

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

Τίτλος Πτυχιακής Εργασίας

**ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΛΙΣΣΩΝ:
Η ΤΕΧΝΗΤΗ ΣΠΕΡΜΑΤΕΓΧΥΣΗ
ΣΤΙΣ ΒΑΣΙΛΙΣΣΕΣ**

Χρυσάνθη-Αρχοντία Καντάνιου

Τεχνολόγος Γεωπόνος

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ:

ΑΘΗΝΑ ΜΠΑΣΙΟΥΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Φλώρινα 2023

Δήλωση περί μη λογοκλοπής

Δηλώνω ότι είμαι ο συγγραφέας της παρούσας εργασίας με τίτλο **ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΛΙΣΣΩΝ: Η ΤΕΧΝΗΤΗ ΣΠΕΡΜΑΤΕΓΧΥΣΗ ΣΤΙΣ ΒΑΣΙΛΙΣΣΕΣ** που συντάχθηκε στα πλαίσια της πτυχιακής μου εργασίας και παραδόθηκε το μήνα Αύγουστο του 2023. Η αναφερόμενη εργασία δεν αποτελεί αντιγραφή ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Οι πηγές που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται σαφώς στη βιβλιογραφία και στο κείμενο ενώ κάθε εξωτερική βοήθεια, αν υπήρξε, αναγνωρίζεται ρητά.

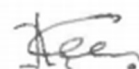
Όνομα (κεφαλαία)

ΑΜ

Υπογραφή:

ΚΑΝΤΑΝΙΟΥ ΧΡΥΣΑΝΘΗ

FG31586



-ΑΡΧΟΝΤΙΑ

Ημερομηνία

13/09/2023

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε κατά το έτος 2023.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτριά μου κυρία Αθηνά Μπασιούρα αρχικά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Πολύτιμη ήταν η καθοδήγηση που μου προσέφερε και ο χρόνος που διέθεσε για την επίλυση διαφόρων δυσκολιών που προέκυψαν κατά την διάρκεια όλης αυτής της προσπάθειας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου η οποία με στήριξε τόσο στην παρούσα εργασία όσο και καθ' όλη τη διάρκεια της ποριάς μου. Τέλος, είμαι ευγνώμον για όλες τους τις συμβουλές.

Περίληψη

Οι μέλισσες ξεχωρίζουν για την τελειότητα τους τόσο ως προς την εξωτερική μορφή αλλά και ως προς την οργάνωση των κοινωνιών τους. Η εξέλιξη των επιστημών και των ερευνών έδωσε την δυνατότητα να μελετηθεί εκτενώς η κοινωνία τους. Ειδικότερα, πολλοί μελετητές ασχολήθηκαν με τη φυσική αναπαραγωγή των μελισσών και το ενδιαφέρον δεν άργησε να στραφεί στον έλεγχο των συζεύξεων με την εισαγωγή της τεχνητής σπερματέγχυσης (Τ.Σ.) ως μέθοδο γονιμοποίησης των βασιλισσών. Στην παρούσα βιβλιογραφική πτυχιακή εργασία περιγράφεται η τεχνητή σπερματέγχυση στις μέλισσες, παραθέτοντας ιστορικά στοιχεία, τεχνικές πληροφορίες της διαδικασίας και τα όποια οφέλη μπορούν να προκύψουν από την εφαρμογή της στην πράξη.

Στα κεφάλαια που ακολουθούν, αναλύεται η βιολογική προέλευση της μέλισσας, οι φυλές που εμφανίζονται στον Ελλαδικό χώρο, ο βιολογικός κύκλος και ο διαχωρισμός φύλου και κάστας. Ακόμη, γίνεται αναφορά στο γενετικό σύστημα, την αναπαραγωγική ωρίμανση και την ωοτοκία της βασίλισσας αλλά και στη σωματική διάπλαση του κηφήνα, στον πληθυσμό τους στην κυψέλη, στην αναπαραγωγική τους ωρίμανση και τέλος στην περιοχή συγκέντρωσής τους. Στο τρίτο κεφάλαιο, παρουσιάζεται η διαδικασία της φυσικής σύζευξης (ο χρόνος, η διάρκεια, ο τόπος, ο ρόλος των εργατριών). Ακολουθεί εκτενής αναφορά στην τεχνητή σπερματέγχυση γενικά ως διαδικασία και τα ιστορικά στοιχεία για αυτή. Επιπλέον, γίνεται μια περιγραφή της διαδικασίας συλλογής σπέρματος, της συντήρησης του ως νωπό-αραιωμένο ή κρυοσυντηρημένο, ενώ στο ίδιο κεφάλαιο παρουσιάζεται ο απαιτούμενος εξοπλισμός και τα αναλώσιμα. Τέλος, η εργασία εμβαθύνει στα στάδια της τεχνητής σπερματέγχυσης καθώς και στην εκτροφή και προετοιμασία της βασίλισσας και του κηφήνα πριν και μετά την διαδικασία, ενώ τέλος αναφέρονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της μεθόδου.

Λέξεις κλειδιά: τεχνητή σπερματέγχυση (τ.σ.), βασίλισσα, κηφήνας, γενετικό υλικό.

Abstract

Bees stand out for their perfection both in terms of external form and in terms of the organization of their societies. The development of science and research in general made it possible to study their societies in depth. In particular, many researchers became interested in the natural reproduction of bees, and their interest turned soon to the control of bee mating. Specifically, with the use of artificial insemination (A.I.), the unknown genetic material is limited during natural fertilization. Drawing information from bibliographic data, this thesis focuses on the analysis of the natural mating and the method of artificial insemination.

The chapters that will follow deal with the biological origin of the bee, the tribes that appear in Greece, the life cycle of a honeybee as well as the gender and caste separation. Furthermore, reference is made not only to the genetic system, the reproductive maturation and egg-laying of the queen, but also to the body structure of the drone, the population in the hive, the reproductive ability and finally, to the drone congregation area. In the third chapter, the process of natural mating is presented (the time, the duration, the place, the role of the worker bees). Moreover, there is an extensive reference to the process of artificial queen bee insemination and historical data about artificial insemination is also being presented. In addition, the thesis concentrates on the description of the sperm collection process and its preservation in a fresh state with or without diluents and also a description is made about the sperm cryopreservation with the use of diluents. The same chapter presents the required equipment, such as stereoscope, hooks, syringe, heat retention filter, high pressure CO₂ cylinder and some auxiliary tools (sterilizing oven, saline, sterile glass containers, pipettes and their tips, distilled water, 95% ethanol, queen cages, drone cages and drone flight/collection cage). Additionally, the paper delves into the stages of artificial insemination as well as the rearing and preparation of the queen and drone before and after the procedure and finally, the advantages and disadvantages of the method are discussed.

Keywords: artificial insemination (a.i.), queen, drone, genetic material.

Περιεχόμενα

Δήλωση περί μη λογοκλοπής.....	ii
Ευχαριστίες.....	iii
Περίληψη.....	iv
abstract.....	v
Πρόλογος.....	viii
Εισαγωγή.....	- 2 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΦΥΛΕΣ ΜΕΛΙΣΣΩΝ.....	- 4 -
1.1. Συστηματική κατάταξη.....	- 4 -
1.2. Φυλές που συναντώνται στον ελλαδικό χώρο.....	- 5 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΟΙΝΩΝΙΑ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ.....	- 8 -
2.1. Ο βιολογικός κύκλος μέλισσας, διαφοροποίηση φύλου και κάστας.....	- 8 -
2.2. Βασίλισσα.....	- 9 -
2.5. Κηφήνας.....	- 11 -
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΦΥΣΙΚΗ ΣΥΖΕΥΞΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΤΗ ΣΠΕΡΜΑΤΕΓΧΥΣΗ.....	- 13 -
3.1. Διαδικασία φυσικής σύζευξης.....	- 13 -
3.2. Τεχνητή σπερματέγχυση (Τ.Σ.).....	- 15 -
3.2.1. Εισαγωγή στην τεχνητή σπερματέγχυση και ιστορικά στοιχεία.....	- 15 -
3.2.2. Συλλογή σπέρματος κηφήνα.....	- 17 -
3.2.3. Αραιώση και συντήρηση του σπέρματος του κηφήνα.....	- 22 -
3.2.3.1. Συντήρηση νοπού αραιωμένου σπέρματος.....	- 22 -
3.2.3.2. Αραιωτικά συντήρησης του νοπού σπέρματος.....	- 23 -
3.2.4. Κρυοσυντήρηση του σπέρματος.....	- 24 -
3.2.4.1. Αραιωτικά κρυοσυντήρησης.....	- 26 -
3.2.5. Εξοπλισμός για την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης.....	- 27 -
.....	- 33 -
3.2.6. Εκτροφή, προετοιμασία και μεταχείριση βασιλισσών πριν και μετά την τεχνητή σπερματέγχυση.....	- 33 -
3.2.7. Προετοιμασία των κηφήνων για την τεχνητή σπερματέγχυση.....	- 35 -
3.2.8. Διαδικασία της τεχνητής σπερματέγχυσης.....	- 35 -
3.2.9. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της τεχνητής σπερματέγχυσης.....	- 39 -

Πρόλογος

Η κοινωνικότητα της μέλισσας αναγνωρίζεται από τους κλασικούς χρόνους. Ο Αριστοτέλης στο έργο του «Περί τα ζώα ιστορία», ξεχωρίζει τις μέλισσες όσο και τους ανθρώπους στην πολύ μικρή ομάδα των κοινωνικών ζώων. Η μέλισσα δεν μπορεί να ζήσει μόνη της, αλλά μόνο σε μία κοινότητα που λειτουργεί στην κατεύθυνση ενός μεγαλύτερου συνόλου, γεγονός που συμπίπτει με τον καταπληκτικό αριστοτελικό ορισμό του ανθρώπου ως κοινωνικού και πολιτικού όντος.

Ο σύγχρονος άνθρωπος λόγω της εξέλιξης της επιστήμης και της τεχνολογίας έχει καταφέρει να παρέμβει σε πολλές από τις φυσικές διαδικασίες. Εδώ και κάποια χρόνια επιστήμονες που ειδικεύονται είτε στο χώρο της εντομολογίας είτε της μελισσοκομίας κατάφεραν να εφαρμόσουν μέσα σε εργαστήρια την τεχνητή σπερματέγχυση (Τ.Σ.) στις βασίλισσες.

Η μέλισσα ως αγελαίο ζώο έχει την τάση να αναπαράγεται γεγονός που οδήγησε τον άνθρωπο να μελετήσει την διαδικασία αυτή. Είναι τόσο οργανωμένη η κοινωνία των μελισσών που αφήνει στον άνθρωπο το περιθώριο να παρέμβει με την εφαρμογή της Τ.Σ. με στόχο τη διατήρηση του γενετικού υλικού, μεταξύ των άλλων.

Για την επίτευξη των παραπάνω η διαδικασία που πρέπει να ακολουθείται για την Τ.Σ. είναι η εξής: αρχικά γίνεται επιλογή των κατάλληλων βασιλισσών και κηφήνων που θα υποβληθούν στην μέθοδο, ενώ στη συνέχεια, δίνεται προσοχή στην εκτροφή και προετοιμασία τους. Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της Τ.Σ., η γονιμοποιημένη πλέον βασίλισσα μεταφέρεται σε κυψελίδια προκειμένου να περιοριστεί η τάση της για αναζήτηση φυσικής σύζευξης και να πραγματοποιηθεί η αποθήκευση του σπέρματος στην σπερματοθήκη της. Μετά την παραμονή της βασίλισσας στο κυψελίδιο πραγματοποιείται η μεταφορά της στην κυψέλη από όπου πλέον στο οικείο της περιβάλλον θα γίνει η εναπόθεση των αυγών στα κελιά. Εκτός από την διαδικασία της άμεσης έγχυσης του σπέρματος στην βασίλισσα υπάρχουν και οι επιλογές της συντήρησης και της κρυοσυντήρησης του σπέρματος για μελλοντική χρήση του.

Η Ελλάδα ως μελισσοκομική χώρα με παράδοση στην μελισσοκομία λόγω της γεωμορφολογίας της δίνει την δυνατότητα για περαιτέρω ενασχόληση με τον κλάδο. Συγκεκριμένα, οι διαφορετικές κλιματικές συνθήκες του Ελλαδικού χώρου ευνοούν την εξασφάλιση της ποικιλίας στη ποιότητα του μελιού που σε συνδυασμό με την

διατήρηση μίας καλής ποιότητας γενετικού υλικού φέρουν το καλύτερο αποτέλεσμα. Βέβαια η εφαρμογή της συγκεκριμένης διαδικασίας συναντάται κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς αν και μελλοντικά στόχος είναι να μπορεί να αξιοποιηθεί η διαδικασία από κάθε μελισσοκόμο ο οποίος στοχεύει τόσο στην ποιότητα όσο και στην ποσότητα των συλλεγόμενων προϊόντων μελιού.

Εισαγωγή

Η τεχνητή σπερματέγχυση στις μέλισσες είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται με στόχο τη διατήρηση και βελτίωση της γενετικής ποικιλομορφίας των μελισσών. Αυτή η τεχνική επιτρέπει στους ερευνητές να ελέγχουν την διασφάλιση ισχυρών γενετικών γραμμών καθώς και την διάδοση τους. Με την μέθοδο της τεχνητής σπερματέγχυσης είναι δυνατός ο περιορισμός αστάθμητων παραγόντων, όπως οι κλιματικές μεταβολές, η διαθεσιμότητα της τροφής και οι μετάδοση ασθενειών που πιθανώς να εμπόδιζαν την φυσιολογική γονιμοποίηση.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία θα εξεταστούν οι τρόποι διατήρησης του γενετικού υλικού, καθώς ως πρόβλημα τίθεται η απειλή εξαφάνισης φυλών του είδους. Αν και η φυσική γονιμοποίηση αποτελεί τον πιο διαδεδομένο τρόπο διαίωνισης του είδους, η τεχνητή σπερματέγχυση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο, όταν παρουσιάζονται κίνδυνοι που απειλούν τον πληθυσμό.

Το ζήτημα της τεχνητής γονιμοποίησης της μέλισσας απασχόλησε την επιστημονική κοινότητα από τα τέλη του 18ου αιώνα. Αρχικά, ο Huber μέσα από την έρευνα διαπίστωσε προβλήματα που αφορούσαν την φυσική γονιμοποίηση και προέβη στην πρώτη Τ.Σ. (1788-1791). Στην συνέχεια, εξαιτίας του προβλήματος που είχε παρουσιαστεί στις Η.Π.Α με την φυλή των μαύρων μελισσών οι οποίες μεταφερόμενες από την Ευρώπη συζεύχθηκαν ακούσια με τις ιταλικές βασίλισσες, με αποτέλεσμα να επικρατήσουν ανεπιθύμητα στοιχεία της μαύρης φυλής, γεννήθηκε η ανάγκη για έλεγχο του ζευγαρώματος. Το 1927 ο Watson προέβη στην πρώτη επιτυχή Τ.Σ. που είχε πραγματοποιηθεί έως τότε. Διαφοροποιήσεις με την πάροδο των χρόνων εντοπίζονται ως προς τον εξοπλισμό και ελάχιστα ως προς τη διαδικασία.

Με την εργασία αυτή επιδιώκεται εκτός από την ανασκόπηση που αφορά την μέθοδο της Τ.Σ. ανά τους αιώνες, η ερευνητική προσέγγιση των εφαρμογών της μεθόδου στην σύγχρονη εποχή, τους τρόπους και τα εργαλεία για την ολοκλήρωση της. Επιπλέον, στόχος είναι να διεγείρει τον προβληματισμό του δέκτη σχετικά με το αν η μέθοδος είναι λειτουργική και συμφέρουσα ως προς την αποδοτικότητα και την διαδοχή των γενεών. Τέλος, σκοπός είναι ο αναγνώστης να μπει στην διαδικασία εύρεσης νέων τρόπων που θα καταστήσουν την Τ.Σ. ακόμη πιο αποτελεσματική και θα βοηθήσουν στην εξέλιξή της διαδικασίας με την χρήση σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων. Εκτός από

την κρυοσυντήρηση του σπέρματος για παράδειγμα στο μέλλον θα μπορούσε να απασχολήσει και η κατάψυξη των ωαρίων της βασίλισσας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΚΑΙ ΦΥΛΕΣ ΜΕΛΙΣΣΩΝ

1.1. Συστηματική κατάταξη

Η μελισσοκομία αποτελεί έναν σημαντικό κλάδο της ζωικής παραγωγής και έχει συμβάλει στην ενίσχυση της αγροτικής οικονομία σε παγκόσμιο επίπεδο. Η μέλισσα αποτελεί τον πρώτο κατά σειρά επικονιαστή καλλιεργούμενων και αυτοφυών φυτών. Ωστόσο, στα πλαίσια της σύγχρονης εντατικής γεωργίας, η αυξημένη χρήση φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων, εκτός των άλλων, αποτελεί συνήθη τακτική με αποτέλεσμα τη ραγδαία μείωση του πληθυσμού των εντόμων, μεταξύ των οποίων και της μέλισσας. Συνεπώς, η προστασία και η διατήρηση του πληθυσμού των μελισσών κρίνεται ιδιαίτερος κρίσιμο σημείο για τη διατήρηση της βιοποικιλότητας.

Τα είδη των μελισσών κατατάσσονται σε επτά οικογένειες, μία από τις οποίες είναι η οικογένεια Apidae. Σύμφωνα με τη συστηματική κατάταξη του ζωικού βασιλείου, η κοινή μέλισσα (*Apis Mellifera*) ταξινομείται ως εξής:

Ζωικό Βασίλειο: (Animalia)

Φύλο: (Arthropoda)

Κλάση: (Insecta)

Υποκλάση: (Pterygota)

Τάξη: (Hymenoptera)

Οικογένεια: (Apidae)

Γένος: (*Apis*)

Είδος: (*Apis Mellifera*)

Στην οικογένεια Apidae, εκτός από το γένος *Apis*, ανήκουν τα γένη (*Anthophora*, *Eucera*, *Nomada*, *Xylocopa*, *Bombus*, *Psithyrus*, *Euglossa*, *Melipona* και *Trigona*), τα δύο τελευταία αφορούν σε μέλισσες χωρίς κεντρί (Σκαπέτας, 2019).

Η μέλισσα του γένους *Apis* είναι ένα έντομο το οποίο συναντάται παγκοσμίως. Σύμφωνα με μία τελευταία ταξινόμηση, εκτός από το είδος *Apis Mellifera*, υπάρχουν επιπλέον τα εξής 10 είδη του γένους *Apis*: 1) *Apis Dorsata*, 2) *Apis Laboriosa*, 3) *Apis Binghami*, 4) *Apis Cerana*, 5) *Apis Florea*, 6) *Apis Koschevnikovi*, 7) *Apis Breviligula*, 8) *Apis Andreniformis*, 9) *Apis Nuluensis* και 10) *Apis Nigrocincta* (Σκαρπέτας, 2019).

Λόγω της προσαρμοστικότητας του είδους σε διάφορες συνθήκες υπάρχουν πολλές φυλές οι οποίες προκύπτουν με βάση τα διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά (χρώμα, μέγεθος σώματος, φτερών κ.λπ.), την ιδιαίτερη συμπεριφορά (επιθετικότητα, τάση σμηνουργίας κ.λπ.), τους παραγωγικούς δείκτες (ποσότητα παραγόμενου μελιού, ταχύτητα ανάπτυξης πληθυσμού κ.λπ.) ή το διαφορετικό γενετικό υλικό κατόπιν αναλύσεων του γονιδιώματος.

1.2. Φυλές που συναντώνται στον ελλαδικό χώρο

Στην Ελλάδα συναντώνται οι εξής 4 φυλές ή υπο-είδη σύμφωνα με την συστηματική κατάταξη του Ruttner (1988): 1) *A. Mellifera Macedonica* (Μακεδονία-Θράκη), 2) *A. Mellifera Carnica* (Επτάνησα), 3) *A. mellifera Cecropia* (Κεντρική και Νότια Ελλάδα) και 4) *A. mellifera adami* (Κρήτη), η οποία έχει πλέον εξαφανιστεί. Ωστόσο, έχει κυριαρχήσει η μακεδονική φυλή εξαιτίας των μετακινήσεων που αποτελούν βασική τακτική της νομαδικής μελισσοκομίας. Στην Κεντρική Ελλάδα αλλά και σε ορισμένες περιοχές που θεωρούνται απομονωμένες γεωγραφικά από την ηπειρωτική Ελλάδα, όπως κάποια νησιά του Αιγαίου, έχουν βρεθεί και άλλες φυλές πέραν της μακεδονικής.

Apis Mellifera Macedonica:

Η μέλισσα της φυλής *Apis Mellifera Macedonica*, ή μακεδονική φυλή (εικόνα 1.1) συναντάται στις περιοχές της Θεσσαλίας, της Ηπείρου, της Μακεδονίας και της Θράκης. Είναι ήρεμη με ικανοποιητικές παραγωγικές αποδόσεις σε μέλι και παρουσιάζει μικρή τάση για σμηνουργία. Το σμήνος αναπτύσσεται αργά κατά την άνοιξη, ενώ η δυναμική ανάπτυξή του το φθινόπωρο συμβάλει στη διατήρηση ενός δυνατού μελισσιού κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Βασικό μειονέκτημα της εν λόγω φυλής αποτελεί η μείωση του γόνου κατά τη διάρκεια της θερινής περιόδου.



Εικόνα 1.1. Μακεδονική φυλή.

Πηγή: (<https://www.facebook.com/profile.php?id=100066417172741>)

Apis Mellifera Carnika:

Η μέλισσα της φυλής *Apis Mellifera Carnika* (καρνιολική) είναι πολύ ήρεμη και βρίσκεται στην Δυτική Ήπειρο και στα νησιά του Ιονίου (εικόνα 1.2). Έχει σκούρο χρώμα με πολλά κοντά τριχίδια. Την περίοδο της άνοιξης χτίζει γρήγορα κηρήθρες γεγονός που προδιαθέτει σε σηπουργία, και έχει έντονα αναπτυγμένη την αίσθηση του προσανατολισμού. Η ανάπτυξη του γόνου εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα της γύρης και του νέκταρος κατά τους καλοκαιρινούς μήνες. Σε κάθε περίπτωση, διατηρείται δυνατός πληθυσμός για τον χειμώνα. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της είναι η ανθεκτικότητα στις ασθένειες.



Εικόνα 1.2. Καρνιολική φυλή.

Πηγή: (<http://www.vasilikoergastiri.gr/ti-fyles-uparxoun-kai-poes-gnwrizoume/>)

Apis Melifera Cecropia:

Η μέλισσα της φυλής (*Apis Melifera Cecropia*) (κεκρόπεια φυλή ή ελληνική φυλή), (εικόνα 1.3) είναι σχετικά ήρεμη, δεν εμφανίζει τάση για σμηνουργία και έχει χαρακτηριστικό αίσθημα προσανατολισμού. Λόγω της έντονης ωοτοκίας της βασίλισσας παρατηρείται μεγάλη πληθυσμιακή ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της άνοιξης. Εμφανίζει ικανοποιητική αντοχή σε ασθένειες του γόνου. Δεν έχει διαδοθεί στην Ευρώπη, λόγω της προσαρμογής της στο εύκρατο κλίμα. Στον Ελλαδικό χώρο συναντάται στην βόρεια Πελοπόννησο, στα νησιά του Σαρωνικού και στην Στερεά Ελλάδα.



Εικόνα 1.3. Κεκρόπεια φυλή ή ελληνική φυλή.

Πηγή: (https://en.wikipedia.org/wiki/Apis_mellifera_cecropia)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΚΟΙΝΩΝΙΑ ΤΩΝ ΜΕΛΙΣΣΩΝ

2.1. Ο βιολογικός κύκλος μέλισσας, διαφοροποίηση φύλου και κάστας

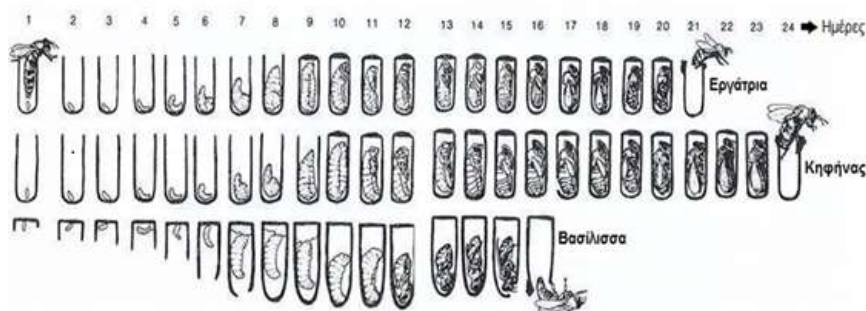
Η κοινή μέλισσα διέρχεται από τρία στάδια ανάπτυξης. Συγκεκριμένα είναι: 1) το αυγό, 2) η προνύμφη και 3) η νύμφη μέχρι να ενηλικιωθεί (εικόνα 2.1). Τα τρία αυτά ατελή στάδια του βιολογικού κύκλου είναι κοινώς γνωστά με τον όρο « γόνος ».



Εικόνα 2.1. Βιολογικός κύκλος μέλισσας.

Πηγή: (https://mydokument.com/flipbook-pdf-v-5f1ef7a811214-n-6478ef342d515.html?utm_source=dokumentpub)

Οι παραμάνες εργάτριες φροντίζουν τον γόνο με την παροχή τροφής μέχρι τη στιγμή της σφράγισης του κελιού. Στη συνέχεια οι προνύμφες πλέκουν το κουκούλι μεταμορφώνονται σε νύμφες και τέλος το ενήλικο άτομο αποσφραγίζει το κελί και εξέρχεται αυτού (εικόνα 2.2). Ο χρόνος που απαιτείται για την ολοκλήρωση της ανάπτυξης από το στάδιο του αυγού σε αυτό του ενήλικου ατόμου εξαρτάται από το φύλο και την κάστα. Συγκεκριμένα, για την βασίλισσα απαιτούνται 16 ημέρες, για την εργάτρια 21 ημέρες και για τον κηφήνα 24 ημέρες. Ο ακριβής χρόνος ανάπτυξης και η ποιότητα της εκκολαπτόμενης μέλισσας εξαρτάται από την θερμοκρασία της γονοφωλιάς, τη διατροφή των προνυμφών και την φυλή της μέλισσας (Χαριζάνης, 1993).



Εικόνα 2.2. Διάφορα στάδια ανάπτυξης της εργάτριας, του κηφήνα και της βασίλισσας.

Πηγή: (<https://melissokomianet.gr/biologikos-kuklos-melissas/>)

Το φύλο των ατόμων στην κοινωνία των μελισσών εξαρτάται από τη γονιμοποίηση ή μη των ωαρίων της βασίλισσας. Ο κηφήνας προκύπτει από αυγό που δεν έχει γονιμοποιηθεί, ενώ η εργάτρια και η βασίλισσα από γονιμοποιημένα αυγά. Ο ιδιαίτερος τρόπος φυλοπροσδιορισμού των μελισσών ανακαλύφθηκε από τον Johann Dzierzon το έτος 1845, ο οποίος διαπίστωσε πως οι ασύζευκτες βασίλισσες παράγουν μόνο αρσενικούς απογόνους (κηφήνες), ενώ οι συζευγμένες θηλυκούς και αρσενικούς απογόνους (Σκαπέτας, 2019). Επιπλέον στην κοινωνία των μελισσών παρατηρείται το φαινόμενο της διαφοροποίησης τη κάστας. Με βάση το κελί όπου εναποτίθεται το γονιμοποιημένο αυγό (εργατικό ή βασιλικό) και το είδος της διατροφής της προνύμφης (μέλι, γύρη και βασιλικό πολτό ή αποκλειστικά βασιλικό πολτό) προκύπτει εργάτρια ή βασίλισσα.

2.2. Βασίλισσα

Η βασίλισσα προέχεται από γονιμοποιημένο αυγό που αναπτύσσεται σε βασιλικό κελί. Είναι το μόνο θηλυκό άτομο με πλήρως αναπτυγμένο αναπαραγωγικό σύστημα, το οποίο αποτελείται από δύο μεγάλες ωοθήκες, δύο πλευρικούς ωαγωγούς, τον κοινό ωαγωγό, την σπερματοθήκη, τον αγωγό της σπερματοθήκης και τον κόλπο. Η κάθε ωοθήκη αποτελείται από 150 με 180 ωοφόρους σωλήνες (οβαλιόρες), οι οποίες συνενώνονται και σχηματίζουν τους πλευρικούς ωαγωγούς. Επίσης, οι ωαγωγοί από κάθε ωοθήκη συνενώνονται και σχηματίζουν τον κοινό ωαγωγό. Τα αυγά, που βρίσκονται στις ωοθήκες, μέσω του ανωτέρω δικτύου καταλήγουν στη σπερματοθήκη. Η σπερματοθήκη έχει σφαιρικό σχήμα, είναι τοποθετημένη πάνω από τον κόλπο και τον κοινό ωαγωγό και φέρει ένα ζεύγος ομώνυμων αδένων, δηλαδή τον αδένα της σπερματοθήκης

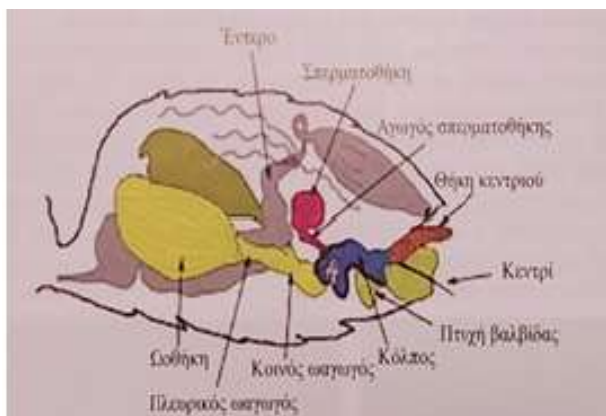
(Σκαπέτας, 2019, εικόνα 6). Ο βασικός ρόλος της αφορά στην αποθήκευση και επιβίωση των σπερματοζωαρίων για μεγάλο χρονικό διάστημα (2 με 5 χρόνια) και τούτο διασφαλίζεται από το έκκριμα του αδένου της σπερματοθήκης, που είναι εμπλουτισμένο με πρωτεΐνες και διάφορα άλλα στοιχεία και συμβάλλει στην μακρόχρονη επιβίωση των σπερματοζωαρίων. Ο κόλπος συνδέεται με τη σπερματοθήκη μέσω του αγωγού της σπερματοθήκης απ' όπου διέρχονται τα αυγά πριν την εναπόθεσή τους στο κελί.

Η βασίλισσα ωριμάζει σεξουαλικά την 5^η έως την 15^η ημέρα μετά την έξοδό της από το κελί, συζευγνύεται με κηφήνες, ωοτοκεί γονιμοποιημένα ή μη αυγά και τελικά προκύπτουν όλα τα άτομα της κυψέλης. Συνεπώς, ο ρόλος της βασίλισσας σε μία κυψέλη είναι καθοριστικός για τη διαίωσιση του είδους και τη γενετική βελτίωση του σμήνους.

Η νεαρή αγονιμοποίητη βασίλισσα πραγματοποιεί γαμήλιες πτήσεις και συνευρίσκεται με κηφήνες εφόσον επικρατούν ευνοϊκές καιρικές συνθήκες. Σε αντίθετη περίπτωση ή απουσία κηφήνων, η νεαρή βασίλισσα απολύει την αναπαραγωγική ικανότητά της και μετατρέπεται σε αρρενοτόκο, δηλαδή γεννά μόνο αγονιμοποίητα αυγά. Μία με τρεις ημέρες μετά το τελευταίο γαμήλιο ταξίδι, ξεκινά η ωοτοκία της βασίλισσας (Υφαντίδης, 1997). Το σπέρμα αποθηκεύεται εφ' όρου ζωής στο σώμα της (σπερματοθήκη), γεγονός που εξηγεί γιατί μία νεαρή βασίλισσα μπορεί να γεννήσει μεγαλύτερο αριθμό γονιμοποιημένων αυγών από μια μεγαλύτερης ηλικίας. Η γονιμότητα της βασίλισσας εξαρτάται, μεταξύ των άλλων, από την ηλικία, την κληρονομικότητα, τις καιρικές συνθήκες, τη μελιτοφορία, τη διαθεσιμότητα σε κηρύθρες, τον αριθμό και την ηλικία των μελισσών της κυψέλης (Χαριζάνης, 1993).

Η περίοδος ωοτοκίας ξεκινά συνήθως από το τέλος του χειμώνα ή τις αρχές της άνοιξης και ολοκληρώνεται νωρίς ή αργά το φθινόπωρο ανάλογα με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος που επικρατεί στην εκάστοτε περιοχή. Η βασίλισσα μπορεί να γεννήσει ημερησίως έως 1.500-2.000 αυγά. Αφού επιθεωρήσει το κελί, επιλέγει εάν θα εναποθέσει γονιμοποιημένο ή αγονιμοποίητο αυγό. Πιθανολογείται πως αυτή η διαφοροποίηση καθορίζεται από το μέγεθος και τη διάμετρο του κελιού. Ωστόσο, δεν είναι πλήρως κατανοητός ο μηχανισμός αυτής της ιδιαίτερης συμπεριφοράς. Αξίζει να σημειωθεί πως η κατ' εξαίρεση εκτροφή κηφήνων σε εργατικά κελιά είναι μία πιθανή συνθήκη, η οποία, όμως, έχει αρνητικό αντίκτυπο στο μέγεθος του σώματός τους και στη διαδικασία της σπερματογένεσης (Υφαντίδης, 1995). Πρακτικά, η ωοτοκία της βασίλισσας θεωρείται επιτυχής όταν σε κάθε πλευρά του πλαισίου διαπιστώνονται κελιά με συμπαγή γόνο. Ειδικά για τα βασιλικά κελιά, υπό φυσικές συνθήκες οι λόγοι της εκτροφής τους είναι

οι εξής: 1) η ξαφνική απώλεια της βασίλισσας (βασιλικά κελιά διάσωσης), 2) η γερασμένη ή με ελαττώματα βασίλισσα (βασιλικά κελιά αντικατάστασης) και 3) η σμηνοουργία (βασιλικά κελιά σμηνοουργίας) (Λούκα Αγγ. Σάντα, 1994).



Εικόνα 6. Αναπαραγωγικό σύστημα βασίλισσας.

Πηγή: (Σκαπέτας 2019).

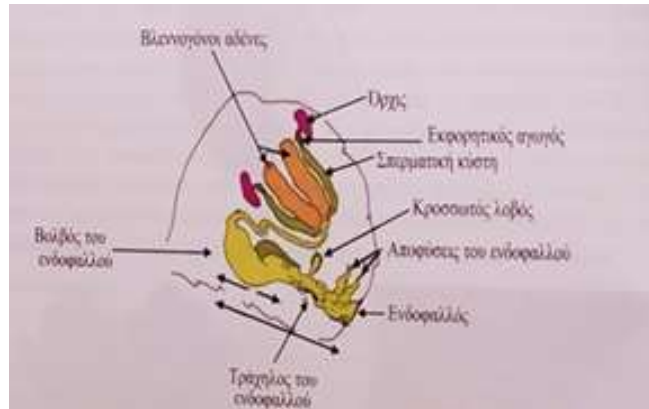
2.5. Κηφήνας

Ο κηφήνας είναι το αρσενικό άτομο της κυψέλης με πλήρως ανεπτυγμένο γενετικό σύστημα. Το γενετικό σύστημά του αποτελείται από δύο όρχεις, δύο εκφορητικούς αγωγούς, δύο σπερματικές ή σπερματοφόρες κύστες, δύο βλεννογόνους αδένες, τον εκσπερματικό αγωγό και τον ενδοφαλλό, που είναι το όργανο της σύζευξης, (εικόνα 2.3). Οι δύο όρχεις είναι πλήρως αναπτυγμένοι πριν από την εκκόλαση του κηφήνα, βρίσκονται εντός της κοιλιακής κοιλότητας και καλύπτονται από μία μεμβράνη. Κάθε όρχις, αποτελείται από σωληνάρια όπου τελείται η σπερματογένεση (Χαριζάνης, 1993). Τα σπερματοζωάρια μέσω των εκφορητικών αγωγών μεταφέρονται στις σπερματικές ή σπερματοφόρες κύστες, όπου το έκκριμα των βλεννογόνων αδένων διασφαλίζει την επιβίωση τους. Η εν λόγω βλέννη παράγεται και εκκρίνεται από τους βλεννογόνους αδένες των σεξουαλικά ώριμων κηφήνων. Τελικά το εκσπερμάτισμα εναποτίθενται μέσω του ενδοφαλλού στον κόλπο της νεαρής βασίλισσας κατά τη σύζευξη (Σκαπέτας, 2019). Κατά την φάση της εκσπερμάτισης πρώτες αδειάζουν οι σπερματικές κύστες και έπειτα οι βλεννογόνοι αδένες. Συνεπώς, εξέρχεται πρώτα η κρεμώδης-κολλώδης φάση που περιέχει τα σπερματοζωάρια και ακολουθεί η παχύρρευστη λευκή βλέννη. Το ποσοστό του σπέρματος και της βλέννης ποικίλει. Κατά τη σύζευξη, το εκσπερμάτισμα διαμέσου του εκφορητικού σπερματοαγωγού προωθείται στο βολβό του φαλλού. Είναι

σημαντικό να αναφέρουμε, ότι με την πάροδο της ηλικίας το σπέρμα του κηφήνα αποκτά μία σκουρόχρωμη απόχρωση καθώς παύει η έκκριση της βλέννης.

Ο κηφήνας ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα άτομα. Συγκεκριμένα, το σώμα του έχει μεγαλύτερο μέγεθος και είναι μακρύτερο σε σύγκριση με της εργάτριας ή κοντότερο και χονδρότερο από εκείνο της βασίλισσας. Επιπλέον διαφορές αφορούν στα φτερά, που είναι μακρύτερα από εκείνα της εργάτριας, στους μεγαλύτερους σύνθετους οφθαλμούς (συναντώνται στην κορυφή της κεφαλής), στην ιδιαίτερα αναπτυγμένη αίσθηση όσφρησης, στην απουσία κεντριού, κηρογόνων και υποφαρυγγικών αδένων και στη μικρότερη προβοσκίδα (ανικανότητα συλλογής νέκταρος).

Ο αριθμός του πληθυσμού των κηφήνων σ' ένα μελίσσι κυμαίνεται μεταξύ 2.000-6.000 τον χρόνο. Ωστόσο, ο αριθμός αυτός εξαρτάται από την δυναμικότητα του μελισσοσμίνους, την φυλή, την ηλικία της βασίλισσας και της κατάστασης των κηρηθρών (Λούκα Αγγ. Σάντα, 1994). Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί πως σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές οι κηφήνες που προκύπτουν από αρρενοτοκία παρουσιάζουν μειωμένη γονιμότητα (Σκαπέτας, 2019). Η διατροφή ενός κηφήνα κατά τις πρώτες ημέρες της ζωής του εξαρτάται από τις παραμάνες, οι οποίες τον φροντίζουν. Η ποιότητα της τροφής το εν λόγω διάστημα, και συγκεκριμένα η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, είναι καθοριστική για την μακροζωία και την ικανότητα σύζευξής του (Χαριζάνης, 1993). Ο κηφήνας ωριμάζει αναπαραγωγικά γύρω στη 10^η-12^η ημέρα μετά από την έξοδό του από το κελί και στη συνέχεια ξεκινά πτήσεις προσανατολισμού με αυξανόμενη διάρκεια με το πέρας των ημερών. Οι κηφήνες εντοπίζουν την αγονιμοποίητη βασίλισσα, γιατί ελκύονται απ' την μοναδική οσμή που φέρει (φερομόνη). Προκειμένου για τη σύζευξη μαζί της, επιλέγουν συγκεκριμένες περιοχές, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως περιοχές συγκέντρωσης των κηφήνων και είναι συνήθως ανοιχτοί χώροι χωρίς εμπόδια (δέντρα, κτίρια κ.λπ.). Έχει διαπιστωθεί πως οι πληθυσμοί κηφήνων συγκεντρώνονται κάθε χρόνο στην ίδια περιοχή συγκέντρωσης με κριτήρια που αφορούν κυρίως στην κατανομή του φωτός (Σκαπέτας, 2019). Το γεγονός τούτο δεν είναι απόλυτο και δεν αποκλείεται η πιθανότητα επιλογής διαφορετικής περιοχής πτήσης.



Εικόνα 2.3. Αναπαραγωγικό σύστημα κηφήνα.

Πηγή: (Σκαπέτας 2019)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΦΥΣΙΚΗ ΣΥΖΕΥΞΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΤΗ ΣΠΕΡΜΑΤΕΓΧΥΣΗ

3.1. Διαδικασία φυσικής σύζευξης

Η περίοδος πτήσης ορίζεται χρονικά από τον Απρίλιο-Μάιο έως τον Σεπτέμβριο, ενώ τον Ιούνιο έχουν παρατηρηθεί μεγαλύτερης συχνότητας πτήσεις σε σύγκριση με άλλους μήνες. Οι πτήσεις διαρκούν συνήθως 30 λεπτά και πραγματοποιούνται κατά τις απογευματινές ώρες ημερών με υψηλή θερμοκρασία, ηλιοφάνεια και αέρα χαμηλής ταχύτητας στις περιοχές συγκέντρωσης των κηφήνων. Το ύψος πτήσης εξαρτάται από τον άνεμο (χαμηλές πτήσεις σε περίπτωση δυνατών ανέμων). Έχει παρατηρηθεί πως το μέγιστο ύψος μπορεί να ανέλθει στα 50 m.

Ο κηφήνας και η αγωνιμοποίητη βασίλισσα, πραγματοποιούν πριν το γαμήλιο ταξίδι μία ή περισσότερες πτήσεις αναγνώρισης (πτήσεις προσανατολισμού) διάρκειας λίγων λεπτών σε απόσταση που κυμαίνεται από 3 έως 16 Km. Πριν από το ταξίδι της σύζευξης, που είναι συνήθως παραπάνω του ενός, οι εργάτριες εμφανίζουν νευρικότητα στις κινήσεις τους και ωθούν την βασίλισσα προς την έξοδο. Η ενέργεια τούτη σταματά αμέσως, όταν η βασίλισσα φτάσει στην είσοδο της κυψέλης. Μία ομάδα εργατριών εκθέτει τον οσμητικό αδένα Nasapon και μαρκάρει την είσοδο της κυψέλης (Σκαπέτας, 2019). Εφόσον η βασίλισσα δεν κάνει κάποια προσπάθεια να πετάξει, οι εργάτριες δεν της επιτρέπουν την είσοδο στην κυψέλη και συνεχίζουν να την εξαναγκάζουν σε πτήση. Η φυσική επιλογή των κηφήνων κατά τη διάρκεια των γαμήλιων πτήσεων εξασφαλίζει

σε σημαντικό βαθμό την επιτυχία της γονιμοποίησης και την αποφυγή της αιμομιξίας (Λούκα Αγγ. Σάντα, 1994).

Τα προηγούμενα χρόνια κυριαρχούσε η άποψη πως πραγματοποιείται μόνο μία σύζευξη. Ωστόσο, νεότερα δεδομένα επισημαίνουν πως πραγματοποιούνται πολλές συζεύξεις με 10 έως και 20 κηφήνες στην διάρκεια ενός ταξιδιού, γεγονός που προκαλεί έντονο ανταγωνισμό μεταξύ των αρσενικών. Όσον αφορά στον κηφήνα, πρέπει να είναι εξαιρετικά ικανός στις πτήσεις του για να μπορέσει να συζευχθεί με μία νέα βασίλισσα, να βρίσκεται σε πολύ καλή θρεπτική κατάσταση και να είναι καλά ανεπτυγμένος. Βασικότερο όλων, είναι η καλή ποιότητα σπέρματος, με υψηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων και καλή γονιμοποιητική ικανότητα, γιατί ένα μέρος αυτών θα παραμείνει στην σπερματοθήκη καθ' όλη τη διάρκεια ζωής της βασίλισσας. Ο όγκος του εκσπερματίσματος του κηφήνα κυμαίνεται μεταξύ 1,5-1,7 mm³ και η συγκέντρωσή του 11-16 εκατομμύρια σπερματοζωάρια. Ωστόσο, το μεγαλύτερο μέρος του σπέρματος (περίπου 90%) χάνεται κατά την σύζευξη (Σκαπέτας, 2019). Συγκεκριμένα, στην βασίλισσα του είδους *Apis Melifera*, *Apis cerana* και *Apis dorsata* καταλήγουν στους ωαγωγούς από 87 έως 200 εκατομμύρια σπερματοζωάρια (Χαριζάνης, 1993), ενώ τελικά αποθηκεύονται στην σπερματοθήκη μέχρι 7 εκατομμύρια (τα υπόλοιπα αποβάλλονται από το γενετικό της σύστημα).

Κατά την διαδικασία της σύζευξης ο κηφήνας εντοπίζει την βασίλισσα, την πλησιάζει και απευθείας τοποθετεί τα άκρα του στον θώρακα της. Έπειτα, εισάγει τον ενδοφαλλό στο γενετικό της άνοιγμα (κόλπος), γίνεται αναστροφή του γενετικού συστήματός του, ενώ η βασίλισσα με την βοήθεια ισχυρής σύσπασης των κοιλιακών μυών συμβάλλει στην πλήρη αναστροφή του. Στο σημείο αυτό το γενετικό υλικό του κηφήνα εισχωρεί στο κόλπο της και εντός 40 ωρών αφικνείται στην σπερματοθήκη. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας, ο κηφήνας παραμένει αγκιστρωμένος στη βασίλισσα για σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ στη συνέχεια απομακρύνεται, τα γενετικά του όργανα παραμένουν πάνω στο σώμα της (σημάδι ζευγαρώματος) και τελικά, καταλήγει. Η παραμονή των γενετικών του οργάνων δεν αποτελεί εμπόδιο για την σύζευξή με επόμενο κηφήνα. Ειδικά η παραγόμενη βλέννα και η κολλώδης επένδυση τους, που αντανακλούν το υπεριώδες φως, προσελκύουν μεγάλο αριθμό κηφήνων (Σκαπέτας, 2019). Σε επόμενη σύζευξη, αφαιρείται απ' τον κηφήνα το όργανο του προηγούμενου και συνεχίζεται η διαδικασία. Στην περίπτωση που το γενετικό σύστημα του αρσενικού

παραμένει στο γενετικό της άνοιγμα, τότε διακόπτονται οι συζεύξεις και η βασίλισσα επιστρέφει στην κυψέλη όπου οι εργάτριες αναλαμβάνουν την αποκόλλησή του.

3.2. Τεχνητή σπερματέγχυση (Τ.Σ.)

3.2.1. Εισαγωγή στην τεχνητή σπερματέγχυση και ιστορικά στοιχεία

Η τεχνητή σπερματέγχυση (Τ.Σ.) είναι μία τεχνική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με στόχο τη γενετική βελτίωση. Ειδικά για την εφαρμογή της στις μέλισσες, επιδιώκεται η επιτυχία της γονιμοποίησης ανεξαρτήτως αντίξοων παραγόντων, όπως οι δυσμενείς κλιματικές συνθήκες, η μη διαθεσιμότητα τροφής, οι προσβολή από παθογόνους παράγοντες κ.λπ. Η Τ.Σ. με τη χρήση εξοπλισμού είναι μια εξαιρετικά πετυχημένη μέθοδος στην εποχή μας. Ωστόσο, η απαιτούμενη εκπαίδευση προσωπικού και η χρήση εξοπλισμού υψηλού κόστους περιορίζει την ευρεία εφαρμογή της στην πράξη από μελισσοπαραγωγούς. Προς αυτή τη κατεύθυνση, σύγχρονα ερευνητικά κέντρα ή εκπαιδευμένο προσωπικό θα μπορούσαν να συνδράμουν στη διάδοση της με την παροχή τεχνογνωσίας ή συνεργασιών σε εμπορικό επίπεδο.

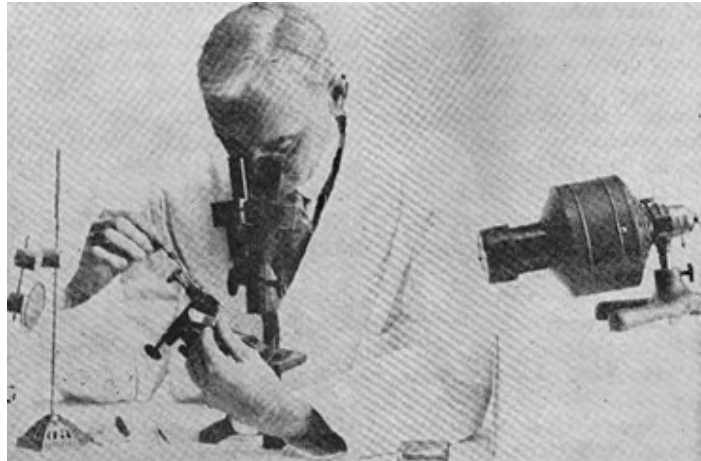
Η ανάγκη για τον έλεγχο του ζευγαρώματος των βασιλισσών αναδύθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής στις αρχές του 1860, εξαιτίας ενός προβλήματος αναφορικά με την φυλή των αποκαλούμενων μαύρων μελισσών (*Apis mellifera mellifera*), οι οποίες μεταφέρθηκαν απ' την Ευρώπη στις ΗΠΑ με τους πρώτους αποίκους (Laidlaw, Harry H, 1987). Το 1860 εγκαταστάθηκε στις ΗΠΑ και μια νέα φυλή ιταλικών βασιλισσών. Οι αγονιμοποίητες κόρες τους συζεύχθηκαν με άγριους κηφήνες της μαύρης φυλής και με μαύρους κηφήνες εγχώριων αποικιών. Οι μέλισσες που προέκυψαν εμφάνισαν ανεπιθύμητα στοιχεία της μαύρης φυλής (Laidlaw, Harry H, 1987). Η ανάγκη των μελισσοκόμων να διατηρήσουν την ιταλική φυλή τους οδήγησε στη λογική των ελεγχόμενων συζεύξεων. Το ενδιαφέρον τους επικεντρώθηκε σε τρεις βασικές μεθόδους:

- (α) στον περιορισμό βασιλισσών και κηφήνων,
- (β) στον περιορισμό των βασιλισσών και στην πτήση των κηφήνων σε διαφορετικές ώρες από τις κανονικές ή σε συγκεκριμένες περιοχές και
- (γ) κάποια μέθοδος τεχνητής σπερματέγχυσης χωρίς τη χρήση εξοπλισμού.

Οι πρώτες προσπάθειες εφαρμογής Τ.Σ. σε βασίλισσες μέλισσες χρονολογούνται το έτος 1788-1791, όταν ο Huber εισήγαγε σπέρμα στον κόλπο της βασίλισσας μ' ένα

εργαλείο, παρόμοιο με μολύβι που κατέληγε σε άκρο με τρίχες (Woyke, 1976). Ακολούθησαν ο Wankler, (1883) και ο McLain, (1886), οι οποίοι χρησιμοποίησαν σύριγγα για την εισαγωγή του σπέρματος (Woyke, 1976). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ξύλινη κατασκευή συγκράτησης της βασίλισσας, η οποία κατασκευάστηκε από τον McLain και η ακινητοποίησή της επέτρεπε το τελικό τμήμα της κοιλιάς της να παραμένει εκτεθειμένο ώστε να είναι εφικτή η εισαγωγή του σπέρματος στο γενετικό σύστημα. Ωστόσο, η πρώτη επιτυχημένη προσπάθεια Τ.Σ. πραγματοποιήθηκε το 1927 από τον Watson, ο οποίος με τη χρήση μικροσύριγγας και μικροχειριστηρίου (εικόνα 2.4) ακινητοποίησε τη βασίλισσα σε μία ξύλινη κατασκευή και εισήγαγε το σπέρμα στον κόλπο μετά από διάνοιξή του. Την δεκαετία του 1930 ο Nolan και ο Laidlaw κατασκεύασαν μία νέα συσκευή όπου τα εξαρτήματα όπως ο συγκρατητήρας της βασίλισσας, το μικροχειριστήριο της σύριγγας και η συσκευή ανοίγματος του κόλπου τοποθετήθηκαν πάνω σε ξύλινη βάση σχηματίζοντας ένα όργανο Τ.Σ..

Οι Mackensen and Roberis 1948 κάνοντας κάποιες αλλαγές στη συσκευή του Nolan πέτυχαν καλύτερα αποτελέσματα από κάθε προσπάθεια των προηγούμενων ετών. Συγκεκριμένα, για τη διάνοιξη του κόλπου χρησιμοποιούνταν δύο λαβίδες οι οποίες ήταν συνδεδεμένες σε δύο αναρτήσεις. Πάνω στην συσκευή αυτή προσαρμόστηκε ο σωλήνας αναισθητοποίησης της βασίλισσας με χρήση του CO₂ το οποίο διαπίστωσαν ότι βοηθούσε στην διέγερση της βασίλισσας για την έναρξη της ωοτοκίας. Επίσης, ο Mackensen 1948 σχεδίασε ένα νέο διάφραγμα στη σύριγγα. Ο Laidlaw, το 1948 σχεδίασε μια νέα συσκευή στην οποία όλες οι κινήσεις ελέγχονται με ειδικές χειρολαβές και προσφέρουν ακρίβεια στις κινήσεις (εικόνα 2.5), ενώ ο ίδιος το 1930 χρησιμοποίησε το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) ως αναισθητικό (Laidlaw, Harry H, 1987). Τέλος, ο Vesely το 1960 άλλαξε την μορφή της σύριγγας και ο Rutner το 1964 τη συσκευή συγκράτησης της βασίλισσας. Το κύριο μοντέλο της συσκευής τεχνητής γονιμοποίησης παρουσίασε αρκετές αλλαγές από την αρχική εκδοχή του Mackensen-Roberts.



Εικόνα 2.4. Dr. L.R Watson. Τεχνητή γονιμοποίηση σε βασίλισσές (1927).

Πηγή: (https://www.researchgate.net/publication/257297540_HISTORY_OF_ARTIFICIAL_INSEMINATION)



Εικόνα 2.5. Η Laidlaw συσκευή Τ.Σ.

Πηγή: (<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.1987.11098916>)

3.2.2. Συλλογή σπέρματος κηφήνα

Το σπέρμα συλλέγεται άμεσα από 10-12 κηφίνες, 12 ημέρες περίπου μετά την έξοδο τους από τα κελιά, όταν είναι αναπαραγωγικά ώριμοι. Οι ώριμοι κηφίνες συλλαμβάνονται μία μέρα πριν ή την ημέρα της σπερματέγχυσης σε συγκεκριμένες ώρες της ημέρας, κυρίως μεταξύ 12.00-16.00. Η συλλογή του σπέρματος στον κηφήνα είναι μία κοπιώδης διαδικασία και απαιτείται επαρκής εκπαίδευση και εξάσκηση για την

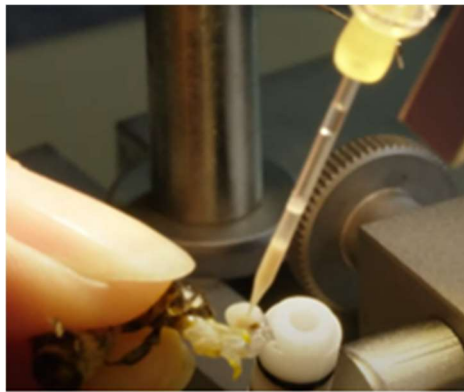
επιτυχία της. Πιθανά προβλήματα στην πράξη μπορεί να προκύψουν λόγω: 1) μειωμένης παραγωγής σπέρματος σε όγκο ή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, π.χ. εξαιτίας αναπαραγωγικής ανωριμότητας των κηφήνων, ασπερμία κ.λπ., 2) μη σωστών χειρισμών από τον σπερματολήπτη που καταλήγουν σε τραυματισμό του γεννητικού συστήματος ή/και απώλεια σπέρματος. Γενικά, η αναμενόμενη απόδοση είναι περίπου 1 μl σπέρματος ανά κηφήνα, ενώ ο όγκος της δόσης Τ.Σ. ανά βασίλισσα είναι περίπου 8-12 μl σπέρματος. Συνεπώς, απαιτείται μέριμνα ώστε ο αριθμός των διαθέσιμων κηφήνων να είναι διπλάσιος σε σχέση με την προαναφερθείσα αναλογία εκσπερματίσματα/βασίλισσα. Εκσπερματίσματα με όγκο μικρότερου του 1μl εξαιρούνται της περαιτέρω επεξεργασίας.

Η συλλογή του σπέρματος πραγματοποιείται κυρίως με την μέθοδο της αναστροφής του γεννητικού συστήματος όπου ασκείται πίεση από τα δάχτυλα του σπερματολήπτη στα κοιλιακά τοιχώματα του κηφήνα. Η διαδικασία της συλλογής πραγματοποιείται υπό μικροσκοπική παρατήρηση και διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα. Η κοιλιά ενός ανώριμου αναπαραγωγικά κηφήνα είναι μαλακή, ενώ του ώριμου σκληρή. Αρχικά, ο κηφήνας τοποθετείται σε στάση με την κοιλιά του να βρίσκεται προς τα κάτω με στόχο αφενός την ευκολία χειρισμών στο μικροσκόπιο και αφετέρου την αποφυγή επιμόλυνσης του σπέρματος μέσω επαφής τους ενδοφαλλού με τα δάχτυλα του χεριού του χειριστή ή το ίδιο το σώμα του κηφήνα (εικόνα 2.6). Στη συνέχεια, επιδιώκεται η μερική και έπειτα η πλήρης αναστροφή του ενδοφαλλού (εικόνα 2.7). Πιο αναλυτικά, ο κηφήνας συγκρατείται από το κεφάλι και τον θώρακα, πιέζεται το πρόσθιο τμήμα του τελευταίου με το αριστερό χέρι (κίνηση που επιφέρει την μερική αναστροφή), ενώ το ραχιαίο τμήμα της κοιλίας δέχεται μια συνεχόμενη πίεση από τον αντίχειρα και τον δείκτη του δεξιού χεριού προκαλώντας την πλήρη αναστροφή. Τούτες οι ενέργειες συνήθως προκαλούν τη σύσπαση των κοιλιακών μυών και τελικά την εκσπερμάτιση. Στο στάδιο της μερικής αναστροφής, γίνεται εκτίμηση του χρώματος των αποφύσεων του ενδοφαλλού και η εμφάνιση πορτοκαλοκίτρινης απόχρωσης τους υποδηλώνει την γεννητική ωριμότητα του κηφήνα, ενώ σε απουσία αυτού του χρώματος ή σε περίπτωση αδυναμίας αναστροφής του ενδοφαλλού, ο κηφήνας θεωρείται ανώριμος και απορρίπτεται της διαδικασίας. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, παρατηρείται πως η ζωτικότητα του συλλεγόμενου σπέρματος από τον κηφήνα είναι μειωμένη σε σύγκριση με αυτό που αναρροφήθηκε από το γεννητικό σύστημα βασιλισσών που γονιμοποιήθηκαν με φυσική σύζευξη (Peng και συν., 1992). Ως πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες θεωρούνται

η πίεση που ασκείται κατά την αναστροφή του γεννητικού συστήματος ή αυτή καθ' αυτή η διαδικασία συλλογής σπέρματος με τη χρήση εξοπλισμού (σύριγγα, μικροσωληνάκια).

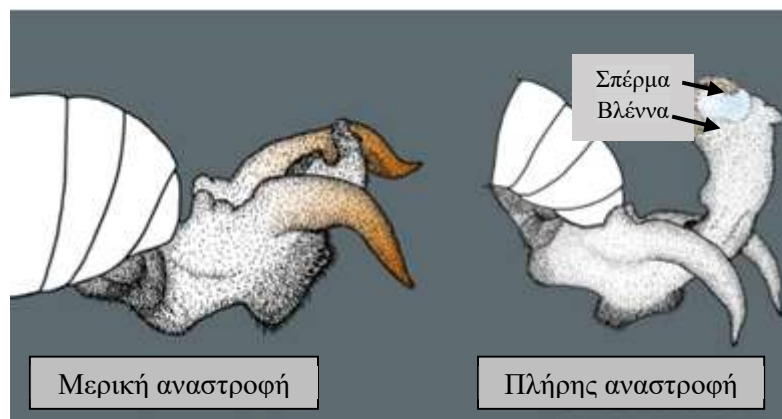
Με τη χρήση μιας ειδικής σύριγγας, στην οποία έχει προσαρμοστεί γυάλινο μικροσωληνάριο συλλογής σπέρματος, δεσμεύονται 2 μl περίπου φυσιολογικού ορού και 0,5 μl αέρα, συλλέγεται το σπέρμα απευθείας από τον ενδοφαλλό με κλίση 45°. Η μικρή ποσότητα φυσιολογικού ορού και αέρα εξυπηρετεί το ξέπλυμα τυχόν υπολειμμάτων σπέρματος από το τοίχωμα της σύριγγας ή το γεννητικό άνοιγμα της βασίλισσας. Το εκσπερμάτισμα νεαρού κηφήνα έχει χρώμα γαλακτώδες και μαρμάρινη κρεμώδη όψη, ενώ ενός μεγαλύτερης ηλικίας σκοτεινότερο χρώμα (εικόνα 2.8). Σχηματίζεται σαν μία κηλίδα στην ακραία μοίρα του ενδοφαλλού που περιβάλλεται από βλέννη. Δεν είναι σπάνια η περίπτωση ασπερματικών δειγμάτων (εικόνα 2.9). Η συλλογή της μικροποσότητας του σπέρματος γίνεται άμεσα για την αποφυγή αφυδάτωσης και επιμόλυνσης του βιολογικού υλικού. Επιπλέον, ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται για την αποφυγή αναρρόφησης αέρα από το λεπτό ακροφύσιο του μικροσωληναρίου. Σύμφωνα με τον ερευνητή Laidlaw (Laidlaw, 1977), στη περίπτωση που σταματήσει η ροή συλλογής του γεννητικού υλικού, θα αφήσουμε μια μικρή ποσότητα σπέρματος (που βρίσκεται στην σύριγγα) να ακουμπήσει το σπέρμα που βρίσκεται στον φαλλό του κηφήνα. Η βλέννη εξαιτίας της παχύρρευστης και κολλώδους σύστασης της συχνά εμποδίζει την συλλογή του σπέρματος και συνεπώς πολλές φορές χρειάζεται ο καθαρισμός του ακροφυσίου με φυσιολογικό ορό. Σε περίπτωση αναρρόφησης της, πραγματοποιούνται διαδοχικές εκπλύσεις του μικροσωληναρίου και ταυτόχρονα γίνεται προσπάθεια απομάκρυνσης της βλέννης από το άκρο της σύριγγας με πιθανή αναρρόφηση φυσιολογικού ορού. Σε περίπτωση αποτυχίας της ανωτέρω διαδικασίας, το άκρο απομακρύνεται και γίνονται εκπλύσεις του με φυσιολογικό ορό. Οι σπερματοληψίες είναι διαδοχικές και τα εκσπερμάτισματα παραμένουν εντός του μικροσωληναρίου έως ότου συλλεχθεί επαρκής ποσότητα σπέρματος (από 10-12 κηφήνες, όπως ήδη έχει αναφερθεί). Συνεπώς, ο όγκος του φυσιολογικού ορού που θα προστεθεί είναι ιδιαίτερα κρίσιμος και απαραίτητος για την αποφυγή υπερ-αραίωσης ή αφυδάτωσης του σπέρματος. Σε περίπτωση μεταγενέστερης χρήσης του σπέρματος, είθισται ο γυάλινος σωλήνας με τα συλλεχθέντα εκσπερμάτισματα να συντηρείται σε θερμοκρασία δωματίου, εφόσον τα άκρα του έχουν σφραγιστεί με βαζελίνη (εικόνα 2.10).

Έχει παρατηρηθεί πως η διαδικασία άσκησης λειτουργεί ευνοϊκά για την επιτυχή συλλογή σπέρματος από τους κηφήνες καθώς βελτιώνεται η αναστροφή του γεννητικού συστήματος και η εκσπερμάτιση. Ενδεικτικά αναφέρονται η συγκράτησή τους από τα πόδια με μία λαβίδα, η παρακίνησή τους για πτήση και η επαναληπτική διαδικασία για 2-3 ημέρες. Στη συνέχεια, επιτρέπεται η πτήση για τους 30-50 κηφήνες που βρίσκονται σε ένα φωτιζόμενο κουτί. Πιθανολογείται πως λόγω της συνεχόμενης άσκησης αυξάνεται ο όγκος της κοιλιάς από τον εγκλωβισμό του αέρα εντός της, συνθήκη που υποβοηθά την σύσπαση των κοιλιακών μυών.



Εικόνα 2.6. Συλλογή σπέρματος κηφήνα.

Πηγή: (<https://www.youtube.com/watch?v=2eN2Ndw8qf0&list=PLzM8RzUfntSH2fIFBs70tRh-rs-V3hmtR&index=5>)



Εικόνα 2.7. Στάδια αναστροφής. Μερική και πλήρη αναστροφή.

Πηγή: (<https://www.youtube.com/watch?v=2eN2Ndw8qf0&list=PLzM8RzUfntSH2fIFBs70tRh-rs-V3hmtR&index=5>)



Εικόνα 2.8. Μερική αναστροφή ενδοφαλλού γεννητικά ώριμου και ανώριμου κηφήνα.

Πηγή: (https://www.youtube.com/watch?v=2eN2Ndw8qf0&list=PLzM8RzUfntSH2fl_FBs70tRhRs-V3hmtR&index=5)



Εικόνα 2.9. Πλήρης αναστροφή ενδοφαλλού γεννητικά ώριμου κηφήνα.

Πηγή: (https://www.youtube.com/watch?v=2eN2Ndw8qf0&list=PLzM8RzUfntSH2fl_FBs70tRhRs-V3hmtR&index=5)



Εικόνα 2.10. Σφράγιση και αποθήκευση του του μικροσωληναρίου συλλογής σπέρματος κηφήνα.

Πηγή: (<https://nebula.wsimg.com/95d14a9147c0c94735b07264de412e9b?AccessKeyId=95EE9AA7688652D2F900&disposition=0&alloworigin=1>)

3.2.3. Αραιώση και συντήρηση του σπέρματος του κηφήνα

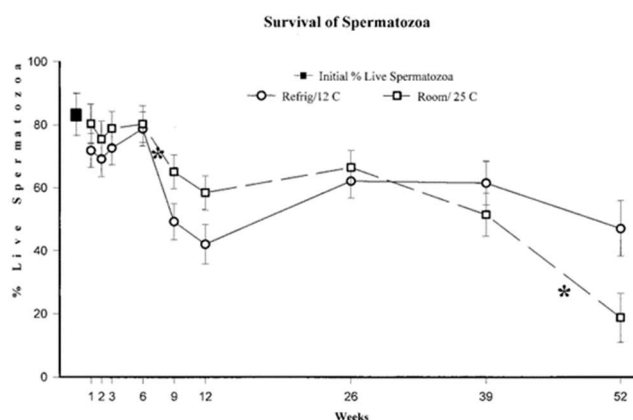
Η αραιώση και συντήρηση του σπέρματος αποτελεί συνήθη τακτική ανεξαρτήτως είδους. Στις μέλισσες, εκτός από την περίπτωση της άμεσης χρήσης νωπού σπέρματος εντός σύντομου χρονικού διαστήματος μετά τη συλλογή του, το σπέρμα αραιώνεται με ειδικά αραιωτικά μέσα που παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των σπερματοζωαρίων και διασφαλίζουν τη χρήση του για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Η αναζήτηση επιλογών αποθήκευσης του σπέρματος κηφήνων παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον λόγω της μείωσης του πληθυσμού των μελισσών που οφείλεται σε ασθένειες (π.χ. βαρρόωση), τοξικώσεις λόγω εντατικής χρήσης φυτοφαρμάκων, έλλειψη τροφής στο οικοσύστημα ως αποτέλεσμα των μονοκαλλιεργειών κ.λπ. Συνεπώς, προς αυτή την κατεύθυνση, η δημιουργία μίας τράπεζας γενετικού υλικού θα συνεισέφερε στη διατήρηση και φύλαξη δόσεων σπέρματος και στη δημιουργία ανθεκτικών φυλών μελισσών σε ασθένειες με τη χρήση γενετικά βελτιωμένου γενετικού υλικού. Σε αυτό το πλαίσιο, η τεχνολογία της κρυοσυντήρησης του σπέρματος θα μπορούσε να συμβάλει τα μέγιστα διασφαλίζοντας την μετακίνηση ανά την υφήλιο δόσεων σπέρματος γενετικά βελτιωμένων κηφήνων.

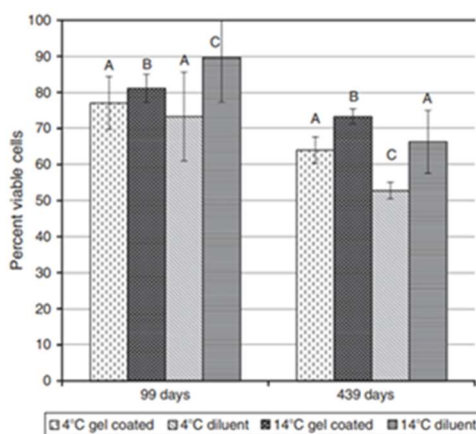
3.2.3.1. Συντήρηση νωπού αραιωμένου σπέρματος

Με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, υπάρχουν διαφορετικά πρωτόκολλα αναφορικά με τη θερμοκρασία και τον χρόνο συντήρησης του αραιωμένου σπέρματος του κηφήνα. Πέραν της χρήσης νωπού μη αραιωμένου σπέρματος, στην πράξη, το αραιωμένο σπέρμα συντηρείται συνήθως σε θερμοκρασία δωματίου 23-25°C για χρονικό διάστημα 1-2 εβδομάδων έως τη χρήση του, ενώ δεν συνιστάται θερμοκρασία συντήρησης άνω των 32°C ή κάτω των 10°C, καθώς παρατηρείται μείωση του αριθμού των ζωντανών σπερματοζωαρίων (Harbo, και J. L. Williams, 1987). Το αραιωμένο σπέρμα που χρησιμοποιείται εντός 24 ή 48 ωρών είθισται να συντηρείται σε θερμοκρασία 30-35°C ή 21°C, αντίστοιχα. Σε σχετική μελέτη (εικόνα 2.11), έχει διαπιστωθεί πως το ποσοστό της ζωτικότητας των σπερματοζωαρίων ανήλθε μεταξύ 70-80% μετά από 6 εβδομάδες συντήρησης του σπέρματος σε θερμοκρασία 12°C ή θερμοκρασία δωματίου (25°C) (Locke και Peng, 1993), ενώ για χρονικό διάστημα συντήρησης 13 εβδομάδων, μεταξύ των υπό διερεύνηση θερμοκρασιών (15°C και 24°C), τα ποιοτικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του σπέρματος παρουσίασαν καλύτερες τιμές κατά τη συντήρηση του σε

θερμοκρασία 15°C (Poole και Taber, 1970). Επιπλέον, η χρήση μικροσωληναρίων με ειδική επίστρωση αντιβιοτικών κατά τη συλλογή του σπέρματος ευνόησε σημαντικά την ποιότητα του αποθηκευμένου σπέρματος (εικόνα 2.12). Συγκεκριμένα, κατά τη συντήρησή του σε θερμοκρασία 14°C για 99 και 439 ημέρες η ζωτικότητα ανήλθε σε ποσοστά άνω του 80% και 70%, για κάθε χρόνο εκτίμησης αντίστοιχα (Hopkins, Brandon K. και συν., 2016).



Εικόνα 2.11. Αποτελέσματα επιβίωσης των σπερματοζωαρίων μετά από την συντήρηση στους 12°C και στους 25°C. Πηγή: (<https://academic.oup.com/jee/article/93/3/568/2217176>)



Εικόνα 2.12. Αποτελέσματα βιωσιμότητας του σπέρματος μετά από συντήρηση για 99 και 439 ημέρες. Πηγή: (<https://academic.oup.com/jee/article/93/3/568/2217176>)

3.2.3.2. Αραιωτικά συντήρησης του νοπού σπέρματος

Τα αραιωτικά συντήρησης είναι υδατικά διαλύματα που διασφαλίζουν τη βιωσιμότητα του σπέρματος για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από τις προδιαγραφές τους. Συμβάλλουν στην μείωση του μεταβολικού ρυθμού των σπερματοζωαρίων και στην

επιμήκυνση της διάρκειας ζωής χωρίς να επηρεάζεται η γονιμοποιητική ικανότητά τους. Τα αραιωτικά συνήθως περιέχουν α) μια πηγή ενέργειας (π.χ. γλυκόζη), β) παράγοντες που ρυθμίζουν το pH (π.χ. Διτανθρακικό νάτριο, Tris κ.λπ.) και την ωσμωτική πίεση (χλωριούχο κάλιο, χλωριούχο νάτριο κ.α.) και γ) αντιβιοτικά για παρεμπόδιση ανάπτυξης μικροοργανισμών (Βενζυλόπενικιλίνη, θειϊκή διυδροστρεπτομικίνη) (Moritz, 1984). Τα ιδιοπαραγόμενα αραιωτικά είθισται να αποστειρώνονται πριν από τη χρήση τους. Μεταξύ αυτών, ενδεικτικά παραδείγματα αραιωτικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή νωπού αραιωμένου σπέρματος κηφήνα είναι: 1) το Tris-buffer (NaCl, glucose, L-arginine-HCl και L-lysine διαλύθηκε σε tris (hydroxy methyl)-amino-methane buffer με pH 8,7), 2) το Hyes (NaCl, CaCl₂, KCl, NaHCO₃ σε απεσταγμένο νερό, με pH 8,5) και 3) το Kiev (trisodium citrate-2-hydrate, D(+) glucose monohydrate, NaHCO₃, sulphanilamide και KCl σε απεσταγμένο νερό, με pH 8,8) (Moritz, 1984).

Αξίζει να αναφερθεί πως το αραιωτικό έχει αρνητική επίδραση στην αναπαραγωγική ικανότητα της βασίλισσας καθώς παρατηρείται καθυστέρηση στην έναρξη της ωοτοκίας και αποθήκευση λιγότερων σπερματοζωαρίων στην σπερματοθήκη (Kaftanoglu και Peng 1980,1982). Για το λόγο αυτό, συνιστάται η απομάκρυνση του αραιωτικού μέσου από το σπέρμα με φυγοκέντρηση πριν τη χρήση του (Wegener και συν., 2014). Ωστόσο, η Τ.Σ. με αραιωμένο σπέρμα σε Tris-buffer, το οποίο δεν φυγοκεντρήθηκε, δεν αποδείχθηκε επιζήμια για την γονιμότητα της βασίλισσας.

3.2.4. Κρυοσυντήρηση του σπέρματος

Η κρυοσυντήρηση είναι μία διαδεδομένη τεχνολογία συντήρησης του σπέρματος σε πολλά είδη. Ωστόσο, δεν αποτελεί μέθοδο επιλογής για τη συντήρηση του σπέρματος του κηφήνα, παρά το γεγονός πως τα τελευταία χρόνια τα πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης έχουν βελτιωθεί. Το βασικό πρόβλημα προκύπτει λόγω της μειωμένης γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων του κηφήνα μετά την αναθέρμανση, όπως προκύπτει από το χαμηλό ποσοστό γονιμοποίησης των βασιλισσών (παραγωγή εργατικού γόνου), παρ' όλο που κατά την εργαστηριακή εξέταση τα ποσοστά της κινητικότητας και της ζωικότητας των σπερματοζωαρίων είναι εντός αποδεκτών ορίων (Peng και συν., 1992, Cobey και συν., 2013). Συγκεκριμένα, οι βασίλισσες που γονιμοποιήθηκαν με νωπό σπέρμα είχαν ποσοστιαία απόδοση σε εργατικό γόνο (γονιμοποιημένα αυγά) άνω του 90%, ενώ με κρυοσυντηρημένο σημειώθηκε ποσοστό κάτω του 50%

και το υπόλοιπο αφορούσε σε απόδοση κηφηνογόνου (μη γονιμοποιημένα αυγά, Kaftanoglu και Peng, 1984, Hopkins και συν., 2012). Αντιθέτως, πιο σύγχρονα ερευνητικά δεδομένα επισημαίνουν την επιτυχή εφαρμογή της Τ.Σ. με κατεψυγμένο σπέρμα καθώς προέκυψαν γόνιμοι θηλυκοί απόγονοι (βασίλισσες) που χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς ως γεννήτορες για την απόκτηση επόμενων γενεών μελισσών (Hopkins και συν., 2012).

Η επιτυχής κρυοσυντήρηση του σπέρματος σχετίζεται με παράγοντες, όπως είναι η αναλογία αραίωσης, η σύνθεση των αραιωτικών μέσων, το είδος και η συγκέντρωση των χρησιμοποιούμενων κρυοπροστατευτικών, ο ρυθμός αραίωσης και κρυοσυντήρησης, οι μέθοδοι κρυοσυντήρησης/αναθέρμανσης και ο ρυθμός της αναθέρμανσης (Johnson και συν., 2000). Κατά την κρυοσυντήρηση προκαλούνται βιοχημικές και λειτουργικές μεταβολές στα σπερματοζωάρια με αποτέλεσμα να υποβαθμίζεται η γονιμοποιητική ικανότητά τους (Leboeuf και συν., 2000). Βασικοί ενοχοποιητικοί παράγοντες για την πρόκληση των ανωτέρω μεταβολών θεωρούνται η καταπληξία του ψύχους, οι δραστηκές μορφές οξυγόνου, οι αλλαγές της ωσμωτικής πίεσης και ο ενδοκυτταρικός σχηματισμός κρυστάλλων ύδατος (Mazur, 1984). Κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης και της αναθέρμανσης, η μεταβολή του όγκου των σπερματοζωαρίων λόγω των διακυμάνσεων της ωσμωτικής πίεσης (Hammerstedt και συν., 1990) σχετίζεται με πρόκληση βλαβών ή απώλειας σπερματοζωαρίων μετά την αναθέρμανση, ενώ εκείνα που παραμένουν αλώβητα έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής (Bailey και συν., 2000). Επιπλέον, δεν είναι σπάνιες οι αλλαγές στην κίνηση τους, η οποία προσομοιάζει με εκείνη των ενεργοποιημένων σπερματοζωαρίων (Watson, 1995) με συνέπεια την υποβάθμιση της γονιμότητας του κρυοσυντηρημένου/αναθερμασμένου σπέρματος (Green και Watson, 2001).

Σε τεχνικό επίπεδο, τα στάδια της κρυοσυντήρησης του σπέρματος περιλαμβάνουν την αραίωση του εκσπερματίσματος, την μείωση της θερμοκρασίας του, την προσθήκη του αραιωτικού κρυοσυντήρησης το οποίο είναι εμπλουτισμένο με κρυοπροστατευτικές ουσίες, την κατάψυξη, την κρυοσυντήρηση σε θερμοκρασία $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ και τέλος την αναθέρμανσή του πριν τη χρήση του (Hammerstedt και συν., 1990). Αναφορικά με το ρυθμό μείωσης της θερμοκρασίας του σπέρματος, έχει αποδειχθεί πως ο αργός ρυθμός διασφαλίζει τις κατάλληλες συνθήκες για τη διατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του σπέρματος του κηφήνα κατά την αναθέρμανση, σε σύγκριση με πρωτόκολλα υαλοποίησης όπου εφαρμόζεται ταχύς ρυθμός πτώσης της θερμοκρασίας του (Hopkins

and Herr, 2010). Σύμφωνα με τον Harbo (1983), δεν παρατηρείται μείωση της γονιμότητας του κρυοσυντηρημένου σπέρματος του κηφήνα κατά την αποθήκευσή του σε υγρό άζωτο (-196°C) για 11 μήνες. Τα πρωτόκολλα για την αναθέρμανση των κρυοσυντηρημένων δειγμάτων σπέρματος είναι: 1) με θερμό κύμα αέρα θερμοκρασίας 40°C για 7 δευτερόλεπτα ή 2) με εμβάπτιση σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 35°C για 1 λεπτό (Wegener και συν., 2012). Πριν τη χρήση του κρυοσυντηρημένου-αναθερμασμένου σπέρματος του κηφήνα, συνήθης τακτική αποτελεί η φυγοκέντρωση του για την απομάκρυνση των κρυοπροστατευτικών παραγόντων καθώς έχει αποδειχτεί πως επηρεάζουν δυσμενώς την γονιμότητα της βασίλισσας (Hopkins and Herr, 2010).

3.2.4.1. Αραιωτικά κρυοσυντήρησης

Στόχος των αραιωτικών κρυοσυντήρησης είναι η ελαχιστοποίηση των δυσμενών επιδράσεων της εν λόγω τεχνολογίας στα σπερματοζώαρια. Αυτό επιτυγχάνεται με τους κρυοπροστατευτικούς παράγοντες, τις λιποπρωτεΐνες, τους ρυθμιστικούς παράγοντες pH και ωσμωτικής πίεσης και τα αντιβιοτικά που περιέχουν (Johnson και συν., 2000). Πρακτικά, τα αραιωτικά συντήρησης του σπέρματος κηφήνα εμπλουτίζονται με την προσθήκη κρυοπροστατευτικών ουσιών. Οι Kaftanoglu και Peng, (1984) διαπίστωσαν πως η κινητικότητα του κρυοσυντηρημένου σπέρματος μετά την αναθέρμανση είχε διατηρηθεί σε αποδεκτά επίπεδα, όταν για την παρασκευή του αραιωτικού κρυοσυντήρησης χρησιμοποιήθηκε το αραιωτικό συντήρησης Kien εμπλουτισμένο με διμεθυλοσουλφοξείδιο σε συγκέντρωση της τάξης του 10%. Οι κρυοπροστατευτικοί παράγοντες διαχωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, σε αυτούς που διαπερνούν ή δε διαπερνούν τη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στην πρώτη περίπτωση κατατάσσονται τα σάκχαρα, όπως η γλυκόζη, και η δράση τους αφορά στη ρύθμιση της ωσμωτικής πίεσης, στη σταδιακή αφυδάτωση των κυττάρων, στη μείωση του σχηματισμού κρυστάλλων ύδατος ενδοκυτταρικά (Fuller, 2004) και τη σταθεροποίηση της δομής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Aisen και συν., 2002). Η κρυοπροστατευτική δράση των σακχάρων εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή τους με δομικά στοιχεία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (π.χ. φωσφολιπίδια), από το μοριακό βάρος και τη χημική δομή τους (Aisen και συν., 2002). Στη δεύτερη περίπτωση κρυοπροστατευτικών υπάγονται οι ουσίες όπως η γλυκερόλη ή το διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Η δράση τους αφορά στη μείωση του σημείου πήξης του νερού ενδοκυτταρικά, στον περιορισμό του σχηματισμού κρυστάλλων ύδατος εντός του κυττάρου (Corcuera και συν., 2007), αλλά δεν

εμπλέκονται στη σταθεροποίηση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Anchordoguy και συν., 1987). Ωστόσο, η γλυκερόλη παρουσιάζει εν δυνάμει κυτταροτοξική δράση καθώς η χρήση της προκαλεί ωσμωτική καταπόνηση λόγω της χαμηλής διαπερατότητας διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ως συνέπεια του υψηλού μοριακού βάρους της (Guthrie και συν., 2002). Ερευνητικά δεδομένα αποδεικνύουν πως το ποσοστό των ζωντανών σπερματοζωαρίων ήταν υψηλότερο με τη χρήση του διμεθυλοσουλφοξειδίου σε αραιωτικά κρυσυντήρησης παρά της γλυκερόλης (Taylor και συν., 2009).

Ο κρόκος του αυγού θεωρείται βασικό συστατικό των αραιωτικών κρυσυντήρησης καθώς προστατεύει τα σπερματοζωάρια από την καταπληξία του ψύχους και η συγκέντρωσή του ανέρχεται περίπου σε ποσοστό της τάξης του 15% (Wegener και συν., 2012). Η προστατευτική του δράση υπέρ της ακεραιότητας της δομής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης έγκειται στη χοληστερόλη και τα φωσφολιπίδια που περιέχει (Bathgate και συν., 2006). Μειονεκτήματα της χρήσης του αποτελούν τα πιθανά προβλήματα βιοασφάλειας και οι αποκλίσεις της ποιότητάς του (Bousseau και συν., 1998).

Δεδομένης της περιορισμένης ερευνητικής δραστηριότητας στο εν λόγω πεδίο, ελάχιστες νεότερες μελέτες εξέτασαν την πιθανή επίδραση της σύστασης των αραιωτικών κρυσυντήρησης στα ποιοτικά χαρακτηριστικά του σπέρματος κηφήνα μετά την αναθέρμανση, παρά το γεγονός πως η αποτυχία της Τ.Σ. στις μέλισσες σχετίζεται με την υποβαθμισμένη ποιότητα του αναθερμασμένου σπέρματος (Taylor και συν., 2009). Έχει αποδειχθεί πως η Τ.Σ. των βασιλισσών ήταν επιτυχής, εκφραζόμενη ως απόδοση σε εργατικό γόνο, όταν η ζωτικότητα του αναθερμασμένου σπέρματος κηφήνα κυμαινόταν μεταξύ 46-50% (Collins, 2000, 2004). Λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα παραπάνω κρίνεται αναγκαία η περαιτέρω διερεύνησης της τεχνολογίας κρυσυντήρησης του σπέρματος στις μέλισσες (αναλογία αραιώσης, σύσταση αραιωτικών, είδος και συγκέντρωση κρυσυντηρητικών παραγόντων) με στόχο τη βελτίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του σπέρματος κατά την αναθέρμανση και τελικά την ανάδειξη της Τ.Σ. στη σύγχρονη μελισσοκομία ως ένα βασικό εργαλείο για την παραγωγή βιώσιμων και παραγωγικών αποικιών.

3.2.5. Εξοπλισμός για την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης

Η εφαρμογή της Τ.Σ. στις μέλισσες προϋποθέτει τη χρήση ειδικού εξοπλισμού που απαρτίζουν τη συσκευή σπερματέγχυσης. Ιστορικά, οι πρώτες συσκευές που

χρησιμοποιήθηκαν ήταν του τύπου Mackensen-Roberds, Laidlow ή Mackensen (εικόνα 2.13), ενώ οι πιο σύγχρονες εκδοχές είναι οι συσκευές Ruttner-Schneider-Fresnaye, Tryasko, Vesely και Schley (εικόνα 2.14), με την τελευταία, γερμανικής προέλευσης, να αποτελεί την πιο διαδομένη στην πράξη (εικόνα 2.15). Δεδομένου του μικρού αριθμού των ατόμων και τις «λεπτές» κινήσεις που απαιτούνται κατά τους χειρισμούς τους, η χρήση της συσκευής σπερματέγχυσης συνδράμει στην πραγματοποίηση σταθερών κινήσεων και στον πλήρη έλεγχο τους από τον χειριστή, στην ολοκλήρωση της διαδικασίας κατά το δυνατόν συντομότερα (συλλογή και εναπόθεση του σπέρματος) και τελικά στην αποφυγή πιθανού τραυματισμού. Συγκεκριμένα, μία συσκευή σπερματέγχυσης αποτελείται από ένα στερεοσκόπιο, στο οποίο προσαρμόζονται:

-Η θήκη συγκράτησης και αναισθητοποίησης της βασίλισσας (σωλήνας συγκράτησης), όπου τοποθετείται και αναισθητοποιείται η βασίλισσα με διοξείδιο του άνθρακα (CO₂).

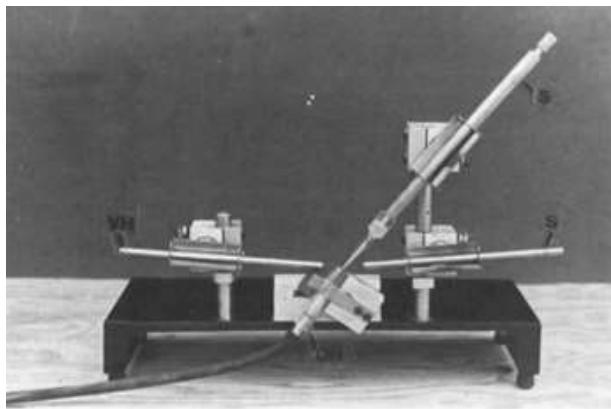
-Η φιάλη παροχής CO₂, που φέρει ρυθμιστή πίεσης (1-2kg/cm²). Το διοξείδιο του άνθρακα διέρχεται πρώτα από ένα δοχείο με νερό, φιλτράρεται και τελικά με ελεγχόμενη ταχύτητα ροής καταλήγει στον σωλήνα συγκράτησης.

-Τα άγκιστρα, τα οποία χρησιμοποιούνται για το άνοιγμα του κοιλιακού θαλάμου και το κοιλικό ραβδί για το παραμερισμό της κοιλικής βαλβίδας. Ο κοιλιακός γάντζος (Vental Hook) τοποθετείται στο αριστερό μέρος και χρησιμεύει για το άνοιγμα του κοιλιακού τοιχώματος έχοντας ρόλο στηρικτικό. Από την άλλη, ο γάντζος κεντριού (Sting Hook) βρίσκεται στα δεξιά και βοηθάει στον παραμερισμό του κεντριού (εικόνα 2.16). Υπάρχουν διάφοροι τύποι αγκίστρων κεντριού (εικόνα 2.17), όπως ο διάτρητος (φέρει οπή διαμέσου της οποίας διέρχεται το κεντρί), ο κλασικός (έχει κωνοειδές σχήμα και εφαρμόζει απόλυτα στην βάση του κεντριού) και το άγκιστρο τσιμπίδα (έχει σχήμα παρόμοιο με τσιμπίδα, συγκρατεί και ανασηκώνει το κεντρί). Τα άγκιστρα (κοιλιακό και κεντριού) εφαρμόζουν ταυτόχρονα στο σώμα της βασίλισσας ή σε περίπτωση δυσκολίας αρχικά τοποθετείται ο κοιλιακός και στη συνέχεια ο γάντζος κεντριού.

- Μία σύριγγα (γυάλινη ή πλαστική) με αποσπώμενη απόληξη για τη συλλογή και μεταφορά του σπέρματος. Ενδεικτικά αναφέρονται ο τύπος Mackensen, Nolan, Laidlaw, Robert, Schley κ.λπ. (εικόνες 2.18, 2.19). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια πιο διαδεδομένη στην πράξη είναι η σύριγγα τύπου Harbo (εικόνες 2.20, 2.21, 2.22), που φέρει το όνομα του σχεδιαστή της και αποτελεί μία καινοτόμο επιλογή, γιατί έχει προσαρμοστεί στο εσωτερικό της γυάλινο μικροσωληνάριο μεγάλης χωρητικότητας. Η χρήση της

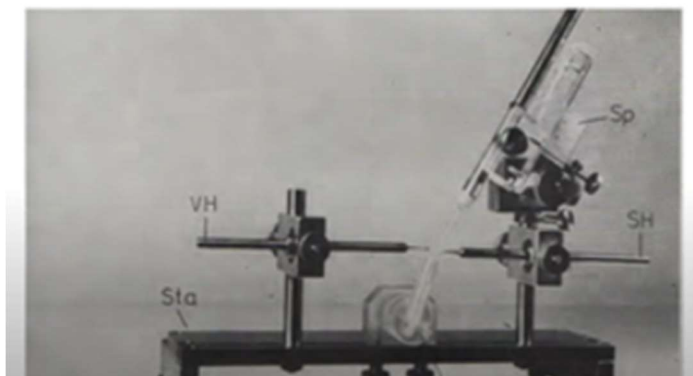
επιτρέπει την αποθήκευση και μεταφορά μεγαλύτερου όγκου σπέρματος σε σύγκριση με τις υπόλοιπες και εν τέλει διευκολύνει την πραγματοποίηση πολλαπλών σπερματεγχύσεων (Cobey Susan W. και συν., 2013).

- Μία φωτεινή πηγή ψυχρού φωτός για την αποφυγή τη θερμότητας. Εκτός των όσων αναφέρονται παραπάνω, χρειάζεται επιπλέον εξοπλισμός και αναλώσιμα, όπως ένας κλίβανος αποστείρωσης, φυσιολογικός ορός, αποστειρωμένα γυάλινα δοχεία, πιπέτες και ρύγχη τους, απεσταγμένο νερό, αιθανόλη 95%, κλωβοί βασιλισσών, κλωβοί κηφήνων και κλουβί πτήσης των κηφήνων.



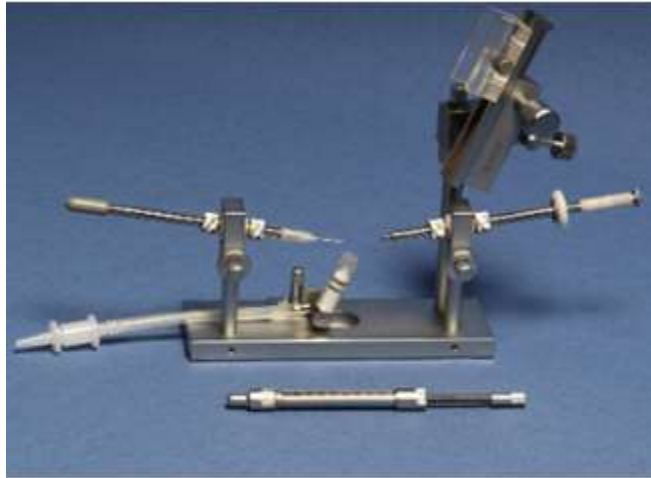
Εικόνα 2.13. Συσκευή σπερματέγχυσης Mackens.

Πηγή: (<https://www.scientificbeekeeping.co.uk/IIHistory.html>)



Εικόνα 2.14. Συσκευή σπερματέγχυσης Schneider - Fresnaye.

Πηγή: (http://www.youtube.com/watch?v=-IrmEEaTxug&list=PLzM8RzUfntSH2fl_FBs70tRhRs-V3hmtR&index=8)



Εικόνα 2.15. Συσκευή σπέρματέγχυσης Schley.

Πηγή: (<https://www.besamungsgeraet.de/en/insemination-instruments/>)



Εικόνα 2.16. Κολπικό ραβδί, κοιλιακό και άγκιστρο κεντρίου.

Πηγή: (Χαριζάνης 1993).



Εικόνα 2.17. Διάτρητος γάντζος (Αριστερά) και Άγκιστρο Τσιμπίδα (Δεξιά).

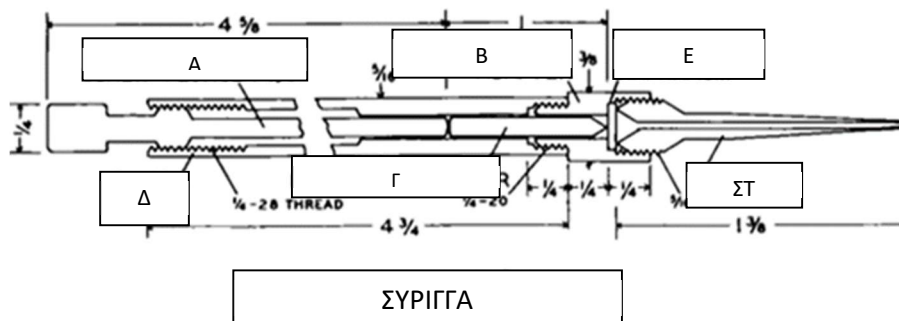
Πηγή: (https://www.youtube.com/watch?v=2eN2Ndw8qf0&list=PLzM8RzUfntSH2fl_FBs70tRhrs-V3hmtR&index=5)

Mackensen



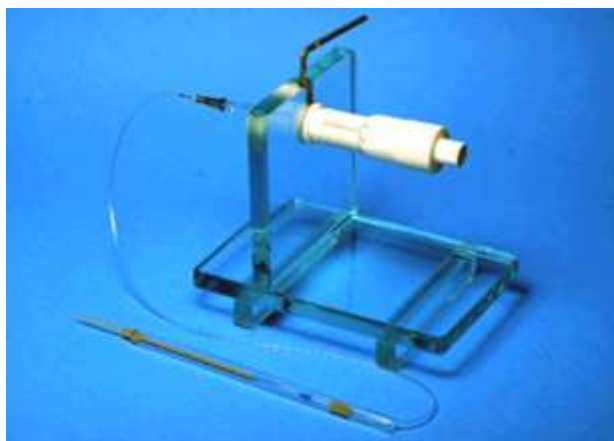
Εικόνα 2.18. Σύριγγα Mackensen με πλαστικό άκρο.

Πηγή: (https://www.youtube.com/watch?v=IrmEEaTxug&list=PLzM8RzUfntSH2fl_FBs70tRhrs-V3hmtR&index=7)



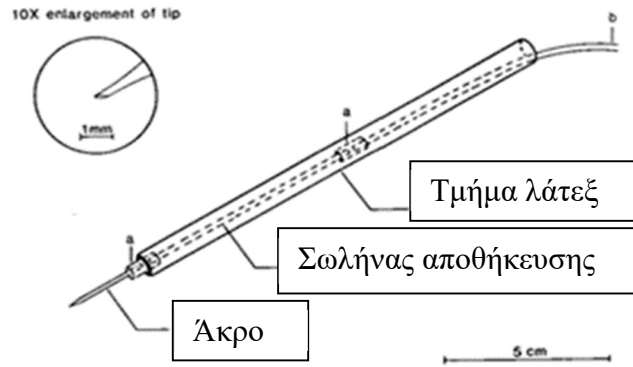
Εικόνα 2.19. Σύριγγα Mackensen από τον Mackensen και τον Tucker, (1970). Μέρη Σύριγγας: Α) Βιδωτό έμβολο Β) Προσαρμογέας Ε) Διάφραγμα Δ) Κάνη Γ) Έμβολο διαφράγματος ΣΤ) Άκρο σύριγγας.

Πηγή: (<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.1987.11098905>)



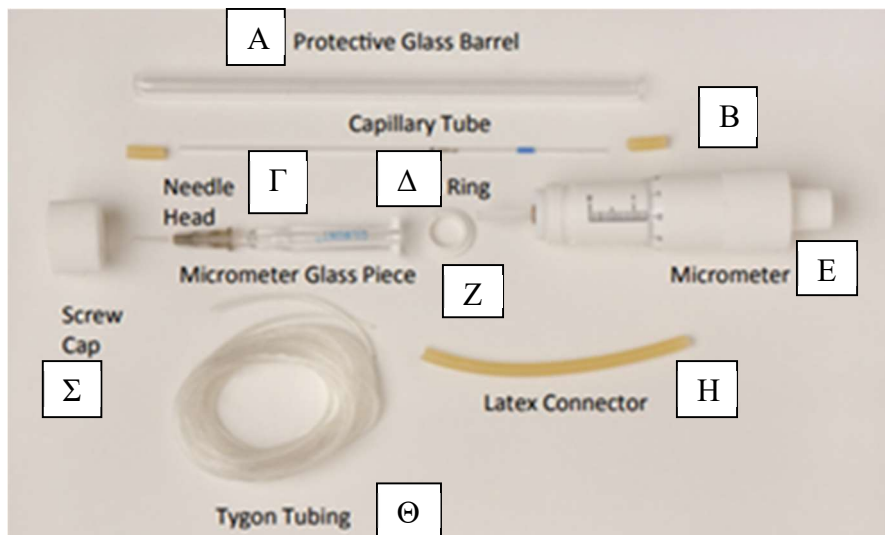
Εικόνα 2.20. Σύριγγα Harbo.

Πηγή: (<https://nebula.wsimg.com/95d14a9147c0c94735b07264de412e9b?AccessKeyId=95EE9AA7688652D2F900&disposition=0&alloworigin=1>)



Εικόνα 2.21. Σύριγγα Harbo (1985).

Πηγή: (<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.1987.11098905>)



Εικόνα 2.22. Τα μέρη της σύριγγας Harbo. Α) Προστατευτική γυάλινη θήκη, Β) Τριχοειδές σωληνάριο, Γ) Κεφαλή βελόνας, Δ) Δακτύλιος, Ε) Μικρόμετρο, ΣΤ) Βιδωτό καπάκι, Ζ) Μικρόμετρο γυάλινο κομμάτι, Η) Σύνδεσμος λάτεξ, Θ) Σωληνάριο Tygon.

Πηγή: (<https://nebula.wsimg.com/95d14a9147c0c94735b07264de412e9b?AccessKeyId=95EE9AA7688652D2F900&disposition=0&alloworigin=1>)

3.2.6. Εκτροφή, προετοιμασία και μεταχείριση βασιλισσών πριν και μετά την τεχνητή σπερματέγχυση

Οι συνθήκες εκτροφής των βασιλισσών που προορίζονται ως γεννήτορες σε προγράμματα τεχνητής σπερματέγχυσης πρέπει να είναι άριστες. Είναι καθοριστικής σημασίας η επιλογή θηλυκών γεννητόρων από ένα δυνατό μελίσσι, με πληθυσμό πολλών νέων

εργατριών, οι οποίες θα φροντίζουν την βασίλισσα ώστε να είναι καλά αναπτυγμένη. Επιπλέον, η συνεχής τροφοδότηση του μελισσιού (γύρη και σιρόπι) συμβάλει τα μέγιστα στη σωστή ανάπτυξη του γεννητικού συστήματος και επηρεάζει ευμενώς τον αριθμό των οβαριολών και την χωρητικότητα της σπερματοθήκης.

Κατά το στάδιο της προετοιμασίας, η υποψήφια προς αναπαραγωγή βασίλισσα απομονώνεται σε κυψελίδιο σύζευξης μετά την εκκόλαψή της και έως την ημέρα της σπερματέγχυσης. Η ενέργεια τούτη πρέπει να γίνεται πριν από τις δέκα το πρωί και μετά τις τέσσερις το μεσημέρι διαφορετικά υπάρχει κίνδυνος διαφυγής της. Σε κάθε περίπτωση το μέγιστο διάστημα παραμονής της υπό αυτές τις συνθήκες δεν πρέπει να είναι άνω των 5 ημέρων, ενώ η σπερματέγχυση πρέπει να πραγματοποιείται μεταξύ 6^{ης}-12^{ης} ημέρας από την εκκόλαψή της. Κατά τη διάρκεια της παραμονής της εντός του κυψελιδίου, στην προσπάθειά της να απελευθερωθεί γίνεται σταδιακά πιο νευρική, πραγματοποιεί έντονες κινήσεις και ασκεί πίεση στο μεταλλικό διάφραγμα που ασφαλίζει την είσοδο του κυψελιδίου με κίνδυνο να τραυματιστεί. Πριν την Τ.Σ. πρέπει να αφηθεί και να πετάξει ελεύθερα για αρκετή ώρα σε κλειστό μέρος για την απομάκρυνση των περιττωμάτων. Σε αντίθετη περίπτωση, το απευθυσμένο θα ασκεί πίεση και θα μετατοπίζει το γενετικό άνοιγμα με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η εισαγωγή του άκρου της σύριγγας και η εναπόθεση του σπέρματος. Μετά την ολοκλήρωση της σπερματέγχυσης, οι γονιμοποιημένες βασίλισσες τοποθετούνται σε κλουβιά με ζαχαροζύμαρο και έπειτα απελευθερώνονται άμεσα στα κυψελίδια με στόχο την αύξηση του αριθμού σπερματοζωαρίων που αποθηκεύονται στην σπερματοθήκη. Θα παραμείνουν στο κυψελίδιο μέχρι την έναρξη της ωοτοκίας.

Γενικά, αποφεύγεται η απευθείας μετακίνηση τους στην κυψέλη λόγω κινδύνου διαφυγής για φυσική σύζευξη. Οι πιθανότητες να συμβεί τούτο είναι αυξημένες όταν εναποτίθεται όγκος σπέρματος μικρότερος από 6-8 μλ. Η ιδανική θερμοκρασία περιβάλλοντος μετά την Τ.Σ. για τη γονιμοποιημένη βασίλισσα είναι 35°C ώστε να είναι επιτυχής η μεταφορά τους σπέρματος στην σπερματοθήκη. Κατά την μεταφορά της στην κυψέλη, σε συνθήκη επιθετικής συμπεριφοράς από τις εργάτριες, η βασίλισσα απομακρύνεται και περιορίζεται σε κλωβό, ώστε να επιτευχθεί η σταδιακή απελευθέρωσή της εντός τριών ή τεσσάρων ημερών. Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι οι βασίλισσες που δεν έχουν γονιμοποιηθεί με φυσικό τρόπο καθυστερούν την έναρξη παραγωγής φερομονών και για το λόγο τούτο είθισται να αντικαθίστανται από τις εργάτριες.

3.2.7. Προετοιμασία των κηφήνων για την τεχνητή σπερματέγχυση

Η προετοιμασία πολλών ώριμων κηφήνων (8 με 10 ημέρες από την έξοδο τους από τα κελιά) για τεχνητή σπερματέγχυση είναι ακόμη πιο δύσκολη σε σύγκριση με εκείνη των βασιλισσών, ειδικά όταν οι καιρικές συνθήκες είναι δυσμενείς. Οι κηφήνες συλλέγονται άμεσα μετά την έξοδο τους από το κελί, φυλάσσονται για κάποιο χρονικό διάστημα εκτός της αποικία τους, απελευθερώνονται σ' ένα ειδικό φωτιζόμενο κουτί και στο τέλος μεταφέρονται σε κυψέλη-τράπεζα κηφήνων με ισάριθμο πληθυσμό εργατριών παραμάνων ώστε να τους φροντίζουν και να διατηρούν τη θερμοκρασία μεταξύ 25°C-30°C. Είναι σημαντικό το μελίσσι εκτροφής κηφήνων να βρίσκεται σε μικρή απόσταση από τον χώρο του μελισσοκομείου όπου πραγματοποιούνται οι σπερματεγχύσεις, διότι οι κηφήνες έχουν έντονη τάση διαφυγής και περιπλάνησης. Για την αποφυγή της ανάμιξης τους με γειτονικά μελίσσια εφαρμόζονται μέθοδοι περιορισμού τους, όπως η τοποθέτηση διαφράγματος στην είσοδο της κυψέλης (απόσταση συρμάτων 5,2 mm ώστε να μην παρεμποδίζεται η είσοδος των εργατριών). Ειδικά η λοξή τοποθέτηση του διαφράγματος αποτρέπει τη συγκέντρωση των κηφήνων στην είσοδο, επειδή η ορατότητα τους προς τον ουρανό μειώνεται. Η εικόνα του ουρανού προκαλεί έντονη τάση φυγής και πετάγματος. Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι ο περιορισμός τους δεν πρέπει να διαρκεί πέραν της μίας εβδομάδας, ειδικά σε συνθήκες υψηλών θερμοκρασιών, γιατί υπάρχει κίνδυνος αυτοτραυματισμού.

Η εκτροφή των κηφήνων είναι εφικτή μέχρι τον Σεπτέμβριο εφόσον: α) τα μελίσσια τροφοδοτούνται με ζαχαρωζύμαρα και β) παραμένουν πολύ δυνατά. Η δυνατότητα του μελισσιού να παράγει κηφήνες προέρχεται από την ανάγκη του να διατηρήσει τον πληθυσμό του. Η μειωμένη έκθεση του μελισσοσμίνους σε παθογόνους μικροοργανισμούς, παράσιτα και φυτοφάρμακα συμβάλλει στην παραγωγή καλύτερων κηφήνων.

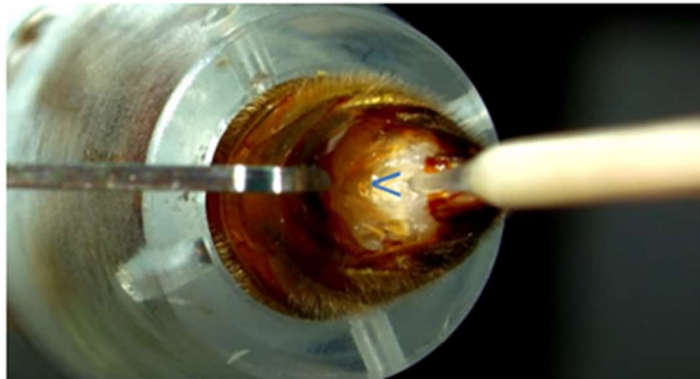
3.2.8. Διαδικασία της τεχνητής σπερματέγχυσης

Ο χώρος στον οποίο θα πραγματοποιηθεί η τεχνητή σπερματέγχυση πρέπει να είναι πολύ καθαρός, η θερμοκρασία περιβάλλοντος 25°C και το ποσοστό υγρασίας περίπου 70-80%. Στην περίπτωση που η ποσοστιαία τιμή υγρασίας περιβάλλοντος είναι κατώτερη του 50% ελλοχεύει ο κίνδυνος αφυδάτωσης των ιστών της βασίλισσας με αποτέλεσμα να καθίσταται δυσχερής ο καθετηριασμός του κόλπου της με την σύριγγα. Εφόσον ο σωλήνας συγκράτησης καθαριστεί, η βασίλισσα εισέρχεται εντός του με τρόπο

ώστε η ραχιαία επιφάνεια του σώματος της να βρίσκεται στην δεξιά πλευρά του και η κοιλιακή πλευρά της στη αριστερή. Πρώτα εισέρχεται το μέρος του κεφαλιού έως του σημείου που εξέχουν οι τρεις τελευταίοι δακτύλιοι της κοιλιάς. Στο μπροστινό άκρο του σωλήνα εισέρχεται το CO₂ με ρυθμιζόμενη ταχύτητα ροής και η βασίλισσα αναισθητοποιείται. Εφόσον η κοιλιά της βασίλισσας δεν διογκώνεται φυσιολογικά, αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η ροή του αναισθητικού είναι πολύ υψηλή. Ωστόσο, δεν αποκλείεται αρχικά να αναισθητοποιηθεί η βασίλισσα και στη συνέχεια να μεταφερθεί από τον χειριστή στη θήκη συγκράτησης. Ο κοιλιακός γάντζος τοποθετείται στα αριστερά της συσκευής και ο γάντζος κεντριού στα δεξιά. Ο σωλήνας συγκράτησης με την εγκλωβισμένη βασίλισσα τοποθετείται συνήθως υπό κλίση 30-45 μοιρών, γιατί η συγκεκριμένη θέση διευκολύνει την πρόσβαση στην κοιλιακή βαλβίδα (Cobey Susan W. και συν., 2013). Για την τοποθέτηση του σπέρματος στον κοινό ωαγωγό της βασίλισσας, είναι απαραίτητη η διάνοιξη των κοιλιακών τοιχωμάτων από τα δύο άγκιστρα (κοιλιακό άγκιστρο και άγκιστρο κεντριού). Αρχικά, ανασηκώνεται το τμήμα του θαλάμου του κεντριού για να αποκαλυφθεί η κοιλιακή κοιλότητα και έπειτα εισάγεται το άκρο της σύριγγας. Δεν είναι σπάνια η περίπτωση χρήσης του κοιλιακού γάντζου για την αποκάλυψη του κεντριού. Εφόσον ολοκληρωθεί η διάνοιξη, το άκρο της σύριγγας έγχυσης του σπέρματος οδηγείται ραχιαία στο σημείο V που καθορίζει το κοιλιακό άνοιγμα (εικόνα 2.23). Το ρύγχος του με κατάλληλους χειρισμούς («ελικοειδής» κινήσεις) εισέρχεται σταδιακά εντός της κοιλιακής οδού από 0,5 mm μέχρι 1,0 mm και έπειτα ακόμη βαθύτερα (εικόνες 2.24, 2.25). Κατά την διάρκεια της καθόδου κρίνεται απαραίτητη η έγχυση μικρό-ποσότητας φυσιολογικού ορού για την λίπανση της περιοχής και την ευκολότερη προώθηση του ρύγχους πέραν της κοιλιακής βαλβίδας. Η δόση σπέρματος που χορηγείται είναι 8 με 12 μl, η οποία μπορεί να χορηγηθεί ως μία πλήρης δόση ή σε δύο δόσεις των 6 μl. Στην πρώτη περίπτωση, η βασίλισσα αφού απεγκλωβιστεί, τοποθετείται σε μία θήκη και επιστρέφει στο κυψελίδιο σύζευξης καθώς έχει διαπιστωθεί πως ευνοείται τοιουτοτρόπως η προώθηση του σπέρματος στη σπερματοθήκη. Στη δεύτερη περίπτωση, θα πρέπει η δεύτερη δόση σπέρματος να γίνει εντός 48 ωρών από την πρώτη (Cobey Susan W. και συν 2013). Σε κάθε περίπτωση, η συγκέντρωση της δόσης ή των δόσεων πρέπει να ανέρχεται συνολικά σε 5 εκατομμύρια σπερματοζωάρια, αριθμός που προσομοιάζει με ότι ισχύει στη φυσική σύζευξη. Με την εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης, η βασίλισσα δεν αρχίζει απευθείας την ωοτοκία, όπως συμβαίνει στην φυσική ωοτοκία (μετά από 2 με 3 ημέρες). Αντιθέτως, ξεκινάει μετά από 25 μέρες, γιατί χρειάζεται λίγος χρόνος μέχρι τα σπερματοζωάρια να μεταναστεύσουν από τον

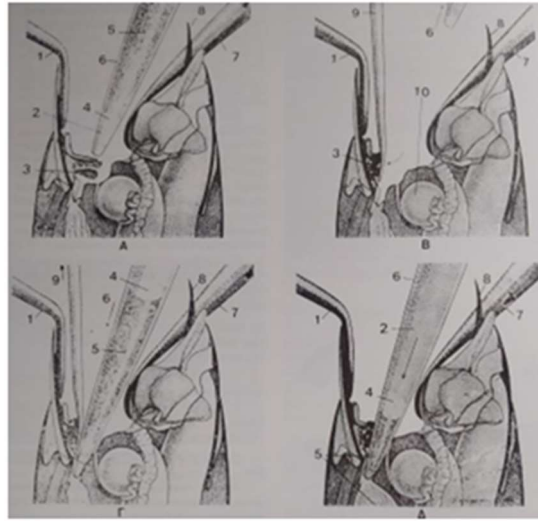
κοινό ωαγωγό στην σπερματοθήκη. Ωστόσο, αν προγραμματιστεί μία δεύτερη νάρκωση με CO₂ για 5 λεπτά μία μέρα πριν ή μία μέρα μετά την σπερματέγχυση, τότε η ωοτοκία θα ξεκινήσει συντομότερα, δηλαδή την 3^η περίπου ημέρα μετά τη σπερματέγχυση (όπως δηλαδή με την φυσική ωοτοκία).

Συχνά λάθη κατά την εφαρμογή της Τ.Σ. στις μέλισσες αποτελούν: 1) η υπερβολική διάνοιξη από τις δύο πλευρές των κοιλιακών τοιχωμάτων της βασίλισσας που οδηγεί σε λανθασμένη κλήση του σώματός της και δυσχεραίνει την διαδικασία της εναπόθεσης του σπέρματος (εικόνα 2.26) και 2) η άσκηση πίεσης στον σάκο δηλητηρίου από τον γάντζο κεντριού που προκαλεί τη μόλυνσή του.

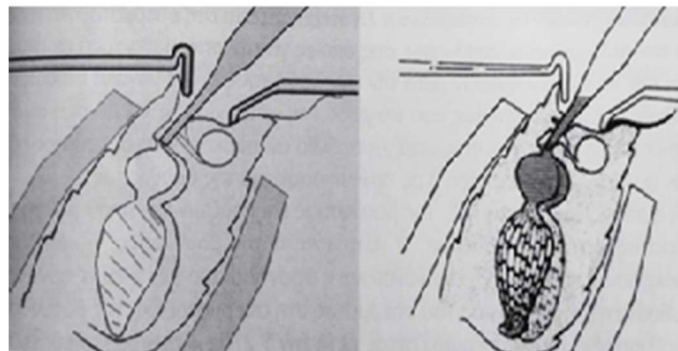


Εικόνα 2.23. Σημείο V του κοιλιακού ανοίγματος.

Πηγή: (https://www.youtube.com/watch?v=2eN2Ndw8qf0&list=PLzM8RzUfntSH2fl_FBs70tRhrs-V3hmtR&index=5)

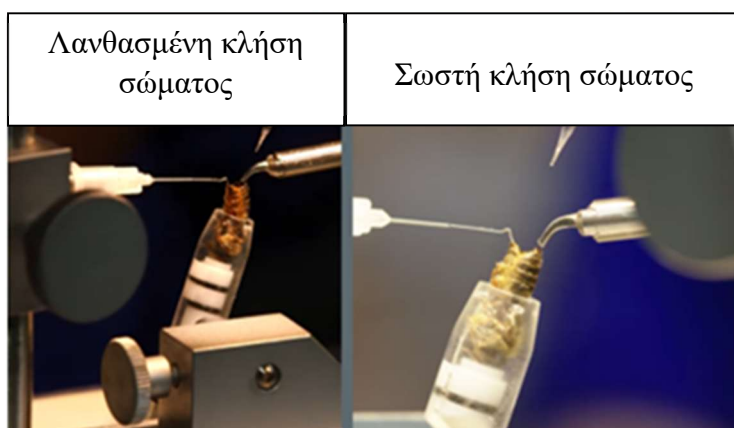


Εικόνα 2.24. Η διαδικασία της σπερματέγχυσης διαφραγματικά. Α. Η κοιλιά της βασίλισσα και η θέση των οργάνων της συσκευής. Β. Παραμέρισμα της κολπικής βαλβίδας, Γ. εισαγωγή της σύριγγας, Δ. έγχυση του σπέρματος. 1 Κοιλιακό άγκιστρο, 2. Φυσιολογικός ορός, 3. κολπική βαλβίδα, 4. Φυσαλίδα αέρα. 5. Σπέρμα, 6. Σύριγγα, 7. Άγκιστρο κεντριού, 8. Κεντρί, 9. Κολπικό ραβδί, 10. Σπερματοθήκη. Πηγή:(Χαριζάνης 1993).



Εικόνα 2.25. Έγχυση του σπέρματος στον κοινό ωαγωγό της βασίλισσας.

Πηγή:(Σκαπέτας 2019).



Εικόνα 2.26. Η σωστή και λανθασμένη κλήση του σώματος της βασίλισσας κατά την Τ.Σ.

Πηγή: (https://www.youtube.com/watch?v=2eN2Ndw8qf0&list=PLzM8RzUfntSH2fl_FBs70tRhrs-V3hmtR&index=5)

3.2.9. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της τεχνητής σπερματέγχυσης

Η τεχνητή σπερματέγχυση των βασιλισσών χρησιμοποιείται κυρίως ερευνητικά και σε μικρότερο βαθμό εφαρμόζεται στην πράξη. Οι περιορισμοί της ευρείας εφαρμογής της οφείλονται στην εκπαίδευση και εξάσκηση του προσωπικού και στο υψηλό κόστος επένδυσης σε εξοπλισμό και αναλώσιμα. Ωστόσο, με βάση τα πλεονεκτήματα από την εφαρμογή της γίνεται αντιληπτό πως το όφελος που προκύπτει αντισταθμίζει τους ανωτέρω περιοριστικούς παράγοντες. Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται οι ελεγχόμενες συζεύξεις, η δυνατότητα συντήρησης, αποθήκευσης και διακίνησης του σπέρματος των κηφήνων σε παγκόσμιο επίπεδο, ανά πάσα στιγμή, χωρίς κίνδυνο μετάδοσης ασθενειών, και η δημιουργία ανθεκτικών μελισσών με αυξημένες παραγωγικές ικανότητες μέσω της γενετικής επιλογής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A) Ελληνική βιβλιογραφία

Θρασυβούλου, Α. (2015). Πρακτική Μελισσοκομία. Εκδόσεις Μελισσοκομική επιθεώρηση, Ειρ. Παππά, Θεσσαλονίκη.

Κούκου, Ε. (2016). Η φυσική γονιμοποίηση και η τεχνητή σπερματέγχυση των βασιλισσών και η μελέτη του σπέρματος των κηφήνων. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Μπασιούρα, Α. (2018). Επίδραση της ασταξανθίνης στη γονιμοποιητική ικανότητα του νωπού και του κρυοσυντηρημένου σπέρματος του κάπρου. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Σάντας, Α. (1986). Μελισσοκομία. Οργανισμός εκδόσεων διδακτικών βιβλίων. Έκδοση ΄Ζ, Αθήνα.

Σκαπέτας, Β. (2019). Μελισσοκομία. Εκδόσεις Σύγχρονη παιδεία, Θεσσαλονίκη.

Υφαντίδης, Μ. (1997). Μελισσοκομία Επιστήμη και Εφαρμογή. Εκδόσεις μελισσοκομική επιθεώρηση, Ειρ. Παππά, Θεσσαλονίκη.

Χαριζάνης, Π. (1993). Μέλισσα και μελισσοκομική τεχνική. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαννοπούλη, Θεσσαλονίκη.

B) Αγγλική βιβλιογραφία.

Aisen, E., Medina, V., Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57 (7), 1801-1808.

Alcay, S., Cakmak, S., Cakmak, I., Mulkpınar, E., Gokce, E., Ustuner, B., Nur, Z. (2019). Successful cryopreservation of honeybee drone spermatozoa with royal jelly supplemented extenders. *Cryobiology*, 87, 28-31.

Anchordoguy, T., Rudolph, A., Carpenter, J., Crowe, J. (1987). Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24 (4), 324-331.

Annick, B., Puttaswamy, M. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk., *73(10)*, 1338–1344.

- Bailey, J., Bilodeau, J., Cormier, N. (2000).** Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 21 (1), 1-7.
- Barry, J. (2004).** Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters* 25(6) 375-388.
- Bathgate, R., Maxwell, W.M.C., Evans, G. (2006).** Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reprod Domest Anim* 41 (1), 68-73.
- Bousseau, S., Brillard, J., Marquant-Le Guienne, B., Guérin, B., Camus, A., Cobey S. (2007).** Comparison studies of instrumentally inseminated and naturally mated honey beequeens and factors affecting their performance, *Apidologie* 38, 390–410.
- Cobey, S., Tarpy, D., Woyke, J. (2013).** Standard methods for instrumental insemination of *Apis mellifera* queens. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1–18.
- Cobey, S. (2016).** An Introduction to Instrumental Insemination of Honeybee Queens. *Bee World*, 93(2), 33–36.
- Collins, A. (2000).** Survival of Honeybee (Hymenoptera: Apidae) Spermatozoa Stored at Above-Freezing Temperatures. *Journal of Economic Entomology*, 93(3), 568–571.
- Collins, A. (2000).** Relationship between semen quality and performance of instrumentally inseminated honeybee queens. *Apidologie*, 31(3), 421-429.
- Collins, A. (2004).** Functional longevity of honeybee, *Apis mellifera*, queens inseminated with low viability semen. *Journal of apicultural research*, 43(4), 167-171.
- Collins, A. (2004).** Sources of variation in the viability of honeybee, *Apis mellifera* L., semen collected for artificial insemination *Invertebrate Reproduction & Development* 45(3),231-237.
- Fuller, B. (2004).** Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* 25 (6), 375-388.
- Gençer, H.V., Kahya, Y. (2011).** The viability of sperm in lateral oviducts and spermathecae of instrumentally inseminated and naturally mated honeybee (*Apis mellifera* L.) queens. *Journal of Apicultural Research*, 50(3), 190–194.

Green, C., Watson, P. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction* 122 (6), 889-898.

Guthrie, H., Liu, J., Critser, J. (2002). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 67 (6), 1811-1816.

Hammerstedt, R., Graham, J., Nolan, J. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11 (1), 73-88.

Harbo, J. (1983). Survival of honeybee (Hymenoptera: Apidae) spermatozoa after two years in liquid nitrogen (-196 C). *Annals of the Entomological Society of America*, 76(5), 890-891.

Harbo, J., Williams, J. (1987). Effect of above-freezing temperatures on Temporary storage of honeybee spermatozoa. *Journal of Apicultural Research* 26: 53-55.

Hopkins, B., Herr, C. (2010). Factors affecting the successful cryopreservation of honeybee (*Apis mellifera*) spermatozoa. *Apidologie*; 41:548-56.

Hopkins, B., Herr, C., Sheppard, W. (2012). Sequential generations of honeybee (*Apis mellifera*) queens produced using cryopreserved semen. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(8), 1079-1083.

Hopkins, B., Cobey, S., Herr, C., Sheppard, W. (2016). Gel-coated tubes extend above-freezing storage of honeybee (*Apis mellifera*) semen to 439 days with production of fertilized offspring. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(10).

Johnson, L., Weitze, K., Fiser, P., Maxwell, W. (2000). Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62 (1-3), 143-172.

Kaftanoglu, O., Peng, Y. (1980). A washing technique for collection of honeybee semen. *Journal of Apicultural Research* 19: 205-211.

Kaftanoglu, O., Peng, Y. (1982). Effects of insemination on the initiation of oviposition in the queen honeybee. *Journal of Apicultural Research* 21: 3-6.

Kaftanoglu, O., Peng, Y. (1984). Preservation of Honeybee Spermatozoa in Liquid Nitrogen. *Journal of Apicultural Research*, 23(3), 157-163.

Çakmak, S., NUR, Z. (2015). Effects of various cryoprotective agents on post-thaw drone semen quality.

Laidlaw, H. (1977). Instrumental Insemination of Honeybee Queens. Pictorial Instrumental Manual. Dadant and Sons, Hamilton, Illinois. 144pp.

Laidlaw, H. (1987). Instrumental Insemination of Honeybee Queens: Its Origin and Development. *Bee World*, 68(2), 71–88.

Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62 (1-3), 113 141.

Lechat, M. (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. *Theriogenology* 50 (5), 699 706.

Locke, S., Peng, Y. (1993). The effects of drone age, semen storage and contamination on semen quality in the honeybee (*Apis mellifera*). *Physiological Entomology*, 18(2), 144–148.

Mackensen, O. (1954). Some Improvements in Method and Syringe Design in Artificial Insemination of Queen Bees. *Journal of Economic Entomology*, 47(5), 765–768.

Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247 (3), 125 142.

Melnichenko, A., Vavilov, L. (1975). Long term storage of drone sperm by freezing in liquid nitrogen, in *Apimondia* (conference proceedings). p. 311–14.

Moritz, R. (1984). The Effect of Different Diluents on insemination Success in the Honeybee Using Mixed Semen. *Journal of Apicultural Research*, 23(3), 164–167.

Novak, A., Blum, M., Taber, S. Liuzzo, J. (1960). Separation and Determination of Seminal Plasma and Sperm Amino Acids of the Honeybee, *Apis Mellifera*. *Annals of the Entomological Society of America*, 53(6), 841–843.

Paillard, M. (2016). Preservation of Honeybee (*Apis mellifera* L.) Semen (Doctoral dissertation, Université Laval).

Peng, C., Yin, C. M., Yin, L. (1992). Effect of rapid freezing and thawing on cellular integrity of honeybee sperm. *Physiological Entomology* 17: 269-276.

Phiancharoen, M., Wongsiri, S., Koeniger, N., Koeniger, G. (2004). Instrumental insemination of <<*Apis mellifera*>> queens with hetero- and conspecific spermatozoa results in different sperm survival. *Apidologie*, 35(5), 503–511.

Poole, H., Taber, S. (1970). In vitro preservation of honeybee HymenopteraApidae semen enhanced by storage at 13-15 degrees C. *Annals of the Entomological Society of America*, 63(6), 1673-1674.

Stoian, R., Mălinaş, C., Botha, M., Petrescu-Mag, I. (2018). Technical, sanitary, and environmental sequences to improve artificial insemination of honeybee, *Apis mellifera*. Part I. Experimental results. *Animal Biology & Animal Husbandry*, 10(2), 122.

Taylor, M., Guzman-Novoa, E., Morfin, N., Buhr, M. (2009). Improving viability of cryopreserved honeybee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios. *Theriogenology* 72: 149-159.

Taylor, M.A., Guzmán-Novoa, E., Morfin, N., Buhr, M.M. (2009). Improving viability of cryopreserved honeybee (*Apis mellifera* L.) sperm with selected diluents, cryoprotectants, and semen dilution ratios., 72(2), 0–159.

Verma, L R. (1981). Biology of honeybee spermatozoa. 3. Effect of amino acids and catalase on respiration as measured by the cartesian diver technique. *Apidologie*, 12 (4), pp.377-382.

Watson, P. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7 (4), 871 891.

Wegener, J., May, T., Knollmann, U., Kamp, G., Müller, K., Bienefeld, K. (2012). In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honeybee semen. *Cryobiology*, 65(2), 126-131.

Wegener, J., Bienefeld, K. (2012). Toxicity of cryoprotectants to honeybee semen and queens., 77(3), 0–607.

Wegener, J., May, T., Kamp, G., Bienefeld, K. (2014). New Methods and Media for the Centrifugation of Honeybee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *Journal of Economic Entomology*, 107(1), 47–53.

Wegener, J., May, T., Kamp, G., Bienefeld, K. (2014 a). A successful new approach to honeybee semen cryopreservation. *Cryobiology* 69: 236-242.

Woyke, J. (1976). The instrumental insemination of the queen bee 2nd improved edition, compiled under the direction. APIMONDIA, 7-9.

Γ) Ιστοσελίδες.

Αχαϊκό Μέλι.

URL: <https://axaiko-meli.gr/i-files-tis-melitoforou-melissas-apis-mellifera/> (ανακτήθηκε 4/05/2023).

Μέλι οικογένεια Μπέση. URL: <https://www.besishoney.gr/o-kyklos-zois-tis-melissas/> (ανακτήθηκε στις 25/05/2023).

Μέλισσες Flipbook Pdf. URL: https://mydokument.com/flipbook-pdf-v-5f1ef7a811214-n-6478ef342d515.html?utm_source=dokumentpub (ανακτήθηκε στις 25/05/2023).

ΤΕΙ Δυτικής Μακεδονίας.jpg. URL: <https://tinyurl.com/2yv9wz2j> (Προσπελάστηκε στις 10/09/2023).

Χαριζάνης Π., Μπουγά Μ. (2002). URL: <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/26470?lang=el#page/8/mode/2up> (ανακτήθηκε 11/06/2023).

Χαριστός Α. Χατζήνα Φ. URL: https://www.elgo.gr/images/ioanna/periodiko/Teyxos_27/09_MELISSES_27.pdf (ανακτήθηκε στις 5/08/2023).

ChatGPT URL: <https://chatgpt.ch/en/> (ανακτήθηκε στις 13/9/2023).

Cobey S. (2007). URL: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00892280/document> (ανακτήθηκε στις 17/06/2023).

Collins A. (1999). URL: <https://www.apidologie.org/articles/apido/pdf/2000/03/m0307.pdf> (ανακτήθηκε στις 4/07/2023).

Collins A. (1999). URL: <http://dx.doi.org/10.1051/apido:200013> (ανακτήθηκε στις 20/04/2023).

Francoyi T., Goncalves L. (2004). URL: https://www.researchgate.net/publication/235226837_A_New_Mini_Syringe_for_Multiple_Inseminations_of_Honey_Bee_Queens (ανακτήθηκε στις 25/02/2023).

Gül A., Şahinler N., Onal A., Hopkins, B., Sheppard, W. (2017). URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X17302959> (ανακτήθηκε στις 16/04/2023).

Gençer H., Kahya Y. (2015). URL: <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.50.3.02> (ανακτήθηκε στις 27/03/2023).

Harbo J. (1985). URL: <https://www.ars.usda.gov/ARSDUserFiles/60500500/PDFFiles/101-200/143-Harbo--Instrumental%20Insemination.pdf> (ανακτήθηκε στις 3/06/2023).

Harry H. Laidlaw, J. (1949). URL: <https://academic.oup.com/jee/article-abstract/42/2/254/2204407> (ανακτήθηκε στις 3/06/2023).

Honeybee Insemination Service. Susan Cobey. URL: <https://nebula.wsimg.com/95d14a9147c0c94735b07264de412e9b?AccessKeyId=95E9AA7688652D2F900&disposition=0&alloworigin=1> (ανακτήθηκε στις 3/06/2023).

John H. (1974). URL: <https://academic.oup.com/aesa/article-abstract/67/2/191/9351?redirectedFrom=fulltext> (ανακτήθηκε στις 24/05/2023).

Mackensen O. (1954). URL: <https://academic.oup.com/jee/article-abstract/47/5/765/2205685> (ανακτήθηκε στις 3/04/2023).

Melissokomianet. URL: <https://melissokomianet.gr/fyles-ellinikis-melissas-apis-mellif/> (ανακτήθηκε στις 4/03/2023).

NET-TEC Internet Solutions. URL: https://www.besamungsgeraet.de/_en/insemination-instruments/ (ανακτήθηκε στις 19/05/2023).

TinyUrl URL: <https://tinyurl.com/app> (ανακτήθηκε στις 10/09/2023).

Vasilikoergastiri. URL: <http://www.vasilikoergastiri.gr/ti-fyles-uparxoun-kai-poiies-gnwrizoume/> (ανακτήθηκε στις 4/07/2023).