

BAL ARILARINDA YAPAY TOHURLAMA (Derleme)

H. Vasfi GENÇER¹

Instrumental insemination in honey
bees.

SUMMARY

In this review, after explaining the necessity and the importance of instrumental insemination in honey bee breeding programmes, the development of instrumental insemination technique was presented chronologically. The reproductive organs of drone and queen bees and mating behaviour were described. Lastly, detailed explanations were made on the instrumental insemination equipment, the insemination procedure and several factors affecting insemination results.

KEY WORDS: Honey bee, *Apis mellifera*, queen bee, instrumental insemination.

ÖZET

Bu derlemede, yapay tohumlamanın arı ıslahı çalışmalarında ne denli gerekli ve önemli olduğu açıklandıktan sonra, tekniğin gelişimi kronolojik olarak sunulmuştur. Ana ve erkek arının üreme organları ve doğal çiftleşme davranışı anlatılmıştır. Ardından, yapay tohumlama ekipmanı, yapay tohumlama uygulamaları ve tohumlama sonuçlarını etkileyen çeşitli faktörler ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Bal arısı, *Apis mellifera*, ana arı, yapay tohumlama.

GİRİŞ

Bal arısı (*Apis mellifera* L.) ıslahı çalışmalarında en büyük engel ana arının çiftleşme davranışdır. Çiftleşme açık havada olduğu için ana arı ile çiftleşen erkek arılar denetim altına alınamamaktadır. Bal arısı ıslahında ana arıların seçimi ne kadar isabetli olursa olsun, ana arılarla çiftleşecek erkek arılar denetlenemediği sürece amaca ulaşıl原因amamaktadır.

Çiftleşmeleri denetlemek ya izole çiftleşme bölgeleri oluşturarak ya da yapay tohumlama tekniği ile mümkündür. Ana arılar erkek arı kaynağı koloniler dışında diğer kolonilerin girişine izin verilmeyen 10 km çapındaki izole bölgelerde erkek arılar ile çiftleştirilmektedirler. İzole bölgeler genellikle adalar ve yüksek dağ vadilerinde oluşturulmaktadır. Ne var ki doğal koşullar altında yaşayan yabani kolonileri izole bölgelerden uzaklaştırmak olanaksızdır ve tam izolasyonun sağlanması çoğu zaman çok güçtür. Diğer yandan izole bölgelerdeki serbest çiftleşmelerde erkek arıları birey olarak bilmek ve seçilmiş erkek arılarla ana arıların çiftleşmesini sağlamak olası değildir. Yapay tohumlama ise doğal çiftleşmenin alternatifi olmamakla birlikte çiftleşmenin kesin denetimini sağlayan en etkili araçtır. Yapay tohumlama tekniği izole edilmemiş bir bölgede bir çok erkek arı hattını barındırarak aynı anda bunlardan yararlanmayı olanaklı kılar. Böylece, her erkek arı hattı için ayrı izole bölgelere gerek kalmaksızın daha dar bir alanda ıslah çalışmalarının yürütülmesi sağlanır.

Bal arısı ırklarının saf olarak korunmasında, saf hatların oluşturulmasında ve daha iyi özelliklere

sahip hatların geliştirilmesine yönelik ıslah programlarında kullanılması gereken teknik yapay tohumlamadır. Yapay tohumlama doğal çiftleşmeyle yapılamayan bazı çalışmalara da olanak tanımaktadır. Örneğin, ana arının tek ya da özel olarak yetiştirilmiş birkaç erkek arıyla çiftleştirilmesi, mutant erkek ve ana arıların çiftleştirilmesi, kendileme gibi genetik-ıslah çalışmaları ancak yapay tohumlama ile gerçekleştirilebilmektedir.

YAPAY TOHURLAMANIN GELİŞİMİ

Doğa bilimciler 18. yüzyılın ikinci yarısında bal arılarının üreme biyolojisine ilgi duymaya başlamışlardır. John Torley, 1745 yılında ana arının petek gözlerine yumurtladığını izlemiş, ancak yumurtaların petek gözlerinde erkek arılar tarafından döllendiği kanısına varmıştır. Döllenmenin böyle gerçekleşmediği birkaç yıl sonra Anton Jansha tarafından ortaya çıkarılmıştır. Genç ana arıların kovandan uçuşunu ve arkasında erkek arı üreme organıyla kovana döndüğünü ilk defa Anton Jansha 1770 yılında gözlemlemiştir.

İsviçreli doğa bilimci Francois Huber 1814 yılında işçi arıların geçişini sağlayan, fakat ana arılar ve erkek arıların çıkışını engelleyen bir cam tüp ile genç ana arıları ve erkek arıları kovan içinde hapsederek çiftleşmeyi denetlemeye çalışmıştır. Uçuşuna izin verilmeyen ana arılar birkaç hafta içinde yumurtlamamışlardır. Bunun ardından ana arı ile erkek arıları bir kafese koyan Huber, burada da çiftleşmenin olmadığını gözlemiştir. Huber kapalı ortamda çiftleşmenin gerçekleşmediğini saptadıktan sonra, bir fırça ile vaginaya semeni ulaştırarak genç

ana arıları yapay tohumlamaya çalışmıştır. Bu çalışması ile Huber yapay tohumlama girişiminde bulunan ilk kişi olarak anılmaktadır (Laidlaw 1989).

Huber' in tohumlama girişiminden sonra 1883 yılında Wankler' in geliştirdiği bir şırınga ile ana arıya semeni enjekte etmeyi denemesine kadar yapay tohumlama çalışmalarına ilgi duyulmamıştır. Bununla birlikte, Wankler bu çalışmalarından başarılı sonuç alamamıştır. Wankler' in çalışmalarından kısa bir süre sonra ise Nelson McLain yapay tohumlamayı da içeren bir seri denetimli çiftleştirme denemelerine başlamıştır. McLain' in ilk çalışmalarında, elde aşağı doğru tutulan genç ana arının açık iğne odacığına erkek arının semeni damlatılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda modifiye edilmiş hipodermik şırınga içine toplanan semen tahtadan yapılmış köşebente tutturulmuş ana arıya enjekte edilmiştir. Bu girişimlerin de hiçbirisi başarılı olmamıştır. Çalışmaların başarısızlıkla sonuçlanması ve o sıralar A.B.D.' de ticari ana arı yetiştirme tekniğinin gelişmesi yapay tohumlamaya ilgiyi azaltmıştır.

Yirminci yüzyılın başları arılarda üreme biyolojisine ilişkin bilgilerin yoğunlaştığı yıllardır. Ana arının vaginasındaki kapak benzeri (vagina valfi) yapının Breslau tarafından 1905 yılında tanımlanması ve Snodgrass tarafından bal arısı anatomisinin 1910 yılında şematize edilmesi ve tanımlanması yapay tohumlama çalışmalarına temel oluşturmuştur.

Yapay tohumlama girişimi F. Joger ve W. Howard tarafından 1914 yılında hipodermik şırınga kullanılarak sürdürülmüş, ancak yine başarılı sonuç alınamamıştır. Nihayet 1927 yılında ilk kez L. R. Watson ana arının yapay tohumlamasını başarmıştır. Bununla birlikte, Watson' un başarısı yapay tohumlama tekniğindeki gelişmenin sadece başlangıcı kabul edilmektedir. Watson, semen toplamak ve semeni enjekte etmek için kapillar şırınga kullanmıştır. Şırınga hareketinin hassas kontrolü Barber pipet manipülatörü bir stereo mikroskoba tutturularak sağlanmıştır. Tohumlama ekipmanı ana arıyı sabitleştirmede kullanılan bir beşik ve ince bir forseps ile tamamlanmıştır. Daha sonra W. J. Nolan, Watson' un yapay tohumlama aletini geliştirmiştir. Nolan, ana arıyı tutan beşik yerine cam tüp ve ana arıyı tüpe yerleştirmek için gerileme tüpü kullanmıştır. Bu alette, metal bir sehpanın iki kenarına ana arının iğne odacığını açmada kullanılan kancaların tutturulduğu birer

direk ve bunların arasına da ana arıyı tutan tüp yerleştirilmiştir.

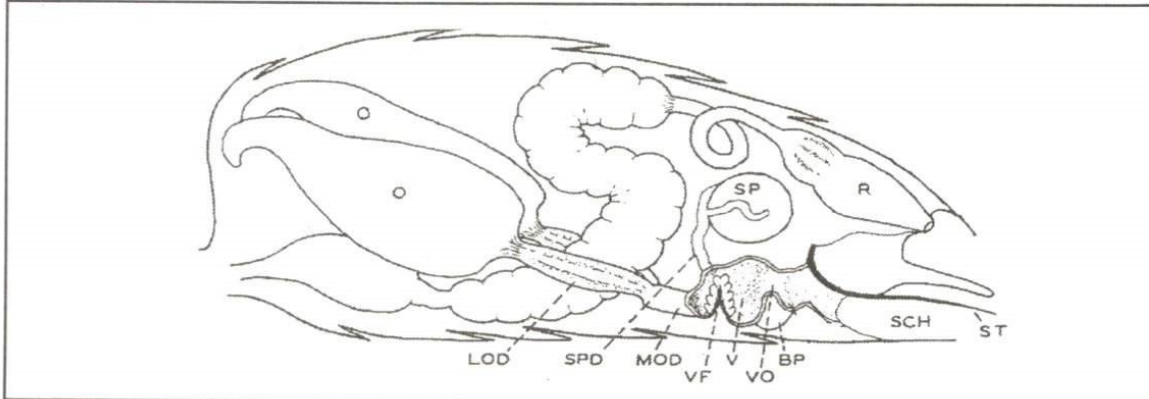
Watson ve Nolan' ın vagina valfini bilmemeleri yumurta kanallarına semenin enjeksiyonunu tam olarak başaramamalarına ve dölleme başarısının düşmesine neden olmuştur. H.H. Laidlaw, 1932' de çiftleşme uçuşundan dönen ana arılarda diseksiyon yapmış ve ana arıların hepsinde yumurta kanallarının semenle dolu olduğunu, yapay tohumlama girişiminde bulunulan ana arıların yumurta kanallarının ise semen içermediğini ve vagina valfinin ana yumurta kanalını tamamen tıkadığını saptamıştır. Laidlaw, 1934' de bir sonda yardımıyla vagina valfini iterek ana arının yumurta kanallarına başarıyla semeni enjekte edebilmiştir. Bu çalışma ile yapay tohumlamanın başarılı olabilmesi için temel kuralın semeni vagina valfinin ilerisine boşaltmak olduğu kanıtlanmıştır.

Otto Mackensen 1936' da oldukça kaba olan Nolan' ın aletini daha da geliştirerek günümüzün klasik tohumlama aleti haline getirmiştir. Mackensen 1944'te tohumlama sırasında ana arıyı bayıltmak için CO₂ gazı kullanmış ve en az bir gün arayla iki kez CO₂ gazı uygulandığında yapay tohumlanmış ana arıların doğal çiftleşmişler gibi erken yumurtlamaya başladığını saptamıştır. Bu buluş ile yapay tohumlanmış ana arıların yumurtlamasının gecikmesi sorunu çözülmüştür. Mackensen, dölleme için gerekli semen hacmi, birden fazla enjeksiyonun etkisi ve tohumlamaya uygun ana arı yaşı konuları üzerinde çalışmalar yapmıştır. Bu temel buluşların ardı sıra yapılan çalışmalar ile tohumlama tekniği ve tohumlama aletlerinin farklı modelleri çeşitli ülkelerde geliştirilmiştir (Laidlaw 1989).

CİNSİYETLERİN ÜREME ORGANLARI VE ÇİFTLEŞME DAVRANIŞI

Ana Arı Üreme Organları

Ana arının karın kısmındaki üreme organları (Şekil 1) birer çift yumurtalık (ovarium) ve yan yumurta kanalı (lateral oviduct), ana yumurta kanalı (median oviduct), sperm torbası (spermatheca) ve vaginadan oluşmaktadır. Ana arı karının son tergit ve sterniti arasında olan iğne odacığı üreme organlarının dışarıya açılan kısmıdır. İğne odacığının üstünde rektal açıklık, altında ise vagina girişi bulunmaktadır.



Şekil 1 . Ana arı üreme organları: BP, yan kese; LOD, yan yumurta kanalı; MOD, ana yumurta kanalı; O, yumurtalık; R, rektum; SCH, iğne odacığı; SP, sperm torbası; SPD, sperm torbası kanalı; ST, iğne; V, vagina; VF, vagina valfi; VO, vagina ağzı (Mackensen and Tucker 1970).

Vaginanın kasılabilme yeteneğine sahip duvarında birçok kıvrım ve çıkıntı vardır ve bu yapısı nedeniyle şekli karnın kasılması ve genişlemesine bağlı olarak değişmektedir. Vagina ağzı (vaginal orifice) ana arı gevşediğinde kapanan ve dışarıdan bakıldığında hörgüç gibi görünen uzunlamasına dar bir yarıktır. Vagina valfi (valvefold) vagina'nın dorsal kısmına doğru uzanarak yumurta kanallarına giden yolu tıkamaktadır. Vagina valfi çiftleşme sırasında ana arı tarafından geriye katlanarak semenin yumurta kanallarına geçişine ve yumurtlama sırasında vagina ağzından çıkışına izin vermektedir.

Ana arı karnının büyük bölümünü her biri 180 civarında yumurta tüpü (ovariol) içeren bir çift yumurtalık kaplamaktadır. Akordiyon gibi genişleme özelliğine sahip olan yan yumurta kanalları yeni çiftleşmiş ana arıda semenin geçici süreyle depolanmasını sağlamaktadır. Bu iki yan yumurta kanalı birleşerek vaginaya açılan dar bir geçit olan ana yumurta kanalını oluşturmaktadır.

Vaginanın üzerinde ince duvarlı küre biçimindeki sperm torbası (spermatheca) bulunmaktadır. Sperm torbasının üzeri torbaya beyaz görünüm veren bir trake ağı ile kaplıdır. Trake ağı üzerinde sperm torbası kanalını oluşturan iki salgı bezi uzanmaktadır. Sperm torbası kanalı sperm torbasından vaginanın dorsal duvarına uzanarak bağlantıyı sağlamaktadır. Trake ağı ve sperm torbası bezi spermatozoanın dölleme yeteneğini 5 yıl kadar koruyabilmektedir. Sperm torbası döllememiş ana arıda açık renkli bir sıvı içerirken, ana arı çiftleştiği zaman 5-6 milyon spermatozoa ile dolmaktadır.

Erkek Arı Üreme Organları

Erkek arı üreme sistemi (Şekil 2), karnın her iki yanında bir çift testis, testislerin çıkış kanalları olan bir çift vas deferens, kanallara bağlı ve kısmen genişlemiş bir çift seminal kese (vesicula seminalis), bir çift mukus bezi, ejakulasyon kanalı (ductus

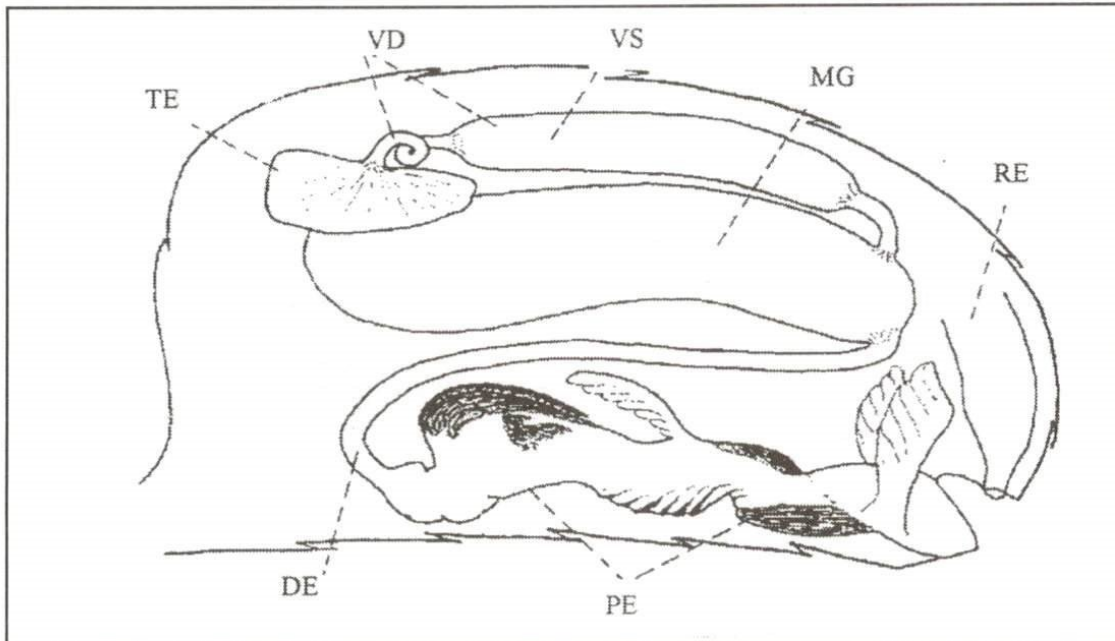
ejectulatoris) ve penisi içermektedir.

Genç erkek arıda testisler neredeyse karnın üst yarısını kaplayan sümüksü görümlü organlardır. Ergin erkek arıda ise testisler küçülerek yeşilimsi sarı bir görünüme dönüşmektedir. Testislerin her biri vas deferensin ucunda bir odacığa açılan 200 civarında küçük tüpçükler (testiol) içermektedir. Vas deferens, testisi uzun ve genişlemiş kısım olan vesicula seminalise bağlayan kıvrımlı bölgedir.

Sperm hücreleri gelişmelerini testis tüpçüklerinde sürdürürler ve sonra ejakulasyona kadar kalmak üzere vesicula seminalise geçerler. İçeriği vesicula seminalis'e aktarılan testisler küçülmektedirler. Vesicula seminalisin kaslı duvarları sperm için gıda sağlayan gıda hücreleri ile kaplıdır. Erkek arı 3-4 günlük yaşta iken vesicula seminaliste çok az spermatozoa vardır. Sekiz günlük yaşta erkek arıda spermatozoa sayısı 10-11 milyona ulaşmaktadır. Vesicula seminalis ve mukus bezinin her biri alt uçlarından birleşerek dar ejakulasyon kanalına (ductus ejaculatoris), ejakulasyon kanalı ise penise açılmaktadır.

Penis birçok biçimsiz yumru ve tüylü alanı olan ve 3 bölgeden oluşan membranimsi bir kanaldır. Penisin içteki geniş ucu ejakulasyon kanalının açıldığı soğan (bulb) bölgesidir. Soğan üzerinde sert kahverengi plakalar bulunmaktadır. Soğan ejakulasyon sırasında semeni sulandıran açık renkli bir sıvı ile doludur. Penisin orta bölgesi (cervix) incedir ve üzerinde fimbrilli lop bulunmaktadır. Üçüncü bölge ise genital açıklığın son bulunduğu vestibulum bölgesidir.

Çiftleşmede, penis ejakulasyon kanalını kendine doğru çekerek vücut dışına içten dışa doğru çıkar. Bu ters-yüz olma (eversiyon) tüm karnın kaslarının eşzamanlı kasılması ile sağlanmakta ve bu sırada ejakulasyon gerçekleşmektedir. Vesicula seminalis kaslarının peristaltik kasılması ile semen ductus ejaculatoriusa itilmekte ve ardından da penis soğanına semen ulaştıktan sonra mukus bezlerinin kasları mukusu itmek için kasılmaktadır.



Şekil 2. Erkek arı üreme organları: TE, testis; VD, vas deferens; VS, vesicula seminalis; MG, mukus bezi; DE, ductus ejaculatorius; PE, penis; RE, rektum (Mackensen and Tucker 1970)

Çiftleşme Davranışı

Çoğu böceklerde dişi bireyin çiftleşmesi ve döllenmesi ile yumurtaların yumurtlanması arasında bir süreç vardır. Genellikle çiftleşmek için gerekli optimum koşullar, yumurtlamak ve dölleri yetiştirmek için gerekli optimum koşullardan farklıdır. Bal arılarında da çiftleşme ve yumurtlama tamamen farklı koşullarda gerçekleşmektedir. Yumurtlama, sadece ana arı ve yumurtaların bulunduğu ve yavru yetiştirmek için sabit koşulların bulunduğu kovan içinde olmaktadır. Fakat ana arı çiftleşmek için kovana terk ederek açık havada uçmaktadır.

Ana arılar hava sıcaklığı 20°C 'nin üzerinde olduğu ılık ve güneşli günlerde $12.00-17.00$ saatleri arasında çiftleşme uçuşuna çıkmaktadırlar. Farklı arılıklardan birkaç bin civarında erkek arı "erkek arı toplanma alanı" denilen özel yerlerde bir araya gelmektedirler. Toplanma alanındaki erkek arılar bu alana doğru uçan ana arılarla burada çiftleşmektedirler.

Çapı 30-200 m. arasında değişen erkek arı toplanma alanında erkek arılar uçuş yüksekliği meteorolojik koşullara bağlı olarak yerden 10-30 m. arasındaki yükseklikte uçmaktadırlar. Erkek arıların hangi faktörlerin etkisiyle bu özel yerleri tercih ettikleri bilinmemektedir. Erkek arı toplanma alanları yıllar boyu değişmeden sabit kalmaktadır.

Erkek arıların uçuş sınırı 3-6 km. civarında olmakla birlikte, arılıktan 10 km. uzağa gidebilmektedirler. Ana arılar ise genellikle 1-3 km. uçmaktadırlar. Çiftleşmenin en yoğun olduğu uzaklık sınırı 2-5 km' dir. Arılığı daha yakın yerlerde çiftleşme gerçekleşmemekte, daha uzak mesafelerde ise çiftleşme süresi uzamaktadır (Woyke 1962).

Cinsel olgunluğa 5-6 günlük yaşta ulaşan ana arılar ilk 3.-5. gün içinde 2-5 dakika süren çevreyi tanıma uçuşu yapmakta, daha sonraki günlerde çiftleşmek için uçmaktadırlar. En etkin çiftleşme 6.-10. günlerde olmaktadır. Erkek arılar ise ilk uçuşlarını 6-8 günlük yaşlarda yapmakta ve 12 günlük yaşta cinsel olgunluğa ulaştıktan sonra çiftleşmek için toplanma alanına uçmaktadırlar. Erkek arı toplanma alanındaki erkek arı yoğunluğuna bağlı olarak ana arı aynı günde ya da başka bir günde bir ya da birkaç uçuşta 7-17 erkek arı ile çiftleşmektedir (Woyke 1962). Ana arının tekrar çiftleşme eğilimi göstermesi spermatozoa yoğunluğuna bağlıdır. Ana arı yeterli semen almadığı sürece tekrar uçmaya yönelmektedir. İkinci kez çiftleşme uçuşuna çıkan ana arıların sperm torbalarında bulunan spermatozoa sayısı ilk uçuştaki çiftleşmelerden sonrakine göre daha azdır (Mackensen and Ruttner 1975). Çiftleşme uçuşu süresi ortalama 25 dakikadır. Birinci çiftleşme uçuşu ile sonraki uçuş arasında geçen süre ise 19-120 dakika arasındadır (ortalama 52 dak.). Aynı günde gerçekleşen iki çiftleşme uçuşu arasındaki süre arttıkça ikinci uçuş süresi kısalmakta ve ana arının çiftleşme etkinliğinde azalma görülmektedir (Woyke 1962).

Ana arı birkaç erkek arı ile çiftleştikten sonra yumurta kanalları semenle dolu ve arkasında son çiftleştiği erkek arının çiftleşme organı parçası (çiftleşme işareti) ile kovanına geri dönmektedir. Bir araştırmada (Woyke 1962) çiftleşme uçuşundan

dönen ana arıların yumurta kanallarında en az 0.6 mm^3 en fazla 28.234 mm^3 ve ortalama 11.579 mm^3 semen bulunmuştur. Bir erkek arı 11 milyon spermatozoa içeren 1.5 mm^3 semen üretmektedir. (Mackensen 1964). Saptanan en fazla 28.234 mm^3 semen bir erkek arının ürettiği ortalama semen miktarının 18 katıdır ki bu da ana arının bir uçuşta 18 erkek arı ile çiftleşebildiğini ortaya çıkarmaktadır.

Çiftleşmeler sonunda ana yumurta kanalından yan yumurta kanallarına itilen semen neredeyse her iki yan yumurta kanalını doldurmaktadır. Ancak yan yumurta kanallarının her biri aynı hacimde semenle dolu olmayabilmektedir. Yan yumurta kanalları spermatozoa için uygun bir depolama organı değildir ve bu nedenle çiftleşmeden itibaren 24 saat içinde geçici depo görevi yapan yan yumurta kanallarından spermatozoanın sperm torbasına göçü gerçekleşmektedir. Ana arı çiftleşme uçuşundan döndükten kısa bir süre sonra fiziksel hareketlerle karna baskı uygulayarak semenin yan yumurta kanallarından ana yumurta kanalına ve sperm torbası kanalına iletilmesini sağlamaktadır. Semen çok az bir kısmı 1 mm. uzunluğundaki dar kanaldan ($0.01 \text{ mm}-0.25 \text{ mm}$ çaplı) geçerek sperm torbasına ulaşmaktadır. Semen sperm torbasına iletiminde spermatozoanın bireysel motilitesinin de payı vardır. Sonuçta 80-90 milyon spermatozodan ancak 5 milyon civarında (Mackensen and Tucker 1970) spermatozoa sperm torbasına ulaşabilmektedir. Geriye kalan semen kuruyarak beyazımsı kahverengi bir madde halinde iğne odacığından dışarıya atılmaktadır.

DOĞAL ÇİFTLEŞME - YAPAY TOHURLAMA KARŞILAŞTIRMALARI

Ana arının serbest uçuşu ve erkek arılarla teması yapay tohumlamada söz konusu değildir. Bu durumda ana arının erkek arılarla teması, çiftleşme işareti, henüz bilinmeyen olası hormon ya da feromonlar gibi döllenmeyi etkileyebilecek çoğu faktör yapay tohumlama ile ortadan kalkmaktadır. Bu nedenle yapay tohumlama çalışmalarında doğal çiftleşmenin gerçekleştiği koşullar sağlanmaya çalışılmakta ve doğal çiftleşmeye ilişkin bilgiler değerlendirilmektedir. Örneğin, bu bilgilerden biri doğal koşullar altında ana arıların ve erkek arıların çiftleşme yaşıdır ve yapay tohumlama ancak doğal çiftleşme yaşında yapıldığında başarılı olmaktadır.

Yapay tohumlama işlemi sırasında baygın olan ana arının iğne odacığının kancalarıyla açık tutulması, vagina ağzındaki deri katmanlarının yana çekilmesi ve semenin aktarımına engel olan vagina valfinin yatırılması işlemleri tohumlamacı tarafından gerçekleştirilerek doğal koşullara mümkün olduğu kadar yaklaşılmaya çalışılmalıdır (Koeniger and Ruttner 1989).

Yapay tohumlamada yeni buluşlarla doğal çiftleşme sonuçlarına ulaşmak hedeflenmektedir. Bazı çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, yapay tohumlanmış ana arılar tarafından yönetilen kolonilerin doğal çiftleşmiş ana arılar tarafından yönetilenlerden daha az yavru yetiştirdikleri ve daha az bal ürettikleri saptanmıştır (Harbo and Szabo 1984, Maul 1972). Bir çalışmada ise doğal çiftleşmiş ana arıların yapay tohumlanmış ana arılardan daha ağır oldukları ve ana arının yumurtlama oranı ile

vücut ağırlığı arasında yüksek ilişki ($r=0.73$) olduğu bulunmuştur (Harbo 1986). Doğal çiftleşmiş ana arıların daha fazla yumurtlaması ve doğal çiftleşmiş ana arılı kolonilerin performanslarının yapay tohumlanmış ana arılı kolonilere göre yüksek olması bu ilişki ile açıklanabilir. Bazı çalışmalarda ise yapay tohumlanmış ve doğal çiftleşmiş ana arılar tarafından yönetilen kolonilerin performanslarında farklılık olmadığı saptanmıştır (Lodesani et al 1991, Nelson and Laidlaw 1988).

Yapay tohumlanmış ana arıların doğal çiftleşmiş ana arılara göre daha kısa ömürlü oldukları (Harbo and Szabo 1984, Mackensen 1964, Maul 1972) ve yumurtlamaya doğal çiftleşmiş ana arılardan daha geç başladıkları (Cobey 1983, Ebadi and Gary 1980, Kaftanoğlu and Peng 1982, Woyke 1985) çeşitli çalışmalar ile ortaya çıkarılmıştır.

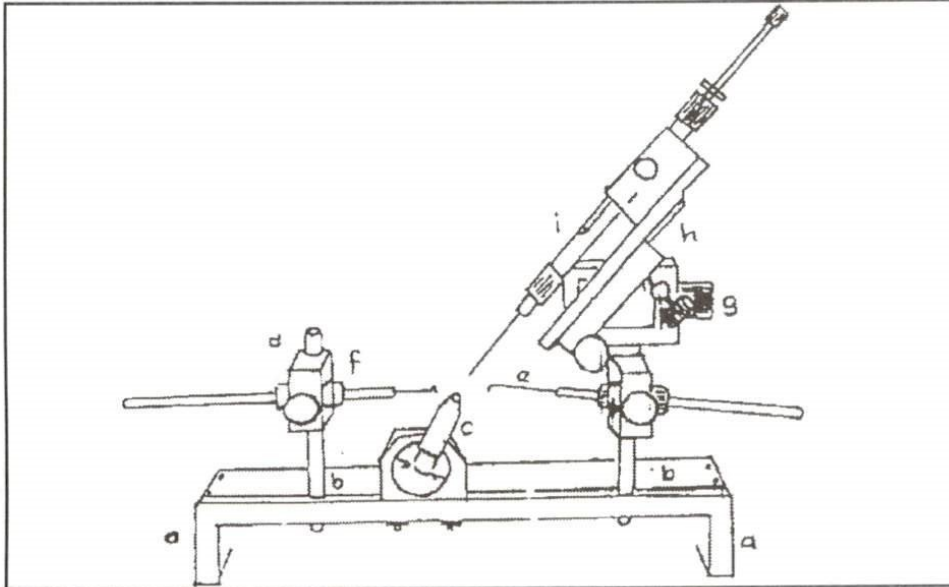
YAPAY TOHURLAMA EKİPMANI

Ana arıların yapay tohumlanmasında kullanılan ekipmanı üç grupta toplamak mümkündür: (a) arıcılık ekipmanı (ana arı ve erkek arı kafesleri vb.), (b) standart laboratuvar ekipmanı (karbondioksit

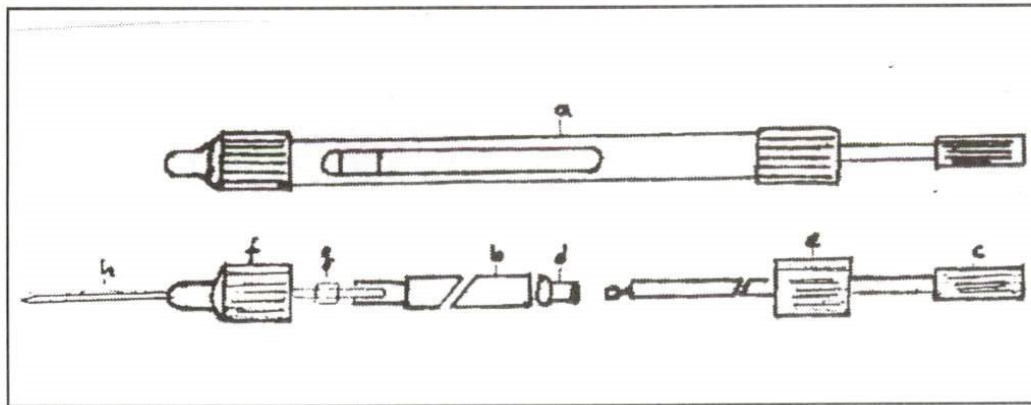
tüpü, stereomikroskop, ışık kaynağı, vb.), (c) yapay tohumlama aleti.

Yapay tohumlama çalışmalarının başlangıcından günümüze kadar bir çok araştırmacı tarafından çeşitli yapay tohumlama aletleri yapılmıştır. Bu yapay tohumlama aletlerinde bazı farklılıklar olmakla birlikte temel olarak hepsi aynı ilkeyle çalışan aletlerdir. Bugün en yaygın kullanılan yapay tohumlama aletleri Mackensen, Laidlaw, Ruttner, Schneider, Fresnaye ve Schley aletleridir (Harbo 1989).

Yapay tohumlama aleti, işlem sırasında ana arının tohumlama için uygun konumda tutulmasını ve semenin enjekte edilmesini sağlayan bir mikro-manipulatördür. Schley yapay tohumlama aleti (Şekil 3) metalden yapılmış ayaklı sehpa (a), sehpanın iki ucuna düşey konumda monte edilmiş iki adet metal çubuk (b), iki metal çubuk ortasında bulunan ana arı tutucusu (c), bilyeli yatak gövdeleri (d), ile metal çubuklara tutturulmuş iğne kancası (e), karın kancası (f) ve mikroşırınga tutucu gövdesi (g), dişli mikroşırınga tutucu (h) ve mikroşırıngadan (i) oluşmaktadır (Schley 1982).



Şekil 3. Schley yapay tohumlama aleti (Schley 1982).



Şekil 4 . Mikroşırınga ve parçaları (Schley 1982).

Ana arı tutucusu, sehpa üzerinde ana arının yatayla 56-58° açı yaparak sabit durmasını sağlayan ve yapay tohumlama aletinin CO₂ kaynağına bağlanan parçasıdır. Ana arı tutucusu, tutucu boru, sökölür-takılır miknatıslı plaka, CO₂ kanalı, tutucu gövdesi ve somun parçalarından oluşmaktadır.

Erkek arılardan semen toplamada ve ana arıya semenin enjekte edilmesinde kullanılan mikroşırınga duyarlı kullanıma olanak veren dişli bir çubuk üzerinde hareket etmektedir. Dişli çubuk bilyeli yatak gövdesine monte edilmiştir ve tohumlamacıya göre sağdaki metal çubuk üzerine yerleştirilmiştir. Mikroşırınganın (Şekil 4) parçaları; dış çapı 8mm. olan gövde (a), gövde içine yerleştirilen plastik şırınga silindiri (b), piston kolu (c) ve bu kola geçirilmiş piston (d), vidalı somun (e), şırınga ucu kapağı (f), 4 mm. uzunluğunda silikon hortum parçası (g) ve dış çapı 1.5 mm., iç çapı 0-8 mm. olan cam uç (h)'tur.

İğne kancası ve karın kancası ana arının iğne odacığını ve döl yolu girişini açık tutmaya yarayan yapay tohumlama aletinin önemli parçalarıdır. Karın kancası tohumlamacıya göre solda, iğne kancası ise sağda bulunmaktadır. Yapıları birbirinden farklı olan bu kancalardan soldaki karın kancası ana arının ventraldeki son segmentini (sternit) tutmaya elverişli bir yapıda iken, iğne kancasının iğne tabanındaki üçgen alana yerleşebilecek büyüklükte kaşık benzeri bir ucu vardır. Kaşık ucu ana arı iğnesinin tabanına yerleştirilen iğne kancası ile iğne geri çekilerek iğne odacığı açılabilir. Kaşık uçlu iğne kancasının vaginaya baskı uygulaması ve mikroşırınga ucunun girişini zorlaması nedeniyle kaşık yapı yerine, ucunda 0.02 mm. çapında delik bulunan iğne kancası geliştirilmiştir. Bu tip kancanın ucundaki delikten iğne geçirildikten sonra iğne geri çekilmekte ve vagina girişine mikroşırınga daha kolay yaklaştırılmaktadır (Schley 1988).

Gerek semen toplama gerek ana arının uygun konuma getirilmesi ve enjeksiyonun yapılabilmesi için mikroskop ile görüntünün büyütülmesi gerekir. Üç boyutlu geniş görüntü elde edilen 15-20 büyültmeli bir binoküler stereomikroskop yapay tohumlama ekipmanının vazgeçilmez parçasıdır. Mikroskop görüntü alanında daha aydın görüntü sağlamak için mikroskoba aydınlatma sistemi monte edilmektedir. İğne odacığı açılmış ana arının organ ve dokularının sıcaktan kurumasına engel olmak için düşük ışık kaynağı tercih edilmelidir.

Tohumlama işlemi sırasında ana arıyı hareketsizleştirmek ve tohumlama sonrası ovipozisyonu uyarmak amacıyla narkoz düzeneği kullanılmaktadır. Narkoz düzeneği basınçlı bir CO₂ tüpü, regülatör, gazın akışını izlemeyi sağlayan yıkama şişesi ve CO₂ gazını ana arı tutucusuna ileten plastik borudan ibarettir.

Alışıl gelmiş tohumlama yönteminde iğne odacığı iki kanca ile açık tutulmakta ve iğne, iğne kancası ile geri çekilmektedir. Farklı işleyişi olan bir alette (Kühnert and Laidlaw 1994) ise kanca destekleri bulunmamaktadır. İğne, ince uçlu bir forseple tutulup çekilerek mikroşırınga ucunun kolayca sokulabileceği geniş bir açıklık elde edilmektedir. Ana arının iğnesi forseple tutularak açıldığı için dorsal kancaya gerek kalmamakta, karın kancası yerine de ana arı tutucusu tüpüne yerleştirilmiş bir kanca kullanılmaktadır. Ana arının

sterniti ana arı tutucu tüpündeki kanca ile açık tutulmaktadır.

YAPAY TOHURLAMA İŞLEMİ

Arıcılığı ileri ülkelerde, ticari üretim işletmelerinde ve özellikle araştırma etkinliklerinde geniş kullanım alanına sahip olan yapay tohumlama rutin olarak uygulanan bir tekniktir. Buna karşın yapay tohumlama aletini ve tekniğini geliştirme amaçlı çalışmalar sürdürülmektedir. Elverişli koşullarda yapılan yapay tohumlamalardan başarılı sonuçlar elde etmek günümüzde sorun olmaktan çıkmıştır. Yine de yeni başlayanlar için güç görünen tohumlama deneyimli bir kişi öncülüğünde sürekli pratik yapılarak öğrenilebilmekte ve zamanla deneyim kazanılmaktadır.

Ekipmanın Hazırlanması

Yapay tohumlamada karşılaşılan sorunlardan en önemlisi tohumlama sonrası bakteri bulaşmasından kaynaklanan ana arı ölümleridir. Karbonhidratlar ve proteinlerce zengin olan mukus ve semen patojenler için uygun bir besi ortamıdır. Bu besi ortamında patojenler, genellikle pseudomonas bakterileri hızla gelişmektedir. Hasta ana arıda görülen belirtiler yavaş hareket etme ve karnın şişkinliğidir. Hasta ana arı genellikle yumurtlamaya başlamadan ölmektedir. Ölü ana arı parçalandığında zehir bezleri, yumurtalıklar ve malpigi borucukları üzerinde siyah noktalar görülebilmektedir (Moritz 1989).

Hijyenik koşullarda çalışarak hastalıkları önlemek için eller deriye zarar vermeyen dezenfektanla yıkanmalı, kullanılan ekipman ve aletler düzenli olarak %70 alkol ile temizlenmelidir. Bir ana arı grubunu tohumlamadan önce ana arılar ile doğrudan temas eden tüm parçalar 120 °C'de 20 dakika otoklavda sterilize edilmelidir. Yapay tohumlama laboratuvarında olduğu gibi saha çalışmalarında da hijyene önem verilmelidir. Bunun için tohumlanacak ana arıların tutulacağı çiftleştirme kutuları dezenfekte edilmeli ve sonra bu çiftleştirme kutularına güçlü ve sağlıklı kolonilerden alınan işçi arılar konulmalıdır.

Mikroşırınganın Hazırlanması

Mikroşırıngaya doldurulan fizyolojik solüsyonun pH' sı ve tuz konsantrasyonu spermatozoanın yaşamasına olanak sağlayacak değerlerde olmalıdır. Solüsyon, yayvan bir cam kaptaki hazırlanmalı ve otoklavda sterilize edilmelidir. Enfeksiyonu önlemek için sterilize edilmiş solüsyona % 0.25 oranında antibiyotik (penisilin G ya da streptomycin) katılabilir. En yaygın kullanılan solüsyonlar; Ringer (NaCl, 0.85 gr.; KCl, 0.025 gr.; CaCl₂, 0.030 gr.; glukoz, 0.50 gr.; damıtık su, 100 ml.), Kiev (trisodyum sitrat- Z-hidrat, 0.30 gr.; damıtık su, 100 ml) ve serum fizyolojik (NaCl, 0.85 gr.; damıtık su, 100 ml) solüsyonlardır.

Tampon ve sıvı piston görevi yapan fizyolojik solüsyon mikroşırıngaya doldurulmadan önce olası alkol kalıntısını temizlemek için saf su ile mikroşırınganın parçaları çalkalanmalıdır. Grup halinde yapılan tohumlamadan sonra mikroşırınga

ucundaki semen ve mukus kalıntısı temizlenmelidir. Mikroşırınga fizyolojik solüsyon ile doldurulurken, önce şırınga silindiri metal gövdenin içine yerleştirilir ve metal gövdenin ucundan çıkan silindirin açık ağız işaret parmağı ile kapatıldıktan sonra yedek bir enjektöre çekilmiş solüsyon hava boşluğu bırakmadan doldurulur. Piston kolu gövde içindeki silindire sokularak vidalanır. Ardı sıra silikon hortum, mikroşırınga ucu ve kapağı takılarak kullanıma hazır hale getirilir. Piston kolu saat yönünde çevrildiğinde fizyolojik solüsyon mikroşırınga ucuna yönelir, ters yönde çevrildiğinde ise solüsyon geri çekilerek bir vakum oluşturulur. Gerekli semeni mikroşırınga ucuna çekebilmek için, piston kolu soldan sağa doğru (saat yönünde) çevrilerek cam uçtan toplanacak semen hacmi kadar fizyolojik sıvı boşaltılır ve mikroşırınga yapay tohumlama aletine vidalanır. Mikroskop büyütmesi ayarlanarak (10-15X) mikroşırınga ucu mikroskop görüntü alanında odaklanır.

Erkek Arıların Eversiyonu ve Semen Toplama

Yapay tohumlamada gerekli semenin elde edilmesinde çeşitli sorunlarla karşılaşılabilir. Rutin yapay tohumlama pratiklerinde bile yeterli sayıda erkek arı bulunmayabilmekte, ya da erkek arılar cinsel olgunluğa henüz ulaşmamış olabilmektedir. Bu sorunlarla karşılaşmamak için erkek arılara tohumlama öncesi iyi bakım yapılmalı ve soğuk yerde tutulmamalıdır.

Öğleden sonra çiftleşme uçuşu yapmaya hazırlanan erkek arılar kovan girişinde yakalanmalıdır. Uzun süre kafeslerde tutulan erkek arılardan semen toplamak güçtür. Eversiyon ve ejakülasyon, fiziksel ya da kimyasal (kloroform) uyarılarla teşvik edilmektedir. Eversiyonu fiziksel uyarıyla sağlanmak için; erkek arı sol elin baş ve işaret parmağı ile alt tarafı yukarıda olacak şekilde göğüs bölgesinden tutulur. Baş ve göğsün ön kısmına sol elin baş ve işaret parmağı ile baskı uygulanır. Eversiyondan sonra semen ortaya çıkmazsa, semen boşaltılana kadar karna yanlardan baskı uygulanmalıdır. Başarılı bir eversiyondan sonra krem renkli semen ve beyaz renkli mukus penis üzerinde görülür. Ergin olmayan erkek arıların ejakülatında sadece mukus bulunmaktadır. Ejakülasyon sonrası semen, mukus üzerine ince bir tabaka halinde yayılır ve güçlükle toplanabilir. Bu nedenle semen geciktirilmeden mikroşırıngaya çekilmelidir (Mackensen and Tucker 1970).

Ejakülasyon yapmış erkek arı sol elin işaret ve baş parmağı ile göğsünden tutularak mikroşırınga ucuna penis yaklaştırılır. Piston kolu soldan sağa doğru çevrilerek mikroşırınga ucunda hava boşluğu sağlanır ve semenin fizyolojik solüsyonla karışması engellenir. Semen yüzeyi 45° açı ile duran mikroşırınganın ucuna dokundurulur. Semen uca yapıştığı zaman, temas kopmaksızın erkek arı hafifçe mikroşırınga ucundan çekilir. Piston kolu aksi yönde (sağdan sola doğru) çevrildiğinde semenin uç boyunca hızla ve kolayca aktığı görülür. Bu işlem sırasında mikroşırınga ucuna mukus çekmemeye özen gösterilmelidir. Mukus, ucu geçemeyecek kadar kıvamlıdır ve ucu tıkayabilir. Bir erkek arıdan semenin tamamı toplandıktan sonra bir sonraki

erkek arının semeni çekilinceye kadar piston kolu sağdan sola çevrilerek mikroşırınga ucunda hava boşluğu oluşturulur. Bir sonraki erkek arının semeni uca çekileceği zaman; piston kolu ters yönde çevrilerek hava boşluğu uzaklaştırılır ve çekilen semen ucun ağızına yönlendirilerek ejakülasyon yapmış erkek arının penisi üzerindeki semen ile temas ettirilir. Temas sağlandıktan sonra semen önce açıklandığı gibi çekilmeye devam edilir. Böylece her erkek arıdan toplanan semen sütunu arasında hava boşluğu bırakılmaksızın mikroşırınganın kapasitesine bağlı olarak ve gereksinime göre birkaç erkek arıdan semen toplanabilir.

Bir erkek arının ürettiği spermatozoa bir ana arının sperm torbasını iki kez doldurmaya yetecek kadar olmasına karşın ana arı tek erkek arının semeniyle tohumlandığında az sayıda spermatozoa (1.39 milyon) sperm torbasına ulaşmaktadır (Woyke 1962). Ana arının sperm torbasına 4-5 milyon spermatozoa ulaşmasını sağlamak için 8 mm³ semenle tohumlanmalıdır. Ana arılar 18 mm³ 'e kadar semenle tohumlanabildiği halde, daha yüksek hacimlerde (20-36 mm³) ölüm oranı artmaktadır (Mackensen 1964). Özellikle seleksiyon programlarında ve genetik denemelerde ana arının sperm torbasında fazla sayıda spermatozoa olmasına gerek duyulmamaktadır. Amaç aynı erkek arının farklı analardan döllerini elde etmek olduğunda tek erkek arıdan sağlanan semenle birçok ana arı tohumlanabilmektedir. Kolonilerde birkaç ay tutulacak ana arıların tohumlanması için 2 mm³ semen yeterlidir (Harbo 1985).

Mikroskop altında mikroşırıngaya tek tek erkek arılardan semen toplama yerine çok sayıda erkek arıdan topluca semen elde etmek için basit ve hızlı bir yöntem geliştirilmiştir (Kaftanoğlu and Peng 1980). Yıkama tekniği denilen bu yöntemde fiziksel uyarılarla ejakülasyonu sağlanmış erkek arıların semeni ve mukusu yıkama hunisi ve toplama tüpündeki solüsyona (Kiev solüsyonu) sıyrılır. Semen mukus ve solüsyondan ayırmak için semen-mukus-solüsyon karışımı 2500 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edilmekte ve semen içeren toplama tüpü geniş kapasiteli şırıngaya tutturulmaktadır.

Yıkama yöntemi ile kısa sürede çok sayıda erkek arıdan semen toplanabilmesinin yanı sıra farklı kolonilerden (genotiplerden) erkek arıların semeninin homojen karışması da sağlanmaktadır. Ana arılar klasik yöntem uygulanarak toplanmış semenle tohumlandığı zaman tohumlamada kullanılan erkek arıların semenleri eşit oranlarda sperm torbasına ulaşmamaktadır (Laidlaw and Page 1984; Moritz' den 1989). Sonuçta, bir kolonideki döllerin babaları sadece birkaç erkek arı olabilmektedir. Tüm erkek arıların eşit oranda kolonide temsil edilmemeleri sorunu, ana arıları homojen karıştırılmış semenle tohumlayarak giderilebilmektedir.

Semeni homojen karıştırmak amacıyla semen hacminin 20 katında kapasitesi olan steril bir cam kap kullanılmaktadır. Semen 10 katı (1:10 sulandırma) solüsyon kap içine doldurulur ve sonra pipet ile çekilip boşaltılır; işlem solüsyon birörnek renk alıncaya kadar tekrar edilir. Homojenizasyon 1-2 dakikadan uzun sürmemelidir. Semen

süspansiyonu santrifüj tüpüne doldurulur ve 5 dakika 1000 devirde santrifüj edilir. Semen dipte tortulaştığı zaman üstteki sıvı hemen Pastör pipeti ile alınır. Semen santrifüj tüpünden mikroşırınga ucuna çekilir. Semen solüsyon içinde mümkün olduğu kadar kısa sürede tutulmalı ve ana arılara hemen enjekte edilmelidir.

Homojen karıştırma tekniğinde klasik tekniğe göre fizyolojik solüsyonun önemi daha da artmaktadır. Semen sulandırıldığı zaman her bir spermatozoonu çevreleyen semen sıvısı ortadan kalkmaktadır. Santrifüj sırasında suda eriyen proteinler spermatozoanın canlılığını azaltabilmektedir. Klasik yöntemde iyi sonuçlar veren Kiev solüsyonu bu teknikte yeterli olmamakta, en iyi sonuç Tris solüsyonu ile elde edilmektedir (Moritz 1984).

Ana Arının İğne Odacığının Açılması ve Enjeksiyon

Tohumlanacak ana arının yapay tohumlama aletine yerleştirilmesi için önce ana arı bir ucu kapalı gerileme tüpüne itilir. Gerileme tüpünde ilerleyen ana arı kapalı uca ulaştıktan sonra geriye dönerken ana arı tutucusunun tutucu borusu gerileme tüpü ile birleştirilir ve ana arının karın segmentlerinin tutucu borudan çıkması sağlanır. Ana arı tutucu borusu ana arı karının alt tarafı tohumlamacının sol koluna yönelik olacak şekilde takılır. Bu sırada, ana arının son üç karın segmentinin tutucu borudan çıkması sağlanmalı, bacakların boru içinde kalmasına özen gösterilmelidir (Laidlaw 1978, Schley 1982).

Ana arının doğru konumda yerleştirilmesinden sonra CO₂ gazını ileten plastik borunun ucu ana arı tutucusunun CO₂ gazı yoluna sokularak CO₂ tüpünün vanası açılır. Ana arı hareketsizleşince iğne kancası ve karın kancası ana arının tutucu borudan çıkan karın segmentlerine doğru yanaştırılır. Mikroskop görüntü alanında ana arının son karın segmenti odaklaştırılır ve önce karın kancası sonra da iğne kancası iğne odacığına sokulur. İğne odacığını açmak yapay tohumlamanın en kritik aşamalarından biridir. İğne odacığını çok geniş açma ya da tam olarak açmama vagina girişine şırınga ucunun sokulmasını güçleştirmektedir (Moritz 1989). Doğru açılan iğne odacığı (Şekil 5) mikroskop alanında simetrik (eşkenar üçgen) görünümündedir.

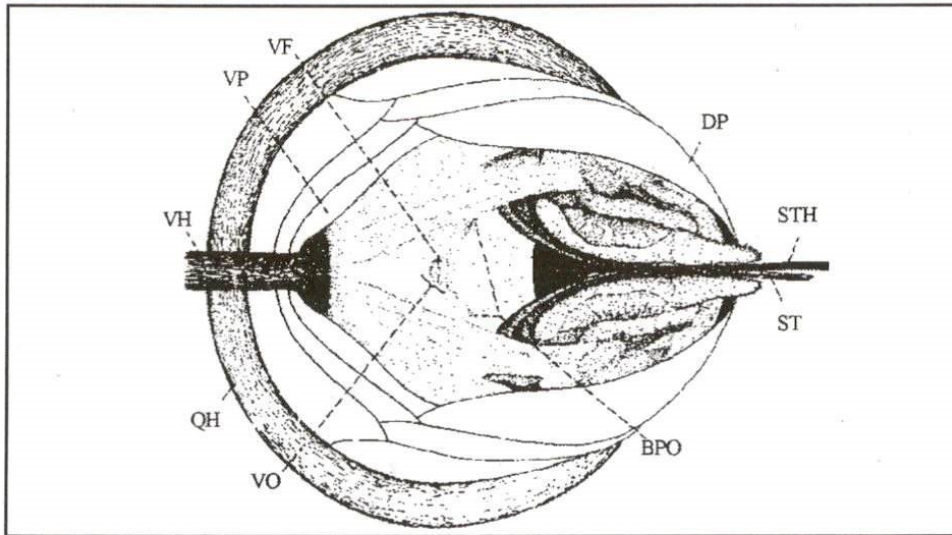
İğne odacığı açılan ana arıya enjeksiyon tamamlanıncaya kadar kancalara dokunulmamalıdır. Enjeksiyon için (Şekil 6) mikroşırınganın ucu vagina girişinin biraz üzerine doğru ayarlanır. Mikroşırınganın ucu ½ mm kadar vaginaya sokulur, hafifçe sola doğru hareket ettirilir ve mikroşırınga biraz daha eğilir. Sonra uç vaginaya 1.5 mm daha sokulur. Mikroşırınga yeterli derinliğe ulaşmadan önce çevresindeki doku hareket etmeye başlarsa muhtemelen uç vagina girişinin her iki yanında bulunan keselerden birine sokulmuştur. Bu durumda mikroşırınga geri çekilmeli ve ucu eğim

açısı hafifçe değiştirilerek uç sokulmalıdır. Uç sokulduktan sonra piston kolu çevrilerek semen yumurta kanallarına boşaltılmalıdır. Semen boşaltmak için mikroşırınganın piston kolu çevrildiğinde uçtaki semen sütunu hareket etmez ise uç geri çekilmelidir. Böyle bir durumda ya uç uygun şekilde yönlendirilmemiş ya da tıkanmıştır. Enjeksiyon sırasında şırınga ucu etrafında herhangi bir taşma olmaksızın ucun içindeki semen hareket etmeye başlarsa sorun yoktur ve enjeksiyon hemen tamamlanır (Moritz 1989). Semen başarıyla enjekte edildikten sonra CO₂ gazı vanası kapatılır, ana arı kancalardan kurtarılır ve tutucu borudan çıkartılır. Ana arı kendine gelmeden marka yapıştırılır, kanadı kesilir. Ana arı kendine geldikten sonra işçi arıların yoğun bakımını sağlamak için alındıkları ortama geri verilir.

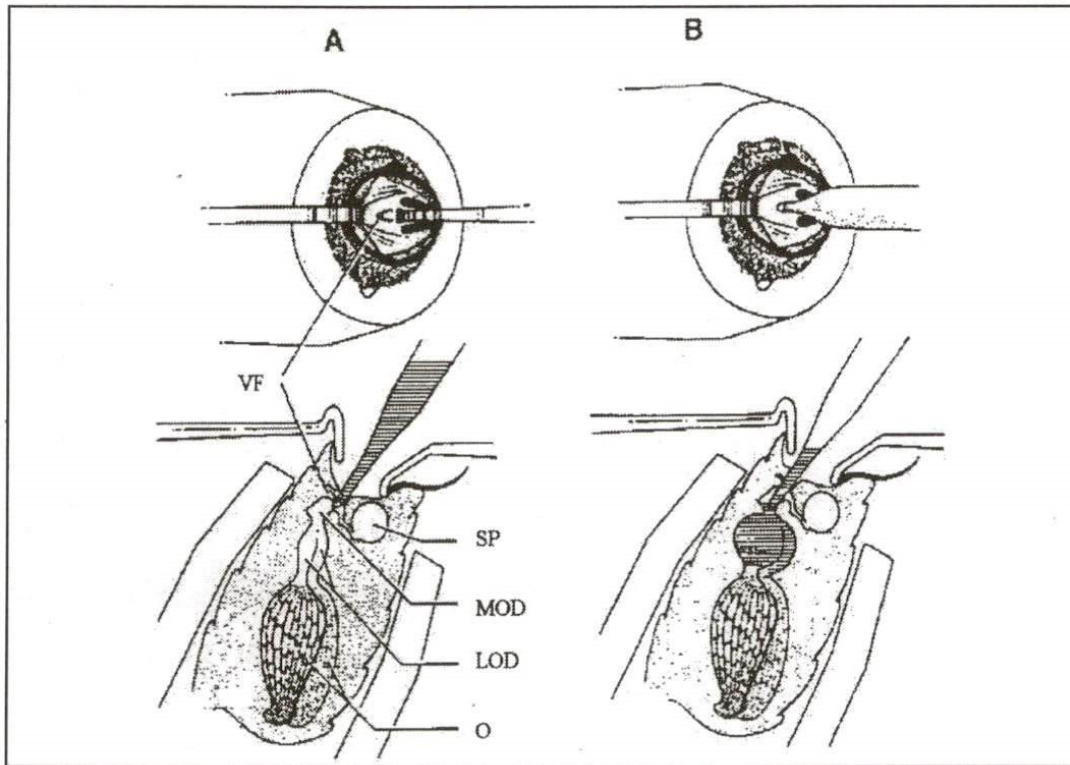
Pratikte çok önemli bir uygulama olmamakla birlikte sperm torbasına ulaşan spermatozoa sayısını arttırmak için semen ana arıya iki ayrı enjeksiyonda verilmektedir. Bu amaçla ana arı birinci tohumlamadan 1-2 gün sonra tekrar laboratuvara getirilerek tohumlanmaktadır. Ancak, bu uygulama ile sperm torbasına ulaşan spermatozoa sayısındaki artış fazladan işgücü harcamaya ve ana arının ölüm riskini göze almaya değmeyecek düzeydedir. İslah amaçlı çalışmalarda sadece birkaç ay kovanda tutulacak ana arıları 3-4 mm³ semenle bir kez tohumlama tatmin ediciyken, üretim kolonilerine verilecek ana arıların 3 mm³ semenle iki kez tohumlanması ile sperm torbasında yeterli spermatozoa sayısına ulaşılabilir (Mackensen 1964).

Tek tohumlamada ana arıya enjekte edilen semen hacmi artarken sperm torbasına ulaşan spermatozoa oranı düşmektedir (Woyke 1962, Mackensen 1964). Bir çalışmaya göre tek enjeksiyonda 1, 6 ve 20 mm³ semenle tohumlanan ana arıların sperm torbalarına ulaşan spermatozoa oranları %20, %10 ve %4' tür (Woyke 1962). Ana arılar iki kez tohumlandığında, ikinci tohumlamanın sperm torbasına ulaşan spermatozoa sayısına katkısı birincisinden daha azdır. İkinci tohumlamanın katkısı toplam tohumlama dozu büyürken azalmaktadır (Mackensen 1964, Woyke 1962). Ancak 2 mm³ lük dozlar ile iki kez tohumlama yapıldığında ikinci tohumlama ile sperm torbasına ulaşan spermatozoanın oranı birinci tohumlamaya göre daha yüksektir (Bolten and Harbo 1982).

Aynı hacimde semenin bir ya da iki tohumlamada enjekte edilmesinin sonuçları karşılaştırılmış ve semen iki eşit doza bölünerek verildiğinde sperm torbasına daha fazla spermatozoa girdiği saptanmıştır. Bununla birlikte 8mm³ semen dozuna kadar tek ya da iki tohumlama sonucu arasında önemli bir fark olmadığı gibi 6 mm³ 'e kadar küçük dozlarla iki tohumlama yapmanın bir üstünlüğü yoktur (Woyke 1962). Enjekte edilecek semen hacmi 10 mm³ ya da üzerinde ise bu hacim iki uygulama ile ana arıya verilmelidir (Woyke 1989a).



Şekil 5. Ana arının tam olarak açılmış iğne odacığı: BPO, yan keseler; DP, tergit; QH, ana arı tutucusu; ST, iğne; STH, iğne kancası; VO, vagina ağzı; VF, vagina valfi; VH, karın kancası; VP, sternit (Mackensen and Tucker 1970)



Şekil 6. Mikroşırınga ucunun sokulması (A) ve enjeksiyon (B): SP, sperm torbası; MOD, ana yumurta kanalı; LOD, yan yumurta kanalı; O, yumurtalıklar; VF, vagina valfi (Harbo 1985).

YAPAY TOHURLAMA BAŞARISINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Semenin Muhafazası

Ana arı yumurtlamaya başladıktan sonra tekrar çiftleşmemektedir. Çiftleşmenin ardından spermatozoa sperm torbasında çok düşük metabolik konumda depolanmakta (Taber and Blum 1960) ve sperm torbasını çevreleyen trake ağı torba duvarını oluşturan hücrelere oksijen sağlayarak ana arının

yaşamı boyunca spermatozoanın canlı kalmasını sağlamaktadır (Verma 1974).

Semenin toplandığı anda kullanılması zorunlu değildir. Mikroşırınga ucunda birkaç saat canlı kalabilmektedir. Semen 1-2 gün bekletilmesi gerekiyorsa 5-15 °C' de muhafaza edilmelidir (Harbo 1985). Kurumaya karşı korumak koşuluyla seyreltilmemiş taze semen oda sıcaklığında 2-3 gün yaşayabilmektedir (Ruttner and Triyasko 1975).

Bal arısı semeni depolama yöntemlerinin tümünde uçları kapatılmış kılcal cam tüpler kullanılmaktadır. Bal arısı semeni için ne standart bir

sulandırıcı ne de standart bir sulandırma oranı vardır. Semen düşük oranda sulandırılacağı zaman (10:1, semen : sulandırıcı) herhangi bir sulandırıcı kullanılabilmektedir. Oysa, yüksek sulandırma oranlarında (1:10 ya da 1:100) sulandırıcının içeriği önem taşımaktadır (Harbo 1989).

Donma derecesinin üzerinde semen depolamada sıcaklık 13-25 °C arasında olmalıdır. Bal arısı semeninin uzun süre depolanması üzerinde ilk çalışan Taber ve Blum (1960), semenin kılcal tüplerde oda sıcaklığında 68 güne kadar başarıyla depolanabildiğini ve dölleme yeteneğini kaybetmediğini göstermişlerdir. Uçları kapatılmış kılcal tüpler içinde 27-68 gün oda sıcaklığında (22.2-30 °C) ve 32.2 °C' de depolanan semenle tohumlanan ana arılar döllü yumurta üretebilmişler, fakat 35 °C' de depolanmış semenle tohumlanan ana arılardan başarı elde edilememiştir (Taber and Blum 1960).

Semenin 2 °C (Taber and Blum 1960), 5 °C ve 10 °C' de (Harbo and Williams 1987) depolanması spermatozoa ölüm oranının yükselmesine neden olmaktadır. Uzun süreli depolamada (13-35 hafta) 13-15 °C, oda sıcaklığına (24 °C) göre daha uygundur. Kısa süreli depolamada (2 gün) ise optimum sıcaklık 21 °C' dir (Harbo and Williams 1987). Semen 10 °C ve daha düşük sıcaklıklarda depolandığında sperm torbasına ulaşan spermatozoa sayısı daha azdır ve spermatozoa mobilitesi 15 °C' de depolanmış semene göre daha yüksektir.

İki gün 20 °C' de depolanan semenle tohumlanan ana arıların sperm torbalarına ulaşan spermatozoa sayısı 15 °C' de depolanan semenle tohumlanana göre daha fazladır. Buna karşın 15 °C' de depolanan semen 13 haftalık bir sürede 24 °C' de depolananlardan daha etkin olmaktadır (Poole and Taber 1970). Bu çalışmalardan da anlaşıldığı gibi donma sıcaklığı üzerindeki optimal depolama sıcaklığı, depolama süresiyle değişmektedir. Donma sıcaklığının altında depolama çalışmalarında ilk başarılı uygulamalar Savada ve Chang (1964) 'ın kuru buzda (-79 °C) ve Melnichenko ve Vavilov (1978)'un sıvı azotta (-196 °C) depolama çalışmalarıdır (Harbo 1989). Sıvı azotta semen depolandığı zaman, donma tehlikesine karşı korumak için sulandırıcıya genellikle bir kimyasal katılmalıdır. En uygun sulandırma oranları %10 dimetil sülfoksit (DMSO), %40 sulandırıcı solüsyon, %50 semendir.

Sıvı azotta depolanan spermatozoanın daha düşük bir göç etkinliği vardır (Bolten and Harbo 1982). Yaklaşık bir yıl sıvı azotta (-196 °C) depolanmış semenle tohumlanan ana arıların yumurtlama etkinliği koloni gücünü korumak için yeterli değildir (Kaftanoğlu and Peng 1984). Sıvı azotta depolanmış semenin küçük dozlarda ana arıya enjekte edilmesi sperm torbasına ulaşan spermatozoa sayısını arttırmaktadır (Bolten and Harbo 1982).

Ana Arı Yetiştirme Koşulları

Yumurtalardan ya da genç larvalardan yetiştirilen ana arılar daha ağırdır, yumurtalıklarında daha fazla yumurta tüpü vardır ve sperm torbaları daha büyüktür. Henüz çiftleşmemiş ana arıların

canlı ağırlığı ile yumurta tüpü sayısı ve sperm torbasının hacmi arasında yüksek korelasyonlar saptanmıştır (Woyke 1971). Gerek yapay tohumlanmış gerek doğal çiftleşmiş ana arıların sperm torbası çapı ve sperm torbasındaki spermatozoa sayısı arasındaki korelasyon da yüksektir.

Ana arılar 1mm³ semenle tohumlandıktan sonra sperm torbasına giren spermatozoa sayısı ve sperm torbasının hacmi arasındaki korelasyon (r=0.50) düşüktür. Oysa 8 mm³ semenle tohumlanmış ana arılarda bu korelasyon (r=0.84) yüksek bulunmuştur (Woyke 1971).

Tohumlama Öncesi ve Sonrası Ana Arıların Muhafazası

Yapay tohumlama öncesi ve sonrası ana arılar; (a) ana arısız bir kolonide bireysel kafesler içinde, (b) çiftleştirme kutularında, (c) birkaç yüz işçi arı içeren küçük kutularda muhafaza edilebilmektedirler.

Tohumlama öncesi ve sonrası ana arıyı kafeslere koyarak ana arısız bir kolonide depolama yaygın kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, zaman kaybını ortadan kaldırması, ana arıların çiftleşme uçuşu yapma riskinin olmaması gibi nedenlerle tercih edilmektedir. Fakat bu muhafaza yönteminin ana arıların işçi arılarca yıpratılması, tohumlamadan sonra yumurta kanallarında semen kalıntısının olması, sperm torbasına giren spermatozoa sayısının az olması gibi kötü yanları vardır.

Kafeslerde muhafaza edilen ana arıların duyargaları, bacakları ve kanatları işçi arılar tarafından ısırılmaktadır. Ana arının bacağındaki aroliumun ısırılması ve koparılması sonunda işçi arıların ana arı yetiştirmesine engel olan ayak izi feromonu salgılanamamakta ve bu şekilde yıpratılmış ana arılar işçi arılar tarafından değiştirilmektedirler (Woyke 1989b). Ana arıları kafeslemenin diğer bir olumsuz yönü tohumlamadan sonra yan yumurta kanallarında semen kalıntısının kalmasıdır. Doğal çiftleşmede olduğu gibi yapay tohumlamada da semen ana arının yumurta kanallarına enjekte edilmekte ve buradan sperm torbasına geçmektedir. Doğal çiftleşmiş ana arılardan farklı olarak yapay tohumlanmış ana arılar 24 saat içinde tamamen yumurta kanallarını temizleyememektedirler (Vesely 1970, Woyke 1962). Yapay tohumlanmış ana arıların sperm torbalarına spermatozoanın giriş dinamiği ve süresi hem enjekte edilen semen hacmine hem de tohumlamadan sonra ana arıların muhafaza koşullarına bağlıdır.

Küçük dozlarla (1-2 mm³) tohumlanan ana arılarda sperm torbasına spermatozoa göçü 4-8 saat sonra büyük ölçüde tamamlanmaktadır; fakat 8 mm³ 'lük enjeksiyonda göç yavaş seyrederek en az 40 saat sürmektedir. Tohumlamadan sonraki 48 saat içinde bakıcı işçi arıların ana arıyla teması sperm torbasına göçü hızlandırdığı için ana arıların tohumlamadan sonra kapalı kafeslerde tutulmaları önerilmektedir. Yumurta kanallarında semen kalıntısı bakteri gelişmesine uygun bir ortam olduğundan tohumlamadan sonra kafeste tutulan ana arıların ölüm oranı daha yüksektir (Woyke 1979).

Tohumlama sonrası kafeste tutulan ana arılarda sperm torbasına giren spermatozoa sayısı da az olmaktadır. Bir çalışmada 6 mm³ 'lük semenle tohumlanan ve sonra çiftleştirme kutusu içinde bir kafeste tutulan ana arılarda 3.9 milyon, aynı hacim semenle tohumlandıktan sonra çiftleştirme kutusunda serbest hareket eden ana arılarda 4.9 milyon spermatozoa olduğu bulunmuştur (Vesely 1970). Diğer bir çalışmada ise 8 mm³ semenle tohumlanan ve kafeslenen ana arılarda 3 milyon, serbest dolaşanlarda 5.1 milyon spermatozoa saptanmıştır (Woyke 1979).

Düşük hacim (1-2 mm³) semenle tohumlama sonrası ana arıya bakıcılık yapan işçi arıların olmasının spermatozoa girişine katkısı yoktur. Ana arı 4 ya da 8 mm³ semenle tohumlanıyor ise ana arının bakıcı işçi arılarla teması torbaya ulaşan spermatozoa sayısını artırmaktadır. Tohumlamadan sonra kafeste tutulacak ana arının sperm torbasına 3 milyonun üzerinde spermatozoa girebilmesi için 3 mm³ ya da daha düşük hacimde semen ana arıya birden fazla enjeksiyonla verilmelidir (Harbo1985).

İkinci yöntem ana arıları tohumlamadan önce ve sonra çiftleştirme kutularında muhafaza etmektir. Çiftleştirme kutularındaki işçi arı sayısı da yapay tohumlama sonuçlarını etkilemektedir. Çiftleştirme kutularında 350'den fazla işçi arı olduğunda ana arıların yumurta kanallarının temizliği, sperm torbasındaki spermatozoa sayısı ve yumurtlamaya başlama bakımından yeterli sonuçlara ulaşılabilir (Woyke and Jasinski 1982). Çiftleştirme kutusunda en az bir petek üzerinde kapalı yavru alanı olmalı ve kutunun girişine ana arı ızgarası takılmalıdır.

Yapay tohumlanmış ana arılar sürekli çiftleştirme kutularında kalmazlar. Bu ana arılar ya satılır ya da ana arısız kolonilere verilir. Bu nedenle, ana arıları birkaç gün muhafaza etmek için çiftleştirme kutuları oluşturmak pratik bir uygulama değildir (Woyke 1989b). Ana arıları çiftleştirme kutuları yerine 12x12x6 cm boyutlarında küçük kutularda muhafaza etmek daha uygun bir yöntemdir. Bu muhafaza yönteminde her bir kutuya bir parça kabartılmış petek, kek, su ve işçi arılar sağlanır. İşçi arılar CO₂ gazı ile bayıltılarak kutuya doldurulur ve işçi arılar baygınken ana arı kutuya bırakılır.

Tohumlama öncesi küçük kutuda ana arıya bakıcılık yapan işçi arı sayısı (20-500 arasında) tohumlama sonuçlarını etkileyen önemli bir faktör olmamakla birlikte tohumlamadan sonra önem kazanmaktadır. Tohumlamadan sonra oda sıcaklığında (20 °C) tutulan kutularda 350 bakıcı işçi arı olması önerilmektedir. Oda koşullarındaki kutularda 20'den 350'ye kadar artan sayıda işçi arılarla muhafaza edilen ve 8 mm³ semenle tohumlanan ana arıların sperm torbalarına ulaşan spermatozoa sayısı 1.8 milyondan 4.1 milyona kadar artış gösterebilmektedir (Woyke and Jasinski 1980).

Tohumlama Sonrası Sıcaklık

Tohumlama sonuçları ana arıların tohumlama sonrası bulundukları ortamın sıcaklığına da bağlıdır. Bir çalışmada 8 mm³ semenle tohumlandıktan sonra 10 bakıcı işçi arıyla 34 °C' de tutulan ana arılarda

spermatozoa sayısı (4 milyon) 24 °C' de tutulandan (3.1 milyon) daha fazla bulunmuştur (Woyke and Jasinski 1973). Diğer bir araştırmada ise 2, 4 ve 6 mm³ semenle tohumlamadan sonra oda sıcaklığında tutulan ana arıların sperm torbalarına 34 °C' de tutulan ana arılara göre daha az spermatozoa girdiği ve yumurta kanallarında daha fazla semen kalıntısının olduğu saptanmıştır (Vesely 1970).

Ana arılar tohumlandıktan sonra kuluçka sıcaklığından (34 °C) yüksek sıcaklıklarda (37.5-40 °C) tutulduklarında keseye ulaşan spermatozoa sayısı yine azalmakta ve ana arı ölüm oranları artmaktadır (Mackensen 1969). Özet olarak, kuluçka sıcaklığının (34 °C) hem altındaki hem de üstündeki sıcaklıklarda başarı oranı düşmektedir.

Mevsim

Ana arıları yetiştirme zamanı ve meteorolojik koşullar ana arının gelişme süresini ve cinsel olgunluk yaşını etkilemektedir (Fresnaye 1966). Doğal çevredeki mevsimsel değişiklikler yapay tohumlamanın başarısında önemli bir faktördür (Moritz and Kühnert 1984). Mevsimin ilerlemesiyle tohumlamadan sonraki ana arı kayıpları artmaktadır. Diğer yandan ovipozisyonun başlaması mevsimsel değişikliklerden etkilenmektedir. Erken mevsimde tohumlanan ana arılar yumurtlamaya çok erken (5.7 ± 0.25 gün) başlamaktadırlar. Yumurtlamaya başlama süresi mevsimin ilerlemesi ile (14.3 ± 0.85 gün) artmaktadır.

Erkek Arı Yaşı

Yapay tohumlamanın başarısı erkek arı yaşına da bağlıdır. Çok genç erkek arılar (1-2 günlük) semen ve mukus üretemezler. Cinsel olgunluğa ulaşmış 10-12 günlük yaştaki erkek arılar mukus üzerinde rahatlıkla ayırt edilebilen kremsi-sarı renkli semen üretirler. Dört haftadan fazla yaştaki erkek arıların semenini mikrosiringaya çekmek daha güçtür (Woyke and Jasinski 1978).

Ana arılar 2-9 hafta arasındaki yaşta erkek arılardan toplanan semenle tohumlandıklarında yaş arttıkça sperm torbasına giren spermatozoa sayısı azalmaktadır (Woyke and Jasinski 1978). Diğer yandan 3 haftadan yaşlı erkek arılar ana arılarda hastalığa neden olmaktadır (Mackensen and Tucker 1970). Bu nedenlerden dolayı özellikle tohumlamadan sonra bakıcı işçi arıların temasının mümkün olmadığı kafeslerde tutulacak ana arılar 3 haftadan daha yaşlı erkek arıların semeniyle tohumlanmamalıdır. Erkek arılar için ideal bir yaş olmakla birlikte, sağlık ve korunma önlemleri alındığı takdirde yaşlı erkek arılar da kullanılabilir, 4 mm³ ve daha az hacimde enjeksiyon uygulanması halinde yaşlı erkek arıların neden olduğu sorunlar ortadan kaldırılabilir.

Ana Arı Yaşı

Sperm torbasına giren spermatozoa sayısı, ana arıların yaşama gücü ve tohumlamadan sonra yumurtlamaya başlama zamanı ana arıyı tohumlama yaşına bağlı olarak değişmektedir. Genç

ana arıların tohumlama sonrası yaşama gücü zayıftır (Fresnaye 1966, Woyke and Jasinski 1976). Ana arılar 5 günlük yaşın altında tohumlandıklarında yaşama gücü ve spermatozoa sayısı düşük, 5 günlük yaşta tohumlandıklarında ise spermatozoa sayısı ve yaşama oranı yüksektir. En iyi sonuçlar (%100 yaşama gücü, 3.9 milyon spermatozoa) 7-8 günlük yaşta ana arılardan elde edilmektedir. Çok yaşlı (47 gün ve daha fazla) ana arılar tohumlanabilmelerine karşın hem yaşama oranı düşmekte hem de sperm torbasına ulaşan spermatozoa sayısı azalmaktadır. A. Ü. Ziraat Fakültesi Zootehni Bölümü'nce yürütülen bir araştırmada da (Gençer 1989); 3, 7, 10, 16 ve 21-26 günlük yaşlarda tohumlanan ve ana arısız bir kolonide iki gün bireysel kafeslerde tutulan ana arıların sperm torbalarına ulaşan spermatozoa sayıları değerlendirilmiş ve en iyi sonuçlar 7 günlük yaşta ana arılardan elde edilmiştir.

Fresnaye (1966) ana arıların cinsel olgunluğa ulaşma yaşında mevsim faktöründen kaynaklanan bir varyasyon olduğunu ileri sürmekte ve mevsim başında yetiştirilen ana arıların 10-12 günlükken, mevsim ortasında yetiştirilenlerin ise 5-6 günlükken tohumlanmalarını önermektedir.

CO₂ Uygulaması

Tohumlama işlemi sırasında ana arının bayıltılması ve tohumlamadan sonra ovipozisyonun uyarılması için CO₂ uygulanmaktadır. Tohumlamadan sonra ikinci kez CO₂ uygulanan ana arılar 2-6 gün sonra yumurtlamaya başlamasına karşın, uygulanmayan ana arılar 6 haftalık yaşa kadar yumurtlamaya başlamamaktadırlar (Mackensen 1947).

CO₂ 'in ana arılar üzerine fiziksel ve fizyolojik etkileri tam olarak anlaşılmış değildir, fakat bazı zararlı etkileri olduğu görüşü yaygındır. Bu konuda yapılan araştırmalara göre; CO₂ narkozu ana arılarda ağırlık kaybına (Harbo 1986) ve ana arıların performanslarının düşmesine (Harbo and Szabo 1984) neden olmaktadır.

CO₂ uygulamasının başladığı ilk yıllarda ovipozisyonu uyarmak için 10 dakikalık süre önerilmiş olmakla birlikte daha sonra yapılan çalışmalarda bu sürenin gereğinden uzun olduğu, 10 dakika yerine 1-2 dakikalık sürenin yeterli olduğu belirtilmiştir (Cobey 1983). CO₂ 'in olumsuz etkileri araştırmacıları alternatif narkoz yöntemlerine ve maddelerine yönlendirmektedir. CO₂ 'in %100 konsantrasyonda uygulanması yerine %75 oranında seyreltilerek kullanımından başarılı sonuçlar alınmıştır (Ebadi and Gary 1980). CO₂ 'in alternatifi olarak denenen N₂ ise her ne kadar CO₂ gibi ana arıyı hareketsizleştirmese de ana arıda ağırlık kaybının daha az olması, ovipozisyon oranının yükselmesi ve ana arının günde daha fazla yumurtlaması gibi üstünlükleri nedeniyle önerilmektedir (Harbo 1986).

SONUÇ

Bal arılarında yapay tohumlama tekniği arıların küçük anatomik yapıları nedeniyle diğer çiftlik hayvanlarındaki yapay tohumlama uygulamalarına göre güç olmakla birlikte ıslah çalışmalarının

yürütülmesinde gerekli ve önemli bir araçtır. Yine diğer türlerle göre bal arılarında denetimli çiftleşmenin sağlanabilmesinde gerekliliği daha fazladır.

Son yıllarda entegre arıcılığın önemli bir parçası haline gelen yapay tohumlama, geniş çapta başarıyla kullanılan ileri bir tekniktir. Ancak tekniğin uygulanması için özel ve pahalı ekipmana ve uzmanlaşmış elemanlara gerek duyulmaktadır. Tekniği öğrenmek ise güç değildir. Deneyimli bir uzman yardımı ile tekniği öğrenmek mümkündür. Damızlık sorunuyla karşı karşıya olan ülkemizde de ıslah çalışmalarına hız kazandırmak için yapay tohumlama tekniğinin yaygınlaştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Bolten AB, Harbo JR (1982) Numbers of spermatozoa in the spermatheca of the queen honeybee after multiple inseminations with small volumes of semen. *J. of Apic. Res.*; 21 (1): 7-10.
- Cobey S (1983) Instrumental insemination: Current developments and its application today. *Am. Bee J.*; 123(3): 182-186.
- Ebadi R, Gary NE (1980) Factors affecting survival, migration of spermatozoa and onset of oviposition in instrumentally inseminated queen honeybees. *J. of Apic. Res.*; 19 (2): 96-104.
- Fresnaye J (1966) Influence des variations de l'age de maturité sexuelle chez les reines d'abeilles *Apis mellifica* fécondées par insemination artificielle. *Ann. Abeille*; 9(3): 237-242.
- Gençer HV (1989) Yapay olarak döllenmiş ana arıların sperma keselerine ulaşan sperma miktarına ana arı yaşının etkisi. A. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi (yayınlanmamış), Ankara.
- Harbo JR (1985) Instrumental insemination of queen bees. *Am. Bee J.*; 125: 197-202, 282-287.
- Harbo JR (1986) Oviposition rates of instrumentally inseminated and naturally mated queen honeybees (Hymenoptera: Apidea). *Ann. Ent. Soc. Am.*; 79: 112-115.
- Harbo JR (1989) Sperm storage. In: R.F.A. Moritz (editor), *The Instrumental Insemination of the Queen Bee*. p. 59-64. Apimondia.
- Harbo JR, Szabo TI (1984) A comparasion of instrumentally inseminated and naturally mated queen honeybees. *J. of Apic. Res.*; 23 (1): 31-36.
- Harbo JR, Williams JL (1987) Effect of above-freezing temperatures on temporary storage of honeybee spermatozoa. *J. of Apic. Res.*; 26 (1): 53-55.
- Kaftanoğlu O, Peng YS (1980) Av washing technique for collection of honeybee semen. *J. of Apic. Res.*; 19 (3): 205-211.
- Kaftanoğlu O, Peng YS (1982) Effect of insemination on the initiation of oviposition in the queen honeybee. *J. of Apic. Res.*; 21 (1): 3-5.
- Kaftanoğlu O, Peng YS (1984) Preservation of honeybee spermatozoa in liquid nitrogen. *J. of Apic. Res.*; 23 (3): 157-163.
- Koeniger G, Ruttner F (1989) Mating behaviour and anatomy of the reproductive organs. In: R.F.A. Moritz (editor), *The Instrumental Insemination of the Queen Bee*. p. 19-34. Apimondia.

- Kühnert M, Laidlaw HH (1994) Simplified apparatus for instrumental insemination of queen bees with the 'flexible insemination technique'. *Apidologie*; 25: 144-154.
- Laidlaw HH (1978) Instrumental Insemination Honeybee Queens. Pictorial Instructional Manual. A Dadant Publication. Dadant and Sons, Hamilton, Illinois.
- Laidlaw HH (1989) Origin and development of instrumental insemination of queen bees. In: R.F.A. Moritz (editor), *The Instrumental Insemination of the Queen Bee*. p. 9-17. Apimondia.
- Lodesani M, Nanetti A, Carpana E (1991) Studio sull'attività di colonie *Apis mellifera ligustica* con regine inseminate strumentalmente e con regine ad accoppiamento naturale. *Apicoltura*; 7: 101-112.
- Mackensen O (1947) Effect of carbondioxide on initial oviposition of artificially inseminated and virgin queen bees. *J. of Econ. Ent.*; 40: 344-349.
- Mackensen O (1964) Relation of semen volume to success in artificial insemination of queen honeybees. *J. of Apic. Res.*; 57 (4): 581-583.
- Mackensen O (1969) Effect of diluents and temperature on instrumental insemination of queen honeybees. *J. of Econ. Ent.*; 62 (6): 1370-1372.
- Mackensen O, Tucker KW (1970) Instrumental insemination of queen bees. *Agriculture Handbook No:390. ARS,USDA*.
- Mackensen O, Ruttner F (1975) Durchführung der besamung. In: F. Ruttner (editor), *Die Instrumentelle Besamung der Bienenkönigin*. p. 40-69. Apimondia, Bukharest.
- Maul V (1972) Knowledge obtained from instrumental insemination; inbred sex linked genetic defects. *Bienenzucht*; 25 (6): 190-191. (*Apic. Abstr.*; 1974, 25 (4): 40).
- Moritz RFA (1984) The effect of different diluents on insemination success in the honeybee using mixed semen. *J. of Apic. Res.*; 23 (3): 164-167.
- Moritz RFA (1989) The insemination procedure. In: R.F.A. Moritz (editor), *The Instrumental Insemination of the Queen Bee*. p. 65-84. Apimondia.
- Moritz RFA, Kühnert M (1984) Seasonal effects on artificial insemination of honeybee queens (*Apis mellifera* L.) *Apidologie*; 15 (2): 223-231.
- Nelson DL, Laidlaw HH (1988) An evaluation of instrumentally inseminated queens shipped in packages. *Am. Bee. J.*; 128 (4): 279-280.
- Poole K, Taber ST (1970) In vitro preservation of honeybee semen enhanced by storage at 13-15°C. *Ann. Ent. Soc. Am.*; 63: 1673-1674.
- Ruttner F, Tryasko VW (1975) Anatomie und physiologie der fortpflanzung. In: F. Ruttner (editor), *Die Instrumentelle Besamung der Bienenkönigin*. p. 11-24. Apimondia, Bukharest.
- Schley P (1982) *Praktische anleitung zur instrumentellen besamung von bienenköniginnen*. Selbstverlag, Giessen.
- Schley P (1988) An important improvement in the insemination technique of queen honeybees. *Am. Bee J.*; 128 (4): 282-284.
- Taber S, Blum MS (1960) Preservation of honeybee semen. *Science*; 131 (3415): 1734-1735.
- Verma LR (1974) Honeybee spermatozoa and their survival in the queen's spermatheca. *Bee World*; 55(2): 53-61.
- Vesely V (1970) Retention of sperm in the lateral oviducts of artificially inseminated honeybee queens. *Acta Entomol. Bohemoslovaca*; 67: 83-92.
- Woyke J (1962) Natural and artificial, insemination of honeybees. *Bee World*; 43: 21-25.
- Woyke J (1971) Correlations between the age at which honeybee brood was grafted, characteristics of resultant queens, and result of insemination. *J. of Apic. Res.*; 10 (1): 45-55.
- Woyke J (1979) Effect of the access of worker honeybees to the queen on the results of instrumental insemination. *J. of Apic. Res.* 19 (2): 136-143.
- Woyke J (1985) Instrumental insemination of honeybee queens in the development of bee keeping. *World Animal Review*; 56: 40-44.
- Woyke J (1989a) Results of instrumental insemination. In: R.F.A. Moritz (editor), *The Instrumental Insemination of the Queen Bee*. p. 93-103. Apimondia.
- Woyke J (1989b) Maintenance of queens before and after instrumental insemination. In: R.F.A. Moritz (editor), *The Instrumental Insemination of the Queen Bee*. p. 85-91. Apimondia.
- Woyke J, Jasinski Z (1973) Influence of external conditions on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated honeybee queens. *J. of Apic. Res.*; 12 (3): 145-149.
- Woyke J, Jasinski Z (1976) The influence of age on the results of instrumental insemination of honeybee queens. *Apidologie*; 7(4): 301-306.
- Woyke J, Jasinski Z (1978) Influence of age of drones on the results of instrumental insemination of honeybee queens. *Apidologie*; 11(2): 173-179.
- Woyke J, Jasinski Z (1980) Influence of the number of the attendant workers on the results of instrumental insemination of honeybee queens kept at room temperatures. *Apidologie*; 11(2): 173-180.
- Woyke J, Jasinski Z (1980) Influence of the number of the attendant workers on the number of spermatozoa entering the spermatheca of instrumentally inseminated queens kept outdoors in mating nuclei. *J. of Apic. Res.*; 21 (3): 129-133.