερών) δεν εμφανίζουν μεγαλύτερες τιμές στον αριθμό των σπερματοζωαρίων.

Η ηλικία επηρεάζει τον αριθμό και τη βιωσιμότητα των σπερματοζωαρίων στους κηφήνες. Οι Locke και Peng (1993) ανέφεραν ότι τα σπερματοζώαρια σε κηφήνες τεσσάρων έως έξι εβδομάδων εμφάνιζαν σταδιακή μειωμένη βιωσιμότητα και μείωση του αριθμού σε σύγκριση με τους κηφήνες ηλικίας δύο εβδομάδων.

Οι Den Boer et al. (2009) πρότειναν ότι το σπερματικό υγρό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη βιωσιμότητα του σπέρματος κατά τη διάρκεια της προσωρινής αποθήκευσης, στο αναπαραγωγικό σύστημα της βασίλισσας πριν από την τελική αποθήκευση στη σπερματοθήκη, γιατί το σπερματικό υγρό περιέχει ένα υποσύνολο πρωτεϊνών που διατηρούν τη βιωσιμότητα του σπέρματος. Η βιωσιμότητα του σπέρματος σε μεγάλο ιξώδες μπορεί να αναμένεται να είναι μικρότερη, αφού το παχύρρευστο σπέρμα περιέχει λιγότερο σπερματικό υγρό. Όμως οι Gençer και Kahya (2015), δεν βρήκαν καμία διαφορά μεταξύ μεγάλων και μικρών κηφήνων ως προς την βιωσιμότητα του σπέρματος, αν και οι συγκεντρώσεις σπερματοζωαρίων τους ήταν διαφορετική.

Η βιωσιμότητα του σπέρματος σύμφωνα με τους Gençer και Kahya (2015), η οποία μετράται ως το ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων στο σπέρμα ενός κηφήνα είναι μια διαδικασία για την αξιολόγηση της ποιότητας του σπέρματος.

Βρέθηκαν παρόμοια αποτελέσματα στους κηφήνες που προήλθαν από βασίλισσα που ήταν μεγαλύτεροι σε μέγεθος (βάρους, μήκος) και απόδειξαν ότι η βιωσιμότητα του σπέρματος και του μήκος του σπέρματος δεν εξαρτάται από το σωματικό βάρος των κηφήνων. Σύμφωνα με τον Woyke (1983) οι κηφήνες από ωοτόκες εργάτριες μπορεί να παράγουν μικρότερη ποσότητα από σπερματοζωάρια αλλά δεν είναι κατώτερης ποιότητας από αυτά που παράγουν οι κηφήνες που προέρχονται από βασίλισσες. Επίσης, οι κηφήνες που προέρχονται από εργάτριες ωοτόκες παράγουν λιγότερα σπερματοζωάρια ($7,5 \times 10^6$) και είναι μικρότεροι σε μέγεθος και βάρος από τους κανονικούς σε μέγεθος που προέρχονται από βασίλισσα ($11,9 \times 10^6$). Οι Gençer και Firatli (2005) βρήκαν ότι το βάρος των κηφήνων από βασίλισσα ήταν 17% μεγαλύτερο από αυτά που παράγονται από ωοτόκες εργάτριες. Ο μέσος αριθμός των σπερματοζωαρίων από κηφήνες από μελίσσι με βασίλισσα ($12,01 \times 10^6$) ήταν επίσης σημαντικά μεγαλύτερος από τους κηφήνες που προέρχονται από εργάτριες ($10,17 \times 10^6$) (Burley, 2007).

Στο πείραμα που διεξήχθη, με τη χρώση (διάλυμα Kievn- εωσίνη Υ) δεν έχουμε διαφορές ως προς την ποιότητα του σπέρματος, καθώς στα διαλύματα, τα σπερματοζωάρια και των δύο ομάδων κηφήνων - κηφήνες που προέρχονται από ωοτόκες εργάτριες και κηφήνες από βασίλισσες - δεν εμφανίζουν νεκρά σπερματοζωάρια. Οι κηφήνες που είναι μικρότεροι σε μέγεθος σύμφωνα με Koenig et al. (1979), χάνουν τη μάχη του ζευγαρώματος στον αέρα καθώς ο ανταγωνισμός μεταξύ των κηφήνων στην πτήση της βασίλισσας είναι μεγάλος. Η ικανότητα πτήσης και η ποσότητα σπέρματος (Rinderer, 1985) διαφέρουν σε κάθε κηφήνα. Αμφότερα αυτά τα γνωρίσματα επηρεάζουν την ατομική τους αναπαραγωγική επιτυχία. Επιπλέον, οι κηφήνες ανταγωνίζονται μεταξύ τους επειδή οι βασίλισσες ζευγαρώνουν με πολλούς κηφήνες (Franck et al., 2002) ενώ οι κηφήνες μια φορά και μετά θανατώνονται εξαιτίας της αναστροφής των γεννητικών τους οργάνων.

Οι Schluns et al. (2003) απέδειξαν ότι το μήκος του ανοίγματος των φτερών σχετίζεται με το βάρος. Οι μικροί κηφήνες, είχαν και μικρότερο βάρος και μικρότερο μήκος φτερών από τους μεγαλύτερους κηφήνες γεγονός που το καθιστά και ως παράγοντα στην μεταξύ τους ανταγωνιστικότητα κατά τη γονιμοποίηση.

Επίσης, είχαμε θνησιμότητα των εγκλωβισμένων κηφήνων που οφείλεται στο ότι οι κηφήνες είναι ευαίσθητοι στην αύξηση της θερμοκρασίας. Σύμφωνα με τους Sturup et al., (2013) έκθεση κηφήνων πάνω από 40°C έχουμε ποσοστό θνησιμότητας 77%. Πολλοί από τους κηφήνες που ήταν μικρότεροι των 10 ημερών δεν είχαν ποσότητα σπέρματος και σε κάποιους δεν γινόταν η εκσπερμάτωση και αυτό οφείλεται στο ότι ήταν ανώριμοι αναπαραγωγικά (μικροί σε ηλικία). Η ηλικία παίζει σημαντικό ρόλο στην βιωσιμότητα του σπέρματος και στην αύξηση του αριθμού των σπερματοζωαρίων. Έτσι, στα αποτελέσματα παρατηρούμε ότι οι μεγαλύτεροι κηφήνες έχουν μεγαλύτερο αριθμό σπερματοζωαρίων. Τέλος, βλέπουμε ότι όσο μεγαλώνουν οι κηφήνες τόσο μειώνεται ο αριθμός των σπερματοζωαρίων (Locke and Peng, 1993). Επίσης, έχει βρεθεί ότι κηφήνες προσβεβλημένοι από Βαρροϊκή ακαρίαση και αναλόγα με την προσβολή δεν μπορούν είτε να πετάξουν σε μεγάλες αποστάσεις είτε καθόλου εξαιτίας των κομμένων φτερών και να γονιμοποιήσουν τις βασίλισσες. Ακόμα έχει βρεθεί ότι αν και μπορεί να εμφανίζουν μικρότερο αριθμό σπερματοζωαρίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην τεχνητή σπερματέγχυση (Duay, 2002).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Θρασυβούλου, Α. 1998.** Πρακτική μελισσοκομία. Εκδόσεις Μελισσοκομική Επιθεώρηση, Ν. Παππάς, Μεσημέρι Θεσ/νίκης. 255 σελ.
- Κωσταρέλου, Μ. 1988.** Η τεχνητή σπερματέγχυση στη μέλισσα. Μεταπτυχιακή διατριβή. Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Λιάκος, Β., 2000.** Εποχιακοί χειρισμοί και άλλες μελισσοκομικές εργασίες. Μελισσοκομική Επιθεώρηση 14(10):428-430
- Λιάκος, Β., 2001.** Η βελτίωση και η επιλογή στα μελίσσια μύθος και πραγματικότητα. Μελισσοκομική Επιθεώρηση 15(6):276 - 279.
- Λιάκος, Β., 1993.** Σμηνουργία. Μελισσοκομική Επιθεώρηση 7(5):186-188.
- Λιάκος, Β., 2003.** Παραγωγή μελισσών. Μελισσοκομική Επιθεώρηση.17(3):138-145.
- Μπουγά, Μ., 2004.** Το γονίδιο που καθορίζει το φύλο στη μέλισσα. Μελισσοκομική Επιθεώρηση 18(4):213-214.
- Μπουγά, Μ., 2004.** Για τη γενετική βελτίωση των μελισσών (9), Μελισσοκομική Επιθεώρηση. 18(5):299-300.
- Υφαντίδης, Μ. 2002.** Η χημική επικοινωνία στην κοινή μέλισσα *Apis mellifera*. Μελισσοκομική Επιθεώρηση, 16(4): 207-214.
- Υφαντίδης, Μ. 2003.** Η χημική επικοινωνία στην κοινή μέλισσα *Apis mellifera*. Μελισσοκομική επιθεώρηση, 17(4): 203-209.
- Υφαντίδης, Δ.Μ. 1985.** Μελισσοκομία. Επιστήμη και Εφαρμογή. Θεσσαλονίκη. 577 σελ.
- Υφαντίδης, Δ.Μ. 2005.** Η Σύγχρονη Μελισσοκομία ως Επιστήμη και Πράξη. Εκδόσεις Παππάς Νίκος, Μελισσοκομική Επιθεώρηση, Έκδοση Α, Θεσσαλονίκη. 686 σελ.
- Τσίπη, Μ. 2012.** Καταγραφή, Αξιολόγηση και Βελτίωση Ποιοτικών και Ποσοτικών Χαρακτήρων Ελληνικών Πληθυσμών της Μέλισσας *Apis mellifera*. Διδακτορική Διατριβή. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Χαριζάνης, Π. 1991.** Δύο μέθοδοι μέτρησης του αριθμού των σπερματοζωαρίων στα έντομα. Πανελλήνιο εντομολογικό συνέδριο. Αθήνα.
- Χαριζάνης, Π. 1996.** Μέλισσα και Μελισσοκομική Τεχνική. Β΄ Έκδοση. Θεσσαλονίκη. 263 σελ.

Χαριζάνης, Π. 2014. Μέλισσα και Μελισσοκομική Τεχνική. Γ΄ Έκδοση. Θεσσαλονίκη. 277 σελ.

Χατζάκης, Μ., 2005. Παραγωγή Ποιοτικών Βασιλισσών της Μέλισσας- Τρόποι και Μέθοδοι. Πτυχιακή Εργασία. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Allen, M.D. 1965. The effect of plentiful supply of drone comb on colonies of honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 4(1):109-119.

Ben Abdelkader, F., G. Kairo, S. Tchamitchian, M. Cousin, J. Senechal, D. Crauser, J. Vermandere, C. Alaux, Y. Le Conte, L. Belzunces, N. Barbouche and J. Brunet 2013. Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie* 45(2):215-223.

Berg, S. 1991. Investigation on rates of large and small drones at a drone congregation area. *Apidologie* (22):437–438.

Berg, S. and N. Koeniger 1990. Larger drones (*Apis mellifera*) have more offspring, in: Proc. German Zoological Society, 83rd Meeting, Frankfurt am Main, Gustav Fischer Verlag, pp. 614.

Berg, S., N. Koeniger, G. Koeniger and S. Fuchs 1997. Body size and reproductive success of drones (*Apis mellifera* L). *Apidologie* 28(6):449-460.

Woyke, J. and Z. Jasinski 1976. The influence of age on the results of instrumental insemination of honeybee queens. *Apidologie* 7(4):301-306.

Cramp, D.C. 1998. Drone congregation Areas. One aspect of honey bee mating. *American Bee Journal* 138(1):29-33.

Cobey, S., D. Tarpy and J. Woyke 2013. Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research* 52(4):1-18.

Cobey, S. 2003. The extraordinary honey bee mating strategy and a simple field dissection of the spermatheca. *American Bee Journal* 143 (1):67-69.

Cobey, S. and T. Lawrence 1988. A Successful Application of the Page/ Laidlaw breeding program. *Gleanings in Bee Culture*. 274-276.

Cobey, S. 1983. The development of Instrumental Insemination. *American Bee Journal* 2(1):108-111.

- Cobey, S. 1983.** Instrumental Insemination: Current developments and its application today. *American Bee Journal* 3(1):182-186.
- Cobey, S. 1983.** Drone rearing for Instrumental Insemination. *American Bee Journal* 4(123):284-289.
- Cobey, S. 2007.** Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee queens and factors affecting their performance. *Apidologie* 38(4):390-410.
- Cobey, S., D. Tarpy and J. Woyke 2013.** Standard methods for Instrumental Insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research* 52(4):1-18.
- Collins, A. 2000.** Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honey bee queens. *Apidologie* 31(3):421-429.
- Collins, A. and J. Pets 2001.** Effect of Varroa infestation on semen quality. *American Bee Journal* 8(141):590-593.
- Collins, A. 2004.** Sources of variation in the viability of honey bee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination. *Invertebrate Reproduction & Development*, 45(3):231-237.
- Dade, H. A. 1962.** *Anatomy and Dissection of the Honeybee*. International: Bee Research Association. London. 158pp. 20 plates.
- Delaney, D., J. Keller, J. Caren and D. Tarpy 2011.** The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 42(1):1-13.
- Dougherty, K.A., L.B. Emilson, A.T.K. Cockett and R.L. Urry 1975.** A comparison of subjective measurement of human sperm motility and viability with two live-dead staining techniques. *Fertility and Sterility*, 26, 700-709.
- Duay, P., D. De Jong and W. Engels 2002.** Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genetics and Molecular Research* 3(1):227-232.
- Eliasson, R. and Treichl, L. 1971.** Supravital staining of human spermatozoa, *Fertility and Sterility* 22:134-137.
- Harbo, J.R. 1985.** Instrumental Insemination of queen bees. Part I. *American Bee Journal* 125(3):197-203.
- Harbo, J.R. 1985.** Instrumental Insemination of queen bees. Part II. *American Bee Journal* 125(4):282-286.
- Harbo, J.R. 1975.** Measuring the concentration of spermatozoa from honeybees with spectrophotometry. *American Bee Journal* (4):282-286.

- Gabka, J. 2013.** The number of spermatozoa in the spermatheca and the onset of oviposition in naturally mated and instrumentally inseminated honey bee queens. International Apicultural Congress. pp.141
- Gary, N.E. 1992.** Activities and Behavior of Honey Bees. In: J.M. Graham. The Hive and the Honey Bee. Dadant and Sons, Hamilton, Illinois. 1324 pp.
- Gary, N., P. Witherell and K. Lorenzen 1978.** A Comparison of the foraging activities of common Italian and "Hy-Queen" honey bees. *Environmental Entomology*, 7(2), pp.228-232.
- Gençer, H. and Y. Kahya, 2011.** The viability of sperm in lateral oviducts and spermathecae of instrumentally inseminated and naturally mated honey bee (*Apis mellifera* L.) queens. *Journal of Apicultural Research* 50(3):190-194.
- Gençer, H., Y. Kahya and J. Woyke 2014.** Why the viability of spermatozoa diminishes in the honeybee (*Apis mellifera*) within short time during natural mating and preparation for instrumental insemination. *Apidologie* 45(6):757-770.
- Gençer, H.V. and Y. Kahya 2011.** Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy?, *Journal of Apicultural Research* 50(2):130–137.
- Jaycox, F.R. 1961.** The effects of various foods and temperatures on sexual maturity of the drone honeybee *Apis mellifera*. *Annals of the Entomological society of America* (54):519-523.
- Kaftanoglu, O. and Y. Peng 1980.** A washing technique for collection of honeybee semen. *Journal of Apicultural Research* 19(3): 205-211
- Kaftanoglu, O. and Y. Peng 1980.** A new syringe for semen storage and instrumental insemination of queen honeybees. *Journal of Apicultural Research* 19(1): 73-76.
- Kaftanoglu, O. and Y. Peng 1982.** Effects of insemination on the initiation of oviposition in the queen honeybee. *Journal of Apicultural Research* 21(1): 3-6.
- Kaftanoglu, O., T. Linksvayer and R. Jr Page 2010.** Rearing honey bees (*Apis mellifera* L.) in vitro: effects of feeding intervals on survival and development. *Journal of Apicultural Research* 49(4):311-317.
- Krell, 1996.** Value added products from beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin No. 124. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Laidlaw, H. 1977.** *Instrumental Insemination of Honey Bee Queens*. Pictorial Instructional Manual. Dadant & Sons, Hamilton, Illinois. 144pp.
- Laidlaw, H. 1987.** Instrumental Insemination of Honeybee Queens: Its Origin and Development. *Bee World*, 68(2):71-88.

- Laidlaw, H. H. Jr. 1987.** Instrumental insemination of honey bee queens: Its origin and development. *Bee World* 68(2):71-88
- Locke, S. and Y. Peng, 1993.** The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiological Entomology* 18(2):144-148.
- Mazeed, A. 2011.** Morphometry and number of spermatozoa in drone honeybees (Hymenoptera: Apidae) reared under different conditions. *European Journal of Entomology* 108(4):673-676.
- Morse, A. R. and T. Hooper, 1985.** *The Illustrated Encyclopedia of Beekeeping*. E. P. Dutton, Inc., N. Y., 421.
- Moritz, R. 1984.** The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen. *Journal of Apicultural Research* 3(23):164-167.
- Pawsay, R.K. 1974.** Techniques with Bacteria. Hutchinson Educational Ltd., London.
- Peng, Y., S. Locke, M. Nasr, T. Liu, and M. Montague 1990.** Differential staining for live and dead sperm of honey bees. *Physiological Entomology* 15(2):211-217.
- Page, R.E. Jr. 1986.** Sperm utilization in social insects, Annual. Review of Entomology 31: 297–320.
- Page, R.E. Jr. and E.H. Jr. Erickson 1988.** Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L.), Behavioral Ecology and Sociobiology 23:117–126.
- Rhodes, J., S. Harden, R. Spooner-Hart, D. Anderson, and G. Wheen, 2011.** Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie* 42(1):29-38.
- Rinderer, T. E. 1981.** Volatiles from empty comb increase hoarding by the honey bee. *Animal Behaviour* 29: 1275-1276.
- Ruttner, F. 1976.** The Instrumental Insemination of the Queen Bee. International Bee Keeping Technology and Economy Institute of Apimondia. Bucharest, Romania. Second improved edition.123pp.
- Ruttner, F. 1988.** Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer Verlag, Berlin. 284 pp.
- Schley, P. 1988.** An important improvement in the insemination technique of queen honey bees. *American Bee Journal* 128(4) :282-284.
- Schlüns, H., E. Schlüns, J. van Praagh and R. Moritz 2003.** Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie* 34(6): 577-584.

- Snodgrass, R.E. 1956.** Anatomy of the Honey bee. Bee. Cornell University Press, Ltd., London, 334 pp.
- Sturup, M., B. Baer-Imhoof, D. Nash, J. Boomsma and B. Baer 2013.** When every sperm counts: factors affecting male fertility in the honeybee *Apis mellifera*. *Behavioral Ecology* 24(5):1192-1198.
- Vergoz, V., J. Lim, M. Duncan, G. Cabanes, and B. Oldroyd 2012.** Effects of natural mating and CO₂ narcosis on biogenic amine receptor gene expression in the ovaries and brain of queen honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* 21(6):558-567.
- Winston, M. L. 1987.** *The biology of the honeybee*. Harvard University Press, Massachusetts 281 pp.
- Woyke, J. and Z. Jasinski 1976.** The influence of age on the results of instrumental insemination of honeybee queens. *Apidologie* 7(4):301-306.
- Woyke, J. 1969.** A method of rearing diploid drones in a honeybee colony. *Journal Apiculture Research* 2(8):65-74.
- Woyke, J. 1962.** Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World* 43(1):21-25.
- Woyke, J. 1983.** Lengths of haploid and diploid spermatozoa of the honey bee and the question of the production of triploid workers. *Journal of Apicultural Research* 122(3):146-149.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παρακάτω παραθέτουμε τα παραρτήματα από το πείραμα του Β μέρους.

Average of Weight	Column Labels		
Row Labels	Βασίλισσα	Εργάτριες	Grand Total
8-10	0,1961	0,1746	0,1854
11-13	0,2008	0,1361	0,1684
14-16	0,1942	0,1700	0,1828
17-19	0,1959	0,1660	0,1801
20-22	0,2203	0,1770	0,1986
23-25	0,1748	0,1565	0,1656
Grand Total	0,1969	0,1634	0,1802
Grand Total	0,1969	0,1634	0,1802

s.e.			
Row labels	Βασίλισσα	Εργάτριες	Grand Total
8-10	0,0061308	0,0102851	0,0064154
11-13	0,0043126	0,0040463	0,0088185
14-16	0,0070312	0,0015924	0,0047691
17-19	0,0013421	0,0018028	0,0038895
20-22	0,0040477	0,0048953	0,0063711
23-25	0,0015783	0,0052881	0,0035577
Grand Total	0,00	0,00	0,00

Average of BodySize	Column Labels		
Row Labels	Βασίλισσα	Εργάτριες	Grand Total
8-10	1,7061	1,7163	1,7112
11-13	1,7305	1,5813	1,6559
14-16	1,6911	1,6438	1,6688
17-19	1,8163	1,6333	1,7194
20-22	1,5228	1,7438	1,6333
23-25	1,5761	1,6689	1,6225
Grand Total	1,6742	1,6639	1,6690
Grand Total	1,6742	1,6639	1,6690

s.e.			
Row labels	Queen	Worker	Grand Total
8-10	0,0255723	0,0678743	0,0350606
11-13	0,0264899	0,0203924	0,0251401
14-16	0,0373796	0,0350987	0,0256596
17-19	0,0067526	0,0268225	0,0268479
20-22	0,0050418	0,0187976	0,0300399
23-25	0,0231566	0,0344837	0,0233658
Grand Total	0,00	0,00	0,00

Average of Abdomen Row Labels	Column Labels Βασίλισσα	Εργάτριες	Grand Total
8-10	0,801	0,800	0,800
11-13	0,869	0,740	0,804
14-16	0,821	0,876	0,847
17-19	0,953	0,651	0,793
20-22	0,725	0,804	0,764
23-25	0,715	0,770	0,743
Grand Total	0,8141	0,7710	0,7926
Grand Total	0,8141	0,7710	0,7926

s.e. Row labels	Queen	Worker	Grand Total
8-10	0,0340855	0,0395511	0,0252210
11-13	0,0318402	0,0150000	0,0237879
14-16	0,0233619	0,0187976	0,0162536
17-19	0,0080144	0,0359955	0,0421481
20-22	0,0068139	0,0290896	0,0176533
23-25	0,0056695	0,0418330	0,0215928
Grand Total	0,00	0,00	0,00

Average of Sperm Row Labels	Column Labels Βασίλισσα	Εργάτριες	Grand Total
8-10	1,525	1,544	1,534
11-13	4,0375	3,1575	3,5975
14-16	4,332	2,334	3,392
17-19	6,566	2,313	4,315
20-22	5,195	4,079	4,637
23-25	5,113	5,845	5,479
Grand Total	4,459	3,194	3,826
Grand Total	4,4588	3,1937	3,8262

s.e. Row labels	Queen	Worker	Grand Total
8-10	0,1986562	0,3809571	0,2075511
11-13	0,4439102	0,0976098	0,2472035
14-16	0,5166150	0,1438369	0,3702644
17-19	0,4670421	0,0847709	0,5731031
20-22	0,0180278	0,3403488	0,2187954
23-25	0,0573445	0,5059856	0,2635303
Grand Total	0,00	0,00	0,00