

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Vinko TREVEN

USPEŠNOST MEDONOSNE ČEBELE PRI PRENOSU
BIOTIČNEGA SREDSTVA GLIVE *Gliocladium*
catenulatum

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij – 2. stopnja)

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ STRUKTURNE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Vinko TREVEN

**USPEŠNOST MEDONOSNE ČEBELE PRI PRENOSU BIOTIČNEGA
SREDSTVA GLIVE *Gliocladium catenulatum***

MAGISTRSKO DELO

(Magistrski študij – 2. stopnja)

**EFFECTIVENESS OF HONEYBEES FOR APPLYING THE
FUNGAL BIOCONTROL AGENT *Gliocladium catenulatum***

M. Sc. Thesis

(Master Study Programmes)

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje strukturne in funkcionalne biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Opravljeno je bilo na nasadu jagod v Dvorski vasi 24a, Begunje na Gorenjskem, in Oddelku za entomologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani. Laboratorijska analiza vzorcev je potekala na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani. Statistična obdelava podatkov je bila opravljena na Oddelku za entomologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje in Senat Oddelka za biologijo sta dne 6. 2. 2013 odobrila naslov magistrskega dela in za mentorja imenovala prof. dr. Andreja Čokla, za somentorja dr. Danila Bevka in za recenzenta prof. dr. Janka Božiča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan KOS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Andrej ČOKL
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za entomologijo

Član: dr. Danilo BEVK
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za entomologijo

Član: prof. dr. Janko BOŽIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 25. 2. 2015

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Vinko Treven

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 582:595.7:632.95(043.2)=163.6
- KG biokontrola/*Gliocladium catenulatum*/pašna dejavnost/učinkovitost/
vračanje/vedenje/*Apis mellifera carnica*
- AV TREVEN, Vinko, diplomiran biolog (UN)
- SA ČOKL, Andrej (mentor)/BEVK, Danilo (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij strukturne in funkcionalne biologije
- LI 2015
- IN USPEŠNOST MEDONOSNE ČEBELE PRI PRENOSU BIOTIČNEGA SREDSTVA GLIVE *Gliocladium catenulatum*.
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
- OP VIII, 56 str., 3 pregl., 28 sl., 83 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Siva plesen (*Botrytis cinerea*) je ena glavnih boleznij jagod. Zatiramo jo s fungicidi ali z biotičnimi sredstvi. Za prenos slednjih lahko namesto škropljenja uporabimo tudi čebele. Na podlagi pašne aktivnosti čebel na cvetovih, količini biokontrolnega sredstva na čebelah in njegovega učinka na zdravje jagod, smo ugotavljali učinkovitost čebel pri prenosu sredstva Prestop Mix (PM), ki vsebuje spore glive *Gliocladium catenulatum*, na cvetove jagod. Zanimal nas je tudi vpliv PM na sposobnost vračanja čebel v panj in na njihovo vedenje v izboljššanem razdelilniku, v primerjavi s predhodnim opazovanjem. Pašna dejavnost čebel na cvetovih jagod je bila največja zgodaj popoldan in je bila primerljiva po vsem nasadu. Količino spor na čebelah smo določili z nanosom na glivna gojišča. Največ spor so imele na sebi čebele, ki so izletavale in se vračale takoj po dodatku PM v razdelilnik, vendar vračajoče 15-krat manj. Količina spor je nato neenakomerno upadala. PM je delež zdravih jagod povečal približno za polovico. Pri ugotavljanju vpliva PM na vračanje smo tretirane in netretirane čebele izpustili 40 m stran od panja. PM je čas vračanja podaljšal, ni pa vplival na stopnjo vračanja čebel do večera. Vedenje čebel v izboljššanem razdelilniku smo spremljali s kamero in ugotovili, da je PM vplival na vedenje čebel v razdelilniku, vendar bistveno manj kot v predhodni raziskavi. PM takoj po aplikaciji ni izzval agresivnega vedenja, v primerjavi s prejšnjim opazovanjem je bil v razdelilniku prisoten dlje časa. Za boljši prenos sredstva predlagamo dodajanje PM v razdelilnik v sredini dneva. Predlagamo tudi spremembo pripravka PM, da bo negativen vpliv na čebele še manjši.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDK 582:595.7:632.95(043.2)=163.6
- CX biocontrol/*Gliocladium catenulatum*/foraging/effectiveness/homing/behavior/*Apis mellifera carnica*
- AU TREVEN, Vinko
- AA ČOKL, Andrej (supervisor)/BEVK, Danilo (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programmes Structural and functional Biology
- PY 2015
- TI EFFECTIVENESS OF HONEYBEES FOR APPLYING THE FUNGAL BIOCONTROL AGENT *Gliocladium catenulatum*
- DT M. Sc. Thesis, (Master Study Programmes)
- NO VIII, 56 p., 3 tab., 28 fig., 83 ref.,
- LA sl
- AL sl/en
- AB Grey mold (*Botrytis cinerea*) is one of the most important strawberry diseases. It can be suppressed by fungicides or by biocontrol agents, which can, instead of sprinkling it, be spread by using bees. We discovered bee's efficiency to spread biocontrol agent Prestop Mix (PM) with spores of fungi *Gliocladium catenulatum* based on foraging rate on strawberry flowers and density of the PM on bees, and impact of PM on strawberry's health. We also wanted to know the impact of PM on bee's homing ability and on behavior of foragers in improved dispenser compared to previous research. Foraging rate was the highest at early afternoon and it was similar on the whole field. To estimate inoculum concentration on bee's body we spread example's suspension on fungal medium. The highest density of spores on leaving and homing bees was direct after applying PM, but the homing one 15-times less. After that the density decreased rapidly. The percentage of mass and the number of healthy strawberries was increased by PM by approximately a half. In the homing ability experiment the treated and untreated bees were released from a distance of 40 m from the hive. Results showed prolonged flights in bees that were exposed to PM but did not affect the returning rate until evening. The behavior of foragers in improved dispenser was observed by a video camera. PM did not cause any aggressive behavior. Compared to previous observing the PM stayed in dispenser for loner period. We suggest application of PM in the middle of the day for better transfer and also a change in the structure of PM in order to decrease the negative effect on honey bees.

KAZALO

| | |
|---|-------------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| KAZALO | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VII |
| KAZALO SLIK | VIII |
| | |
| 1 UVOD | 1 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 BIOKONTROLA | 3 |
| 2.1.1 Vrste biotičnih sredstev | 3 |
| 2.1.2 Uporaba opráševalcev pri prenosu biotičnega sredstva..... | 4 |
| 2.2 MEDONOSNA ČEBELA | 7 |
| 2.2.1 Biologija | 7 |
| 2.2.2 Izginjanje čebel | 8 |
| 2.2.3 Pašno vedenje medonosne čebele | 9 |
| 2.2.4 Opráševanje..... | 10 |
| 2.3 PRIDELAVA JAGOD..... | 11 |
| 2.3.1 Pridelava jagod v Sloveniji in svetu | 11 |
| 2.3.2 Siva plesen jagod..... | 12 |
| 2.3.3 Druge bolezni jagod | 13 |
| 3 MATERIALI IN METODE DE LA | 14 |
| 3.1 POLJSKI POSKUS..... | 14 |
| 3.1.1 Priprava poskusnega nasada in čebelje družine | 14 |
| 3.1.2 Pašna dejavnost čebel na cvetovih jagod | 18 |
| 3.1.3 Količina biokontrolnega sredstva na čebelah..... | 19 |
| 3.1.4 Učinek biokontrolnega sredstva na zdravje jagod | 21 |
| 3.2 VPLIV BIOKONTRLONEGA SREDSTVA NA SPOSOBNOST VRAČANJA V PANJ..... | 22 |
| 3.3 VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU | 26 |
| 3.4 ANALIZA PODATKOV | 26 |
| 4 REZULTATI..... | 27 |
| 4.1 PAŠNA DEJAVNOST ČEBEL NA CVETOVIH JAGOD | 27 |
| 4.1.1 Dejavnost čebel preko dneva | 27 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.1.2 | Dejavnost čebel glede na oddaljenost od panja..... | 28 |
| 4.2 | KOLIČINA BIOKONTROLNEGA SREDSTVA NA ČEBELAH..... | 29 |
| 4.2.1 | Število spor na čebelah | 29 |
| 4.3 | UČINEK BIOKONTROLNEGA SREDSTVA NA ZDRAVJE JAGOD..... | 31 |
| 4.3.1 | Masa pridelka in število jagod..... | 31 |
| 4.3.2 | Masa plodov | 32 |
| 4.3.3 | Delež mase in števila zdravih jagod | 33 |
| 4.3.4 | Učinek sredstva glede na oddaljenost od panja | 35 |
| 4.4 | VPLIV BIOKONTROLNEGA SREDSTVA NA SPOSOBNOST VRAČANJA ČEBEL V PANJ..... | 36 |
| 4.4.1 | Delež čebel, ki so se vrnile v panj | 36 |
| 4.4.2 | Čas, ki so ga čebele porabile, da so se vrnile v panj | 38 |
| 4.5 | VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU | 39 |
| 5 | RAZPRAVA..... | 40 |
| 5.1 | PAŠNA DEJAVNOST ČEBEL NA CVETOVIH JAGOD | 40 |
| 5.2 | KOLIČINA BIOKONTROLNEGA SREDSTVA NA ČEBELAH..... | 41 |
| 5.3 | UČINEK BIOKONTROLNEGA SREDSTVA NA ZDRAVJE JAGOD..... | 42 |
| 5.4 | VPLIV BIOKONTROLNEGA SREDSTVA NA SPOSOBNOST VRAČANJA ČEBEL V PANJ..... | 43 |
| 5.5 | VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU | 43 |
| 5.6 | PREDLOGI ZA IZBOLJŠANJE APLIKACIJE SREDSTVA | 44 |
| 6 | SKLEPI | 45 |
| 7 | POVZETEK..... | 46 |
| 8 | VIRI | 48 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|--|----|
| Pregl. 1: Uporaba medonosne čebele pri raznosu MBS | 6 |
| Pregl. 2: Nanos spor glive <i>G. catenulatum</i> na gojitvene plošče | 20 |
| Pregl. 3: Povprečno število spor na čebelo ob posameznem času vzorčenja | 30 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Sl. 1: Kranjska čebela (<i>Apis mellifera carnica</i>) na cvetu jagode | 7 |
| Sl. 2: Siva plesen jagod (<i>Botrytis cinerea</i>) | 13 |
| Sl. 3: Prisotnost drugih čebelnjakov v radiju 1 km od poskusnega nasada..... | 15 |
| Sl. 4: Nasad na katerem je potekal poljski poskus | 15 |
| Sl. 5: Razdelilnik BeeTreat® nameščen na nakladni panj | 16 |
| Sl. 6: Pogled v predal razdelilnika..... | 17 |
| Sl. 7: Levo: Postavitev vzorčnih ploskev v nasadu. Desno: Shematski prikaz razporeditve vzorčnih ploskev..... | 18 |
| Sl. 8: Vzorčenje čebel, ki so izletavale iz panja preko razdelilnika | 19 |
| Sl. 9: Gojitvena plošča, na kateri so vidne rastoče kolonije glive <i>G. catenulatum</i> | 21 |
| Sl. 10: Lovljenje pašnih čebel, ki smo jih nato uporabili v poskusu..... | 23 |
| Sl. 11: Označevanje čebel s številkami za označevanje matic | 24 |
| Sl. 12: Izpostavitev čebel sredstvu preko mrežice tulca za označevanje matic | 24 |
| Sl. 13: Opazovanje označenih čebel, ki so se vrnile v panj v 15 minutah | 25 |
| Sl. 14: Panj Mini-plus, ki smo ga uporabili v poskusu vračanja čebel | 25 |
| Sl. 15: Pašna aktivnost čebel preko celega dne | 27 |
| Sl. 16: Število čebel na opazovanje po kvadratih, različno oddaljenih od panja | 28 |
| Sl. 17: Povprečno število spor na čebelah, ki so zapuščale panj (OUT) in se vanj vračale (IN) ob določenem času vzorčenja | 30 |
| Sl. 18: Masa pridelka tretiranih in netretiranih rastlin..... | 31 |
| Sl. 19: Število plodov tretiranih in netretiranih rastlin..... | 31 |
| Sl. 20: Masa plodov tretiranih in netretiranih rastlin..... | 32 |
| Sl. 21: Delež mase zdravih plodov pri rastlinah, ki so bile izpostavljene PM | 33 |
| Sl. 22: Delež števila zdravih jagod pri tretiranih in netretiranih rastlinah | 33 |
| Sl. 23: Deleži števila zdravih jagod prikazani za vsak dan obiranja | 34 |
| Sl. 24: Delež mase zdravih jagod glede na oddaljenost od panja..... | 35 |
| Sl. 25: Delež števila zdravih jagod glede na oddaljenost od panja | 36 |
| Sl. 26: Delež čebel, ki so se vrnile v panj v prvih 15 minutah..... | 37 |
| Sl. 27: Delež vseh čebel, ki so se vrnile do večera..... | 37 |
| Sl. 28: Čas, ki so ga čebele potrebovale, da so se vrnile v panj | 38 |

1 UVOD

Evropa je druga največja pridelovalka jagod na svetu. Vse večje je povpraševanje po jagodah, pridelanih na ekološki način. Pri ekološki pridelavi je uporaba fitofarmaceutskih sredstev prepovedana, zato veliko pridelka propade zaradi bolezni (CORE organic II Call, 2010). Med njimi največje izgube povzroča siva plesen *Botrytis cinerea*. Običajno se infekcija začne na starejših cvetovih in se nato kot gniloba razširja po razvijajočih se plodovih. Pri ekološki pridelavi se lahko za zaščito pridelka poslužujejo tudi alternativnega zatiranja z biokontrolo, ki temelji na uporabi antagonistov sive plesni.

Biokontrolna sredstva, ki so uspešna pri zatiranju sive plesni, vključujejo filamentozne glive, kvasovke in bakterije. Na Finskem so z raziskavami potrdili uspešnost glive *Gliocladium catenulatum* pri zatiranju sive plesni (Hokannen in Menzler-Hokannen, 2007). Pri prvotnih študijah so omenjeno glivo nanašali s škropljenjem, kar ni dalo zadovoljivih rezultatov. Nanašanje sredstva s škropljenjem ni dovolj učinkovito, ker velik del sredstva ne doseže tarčnega mesta (cveta) na rastlini ali pa je pogosto aplicirano v neustreznem razvojnem stadiju rastline, zaradi česar ni učinka pri zatiranju bolezni (Yu in Sutton, 1997; CORE organic II Call, 2010). Zato se je pojavila ideja o uporabi oprasovalcev pri prenosu zaščitnih sredstev. Medonosna čebela *Apis mellifera* se je v več raziskavah izkazala za učinkovito prenašalko različnih sredstev za zatiranje mnogih bolezni rastlin, med drugim tudi sive plesni (Peng in sod., 1992; Kovach in sod., 2000; Shafir in sod., 2006; Hokannen in Menzler-Hokannen, 2007). Biotično sredstvo v obliki praška je dodano v tako imenovani razdelilnik, ki je nameščen pred vhomom v panj. V razdelilniku se čebel, ki zapuščajo panj, oprime sredstvo, ki ga nato med pašo raznesejo po cvetovih. S tem prispevajo k zaščiti rastlin, hkrati pa z oprasovanjem poskrbijo za večji donos pridelka.

Za zatiranje sive plesni se uporablja komercialno dostopen pripravek Prestop Mix, ki vsebuje spore glive *G. catenulatum*. Pri našem raziskovalnem delu nas je zanimalo, kakšna je uspešnost medonosne čebele pri prenosu tega sredstva. Ugotoviti smo želeli, kako se količina spor glive *G. catenulatum* na čebelah po aplikaciji sredstva spreminja tekom dneva. Predvidevali smo, da je količina spor na čebelah po aplikaciji sredstva največja, potem pa se postopoma zmanjšuje. Pričakovali smo prisotnost spor tudi na vračajočih čebelah in posledično prisotnost spor v medu in cvetnem prahu.

Uspešnost pašne aktivnosti in obenem raznosa biotičnega sredstva je odvisna tudi od vpliva zaščitnega sredstva na čebelo. Ugotavljali smo, kako Prestop Mix vpliva na sposobnost vračanja v panj. Predvidevali smo, da bodo čebele, ki so izpostavljene sredstvu, za vračanje v panj potrebovale več časa. Opazovali smo tudi vpliv sredstva na vedenje čebel v izboljššanem razdelilniku in ga primerjali z vedenjem opaženim v predhodnem poskusu (Zaplotnik, 2013).

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOKONTROLA

Biokontrola ali biotično zatiranje je alternativen način zaščite pred škodljivci in nadomešča njihovo zatiranje s kemičnimi sredstvi. Osnova biokontrole je zmanjšanje populacij škodljivcev s pomočjo njihovih naravnih sovražnikov. Škodljivce se vzdržuje v stabilnih interakcijah na nivoju, ki ni več škodljiv za gostitelja (DeBach, 1964a). Biokontrola temelji na osnovnih ekoloških interakcijah med organizmi kot so predacija, parazitizem, antagonizem, herbivorija, patogenost in kompeticija (Sundh in Goettel, 2012). Biokontrolo se največ uporablja pri ekološkem kmetovanju, kjer je uporaba pesticidov zelo omejena (Sundh in Goettel, 2012).

2.1.1 Vrste biotičnih sredstev

Glede na uporabljeno biotično sredstvo in njegov namen ločimo klasično biokontrolo, augmentacijo in ohranjanje. Klasična biokontrola temelji na vnašanju tujerodnih sovražnikov (Sundh in Goettel, 2012). Pri augmentaciji škodljivce zatiramo s povečevanjem populacij naravnih sovražnikov in sicer s periodičnim izpuščanjem le-teh v okolje škodljivca (Orr, 2009). Ohranjanje pa se osredotoča na zagotavljanje pogojev, ki ustrezajo naravnim sovražnikom določenih škodljivcev (Sundh in Goettel, 2012).

Večina danes uporabljenih biokontrolnih sredstev delimo na nevretenčarska biokontrolna sredstva in na antagonistične ter patogene organizme. Prvo skupino sestavljajo nevretenčarski plenilci, zajedavci ali rastlinojedi, ki se jih načeloma uporablja za zatiranje nevretenčarjev ali plevelov. Med druge sodijo glive, bakterije in virusi. Slednje se uporablja proti različnim organizmom kot so žuželke, pršice, gliste, pleveli in drugi mikroorganizmi (glive in bakterije), ki povzročajo bolezni, ter celo vretenčarji (Sundh in Goettel, 2012 cit. po Vincent in sod., 2007). Med biokontrolna sredstva pa nekateri vključujejo tudi rastlinske ekstrakte in transgene rastline, ki proizvajajo za žuželke strupene toksine (Sundh in Goettel, 2012).

Vsako uporabljeno biotično sredstvo predstavlja določeno tveganje. Poleg pozitivnih imajo lahko tudi negativne učinke na ne tarčne organizme, okolje in zdravje ljudi (Delfosse, 2005; Thomas in Willis, 1998).

2.1.2 Uporaba opráševalcev pri prenosu biotičnega sredstva

Za raznos biokontrolnega sredstva je žuželke prvič uporabil Peng s sodelavci leta 1992. Medonosno čebelo je uporabil pri prenosu biotičnega sredstva (BS) *Gliocladium roseum* na cvetove jagod z namenom zatiranja sive plesni (*Botrytis cinerea*). Od takrat so bili za raznos BS poleg medonosne čebele uporabljeni še čmrlji (*Bombus impatiens*, *Bombus terrestris*) in v posameznih primerih čebele samotarke (Thomson in sod., 1992; Maccagnani in sod., 1999; Shafir in sod., 2006; Dedej in sod., 2004; Escande in sod., 2002; Albano in sod., 2009; Gross in sod., 1994; Butt in sod., 1998; Jyoti in Brewer, 1999; Al-mazra'awi in sod., 2006; You and Sutton, 1997; Kovach in sod., 2000; Kapongo in sod., 2008a; Mommaerts in sod., 2010b; Al-mazra'awi in sod., 2006b; Maccagnani in sod., 2005). Razlog uporabe malega števila raznašalcev je v njihovi komercialni dostopnosti. Čebele in čmrlje se namreč za zagotavljanje učinkovitega opráševanja kulturnih rastlin uporablja že dlje časa.

Pri prvih uporabah so BS nanašali predvsem s škropljenjem (Sutton in Peng, 1993; Lima in sod., 1997; Cota in sod., 2008; Cota in sod., 2009), vendar je bila učinkovitost zaščite večinoma premajhna. Težava je predvsem nanašanje sredstva ob pravem času, saj so cvetovi kratkoživi in tako mnogi ostanejo nezaščiteni. Poleg tega le majhen del sredstva doseže tarčo in se ga veliko sprosti v okolico in tla (Yu in Sutton, 1997). Opráševalci so učinkovitejši, ker nanašajo BS direktno na cvet, ki je za mnoge rastlinske patogene ključen pri njihovi reprodukciji (Ngugi in sod., 2002).

Za najboljše rezultate raznosa zaščitnega sredstva se BS pripravi v prašni obliki, ki je verjetno najprimernejša za optimalen oprijem na telo žuželk. Pomembno je tudi, da sredstvo dodamo žuželkam na način, ki čim manj moti njihovo normalno vedenje. V ta namen se pri čmrljih in čebelah uporablja tako imenovane razdelilnike, ki se jih namesti pred vhod panja in omogočajo oprijem zaščitnega sredstva na njihovo telo. Razvitih je bilo več modelov razdelilnikov, vendar so se na koncu za najučinkovitejše izkazali dvoprostorski. Ti so narejeni tako, da so sredstvu izpostavljene le čebele, ki zapuščajo panj. Nazaj se vračajo skozi drugo odprtino, tako da se čim manj sredstva vnaša v notranjost panja (Mommaerts in Smaghe, 2011). Pri razdelilnikih, ki so jih uporabili Tray, Peng in Triwaks, imajo izletajujoče čebele na svojih telesih povprečno 10^5 CFU (Kovach in sod., 2000; Bilu in sod., 2004). Za uspešen prenos sredstva na tarčne rastline mora biti

količina zaščitnega sredstva večja od 10^4 CFU/čebelo (Thomson in sod., 1992; Johnson in sod., 1993a; Dag in sod., 2000; Bilu in sod., 2004).

Učinkovitost uporabe opráševalcev pri prenosu mikrobnih biotičnih sredstev (MBS) je odvisna od vrste dejavnikov. Pomembno je, da opráševalci cvetove obiskujejo dovolj pogosto, kar je odvisno od vrste opráševalca in rastline. Prednost medonosne čebele je, ker jo gojijo po vsem svetu in je dobro poznana. Zmožna je aktivne paše na rastlinah oddaljenih tudi do tri kilometre. Pri prvih poskusih so kulturne rastline poškopili s posebnim sredstvom za privabljanje čebel (Bee-Scent) z namenom, da bi zagotovili zadosten obisk cvetov in s tem učinkovit raznos zaščitnega sredstva (Peng in sod., 1992). Kasnejše študije so pokazale, da je obisk cvetov bolj odvisen od velikosti čebelje družine. Številnejša ko je družina, učinkovitejši je obisk cvetov (Shafir in sod., 2006; Escande in sod., 2002). Do danes so bile medonosne čebele uspešno uporabljene za raznos MBS v borbi proti patogenom različnih ekonomsko pomembnih rastlin (Pregl. 1).

Slabost čebel je odvisnost pašne aktivnosti od vremenskih razmer (Vanneste, 1996). Vremensko manj občutljivi so čmrlji (Guerra-Sanz, 2008). Pri njih je obseg paše manjši. Navadno se od gnezda oddaljijo največ do 1,5 kilometra (Wolf in Moritz, 2008).

Količina zaščitnega sredstva nanesenega s pomočjo čebel je pri večini študij znašala med 10^3 in 10^4 CFU/cvet. V nekaterih primerih je bila ugotovljena velika variabilnost med posameznimi cvetovi in sicer od 0 do 10^4 CFU/cvet (Thomson in sod., 1992; Kovach in sod., 2000; Albano in sod., 2009).

Medonosno čebelo in čmrlje so uspešno uporabili tudi pri prenosu različnih entomopatogenih zaščitnih sredstev. Ti zatirajo škodljive žuželke, ki se hranijo ali le zadržujejo na cvetovih (Al-mazra'awi in sod., 2006b; Gross in sod., 1994).

Preglednica 1: Uporaba medonosne čebele pri raznosu MBS

| Rastlina | Bolezen | BS | Vektor | Učinek – manjša pojavnost bolezni | Vir |
|--------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------|--|-----------------------------|
| Jagode | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Gliocladium roseum</i> | <i>A. mellifera</i> | za 18 % | Peng in sod., 1992 |
| Maline | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Gliocladium roseum</i> | <i>A. mellifera</i> , | za 22 % | Yu in Sutton, 1997 |
| Jagode | <i>Botrytis cinerea</i> | <i>Trichoderma harzianum</i> | <i>A. mellifera</i> , | za 72 % | Kovach in sod., 2000 |
| Sončnice | <i>Sclerotia sclerotiorum</i> | <i>Trichoderma sp.</i> | <i>A. mellifera</i> | za 67-60 % | Escande in sod., 2002 |
| Borovnice | <i>Monilinia vaccinii-corymbosi</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>A. mellifera</i> | za 14-23 % | Dedej in sod., 2004 |
| Oljna repica | <i>Lygus lineolaris</i> | <i>Beauveria bassiana</i> | <i>A. mellifera</i> | za 38-45 % | Al-mazra'awi in sod., 2006a |

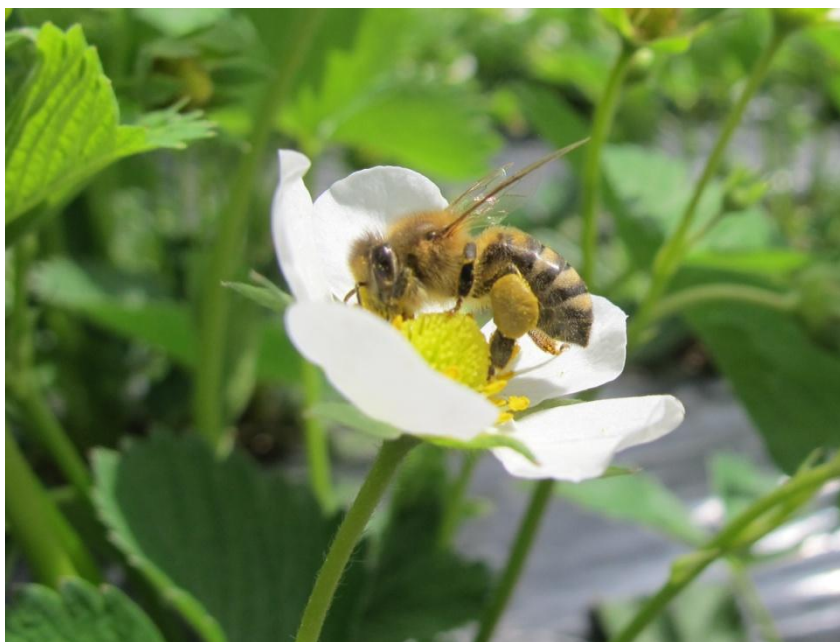
Pomembno je, da je biotično sredstvo varno za prenašalca. Stranske učinke lahko opišemo na treh nivojih: vpliv na kratkoročno in dolgoročno smrtnost posameznih osebkov, ki so prišli v stik s sredstvom; vpliv na reprodukcijo celotne družine; in vpliv na pašno vedenje opravevalcev. Za prenašalce so najbolj nevarni MBS, ki delujejo proti žuželčjim škodljivcem (Kevan in sod., 2008; Vandenbergi, 1990; Kapongo in sod., 2008b; Mommaerts in sod., 2009; van der Steen in sod., 2003).

2.2 MEDONOSNA ČEBELA

2.2.1 Biologija

Medonosna čebela *Apis mellifera* spada v družino čebel (Apidae), ta pa v red kožekrilcev (Hymenoptera). Naravno je razširjena v Afriki in Evropi, človek pa jo je zaradi njene ekonomske vrednosti raznesel še v druge dele sveta. V različnih delih njenega areala so se zaradi raznolikosti okolja in klimatskih razmer, katerim so bile čebele izpostavljene tisočletja, razvile številne podvrste. Danes je poznanih 28 podvrst medonosne čebele. Pri nas je avtohtona kranjska čebela *Apis mellifera carnica*. Danes je druga najbolj razširjena podvrsta medonosne čebele na svetu (Gregori in sod., 2003).

Čebelja družina šteje poleti, na višku svoje moči, okrog 50000 osebkov, pozimi pa okoli 20000 (Tautz, 2010). Družino sestavljajo ena matica, delavke - neplodne samice, ki so najštevilčnejše, in troti, ki jih je navadno nekaj sto na družino. Matica je za razliko od ostalih dolgoživa in živi do 5 let. Leže oplojena jajčeca, iz katerih se razvijejo delavke in matice ter neoplojena jajčeca, iz katerih se razvijejo troti (Gregorc, 2008). Glede na starost, čebele opravljajo v panju različne naloge (Božič, 2008).



Slika 1: Kranjska čebela (*Apis mellifera carnica*) na cvetu jagode (foto: D. Bevk, 2013)

2.2.2 Izginjanje čebel

Vse od leta 1985 je tako v Evropi kot v ZDA opazen upad čebeljih družin (Ellis in sod., 2010; Potts in sod., 2010). Zmanjševanje števila čebeljih družin v Evropi je poleg številnih čebeljih boleznih, deloma pogojeno tudi z upadanjem števila čebelarjev (Potts in sod., 2010).

Na umiranje čebel ima velik vpliv globalizacija in z njo povečan prenos boleznih. Največji čebelji škodljivec je v zadnjih desetletjih postala zajedavska pršica varoja *Varoa destructor*, ki se hrani s hemolimfo. Ob nezadostnem zatiranju povzroča propad čebeljih družin. Glavni bolezni, ki jo povzročajo glive, sta nose mavost in okamenelost čebelje zalege. Velik problem pri čebelah je tudi huda gniloba čebelje zalege, ki jo povzroča bakterija *Paenibacillus larvae*. Bolezni povzročajo tudi virusi na primer virus deformiranih kril (angl. deformed wing virus – DWV) in virus akutne paralize čebel (angl. acute bee paralysis virus). Prenašajo se tudi s pomočjo varoje (Gregorc, 2008).

V zadnjem času so vedno bolj pogosti pomori čebeljih družin zaradi zastrupitev s fitofarmaceutskimi sredstvi, ki se jih uporablja v kmetijstvu za zatiranje škodljivcev. Problematična je predvsem uporaba insekticidov imenovanih neonikotinoidi, ki so za žuželke močno nevrotoksični. Zaradi zastrupitve z neonikotinoidi je prišlo do večjih pomorov čebeljih družin v Nemčiji, Franciji, Avstriji in pri nas (Tapparo in sod., 2012; Sgolastra in sod., 2012).

Grožnjo čebelarjem predstavljajo tudi globalne spremembe podnebja, ki povzročajo motnje v življenjskem ciklu čebel. Poleg tega prihaja do brez pašnih obdobji, ki privedejo do pomanjkanja zimske zaloge hrane (Auguštin, 2010).

Jeseni 2006 so nekateri čebelarji iz ZDA poročali o 30-90 % izgubah čebeljih družin (van Engelsdorp in sod., 2007). Opazili so družine, ki so imele pokrito zalego in dovolj hrane, a so ostale brez delavk. Ta nov fenomen izgube čebel so poimenovali CCD (angl. colony collapse disorder) (van Engelsdorp in sod., 2007). Vzrok za CCD še ni povsem znan, je pa podoben vzrokom splošne izgube čebel na račun škodljivcev in patogenov (Ellis in sod., 2010). V letih med 2008 in 2010 so v Evropi zabeležili od 7 do 30 % zimske izgube čebeljih družin. Izgube so bile večje pri čebelarjih, kjer so opazili CCD (van der Zee in sod., 2012).

2.2.3 Pašno vedenje medonosne čebele

Čebele s pašo nabirajo hrano. Osnovni prehranski viri čebel so medicína in mana, ki predstavljata vir ogljikovih hidratov oziroma energije, in cvetni prah, ki je vir beljakovin. Delavka med letom v primerjavi z mirovanjem porabi v eni uri približno 15-krat več energije. Sama pašna aktivnost je torej energetsko potratna, nabrana medicína pa mora teoretično zadoščati vsaj za polet na pašo in nazaj. Čebele pri paši uporabljajo različne strategije nabiranja medicíne z namenom, da je poraba energije za optimalno količino nabrane medicíne čim manjša. Prvi let pašne čebele je orientacijski, nekaj nadaljnjih pa učnih, na njih pa se srečujejo z novim virom hrane (Free, 1969).

Čebele obiskujejo veliko različnih tipov cvetov. V enem dnevu naredi posamezna čebela 12 ali več poletov na katerih skupno obiše nekaj tisoč cvetov. Na enem poletu se omejijo na obiskovanje cvetov ene rastlinske vrste (Abrol, 2012).

Na pašno vedenje čebel vplivajo pašne razmere in socialni stiki v čebelji družini (Božič, 2008). Sporazumevanje čebel v panju temelji na oddajanju in sprejemanju mehanskih in kemičnih dražljajev, zunaj pa tudi na vidnih zaznavah. Kemični dražljaji so feromoni, ki jih same izločajo, in vonj paše. Mehanski dražljaji so lahko le preprosto dotikanje med osebkami ali pa tresenje določenih delov telesa. Najbolj poznano pri čebelah je plesno sporazumevanje. Delavke, ki se vračajo v panj, se po vertikalnih satih gibljejo v obliki osmic, velikih približno dva centimetra. V delu osmice, kjer plesalka spremeni smer, potresa z zadkom in obenem brenči z oprsem in s krili. Smer potresavanja glede na navpičnico se ujema s smerjo paše in sonca. Izkušene čebele se lahko orientirajo tudi brez sonca, začetnice pa za orientacijo nujno potrebujejo del jasnega neba. Poleg tega s plesom sporočajo oddaljenost paše, lahko pa tudi vrsto paše in koncentracijo medicíne (Božič, 2008; Steffan-Dewenter in Khun, 2003; Thom, 2003).

Pašna aktivnost je močno odvisna od trenutnih vremenskih razmer. Čebele izletavajo na pašo, ko je zunanja temperatura nekje med 12 in 38 °C. V nasprotnem primeru zapuščajo panj le za iztrebljanje in z namenom orientacijskih letov. Učinkovita paša je lahko oddaljena do 3 km (Tautz, 2010).

2.2.4 Opraševanje

Opraševalci so ključni za optimalen razvoj plodov ter tako prispevajo k višjemu pridelku. Ekonomska vrednost opraševanja na svetovni ravni je ocenjena na približno 153 milijard evrov letno (Gallai in sod., 2009). Sodobno kmetijstvo je postalo odvisno od medonosne čebele, ki kot najpomembnejši opraševalec, zapolni potrebe po opraševanju vedno večjih površin kulturnih rastlin. Večina kulturnih rastlin potrebuje za uspešno oploditev prenos cvetnega praha iz cveta ene rastline na cvet druge rastline iste vrste, kar imenujemo navzkrižno opraševanje. Pri tem so najpomembnejše prav medonosne čebele. Dobro oprašene kulturne rastline obrodijo večjo količino bolj kvalitetnih pridelkov. Z navzkrižnim opraševanjem obenem nastajajo kultivarji, katerih potomci imajo lahko številne prednosti, kot so povečana vegetativna biomasa, hitrejša rast rastlin, povečana proizvodnja medicinine in razvoj bolj hranljivih in aromatičnih sadežev (Abrol, 2012).

Učinkovitost opraševanja s strani čebel je odvisna predvsem od števila čebeljih družin in njihove številčnosti. Na slednje vplivajo bolezni, pesticidi, količina hrane in sezonske spremembe. Trenutne vremenske razmere, kot so suša ali dolga deževna obdobja, nizke ali previsoke temperature ter močan veter, negativno vplivajo na nastajanje medicinine v cvetovih, poleg tega tudi čebele ob takih pogojih ne letajo rade na pašo (Abrol, 2012). Pašne čebele nabirajo predvsem na cvetovih, ki so jim nudili hrano na začetku dneva (Tautz, 2012), obisk cvetov pa je odvisen tudi od značilnosti cvetov. Pomembna je velikost (Spaethe in sod., 2001), barva (Forrest in Thomson, 2009), vonj (Farina in sod., 2007) in količina medicinine. Med cvetenjem koncentracija sladkorja v medicinini postopno upada, zato pada tudi zanimanje opraševalcev zanje. Za najboljše rezultate opraševanja je potrebno v nasad pripeljati močne čebelje družine z veliko nepokrite zalege v času, ko je odprtih od 5 do 10 % vseh cvetov. Takrat so za čebele cvetovi najbolj privlačni, kasneje pa vedno manj (Ngugi in sod., 2002).

Marsikje po svetu se soočajo s pomanjkanjem opraševalcev, s tako imenovano krizo opraševanja. Problemi povezani z upadanjem populacij opraševalcev, so bili predstavljeni v deklaraciji iz Sao Paula (The São Paulo Declaration on Pollinators). Deklaracija je spodbudila ustanovitev mednarodne iniciative za zaščito in ohranitev opraševalcev (International Pollinators Initiative). Njene glavne naloge so spremljanje stanja in upada opraševalcev, iskanje vzrokov njihovega upadanja, vrednotenje ekonomske vrednosti

opraševalcev in ustanovitev programov za njihovo ohranitev (International Pollinators Initiative, 1999).

Posledice upada populacij opraševalcev niso vidne takoj (Cane in Tepedino, 2001). Upadanje populacij opraševalcev lahko povzroči upadanje populacij rastlin, ki jih oprašujejo, velja pa tudi obratno. V Britaniji in na Nizozemskem so opazili istočasno upadanje populacij tako čebel in muh trepetavk kot entomofilnih rastlin (Biesmaier in sod., 2006).

2.3 PRIDELAVA JAGOD

Jagode (*Fragaria x Ananassa* Duchesne) so trajnice, ki spadajo v družino rožnic (Rosaceae). Razvoj semen se začne z oprašitvijo. Pod nadzorom hormonov se začne cvetišče podaljševati. Razvoj sadeža je odvisen od hormonske bilance tekom zorenja semen. Kakršnakoli motnja tega hormonskega ravnovesja, nepopolna oprašitev ali odmrtnje semen, ki so posledica opraševanja z neustreznim cvetnim prahom, poškodb zaradi zmrzali, napada žuželk in patogenov, privede do nepravilno razvitih plodov. Jagode niso prave jagode, saj je mesnat in užiten del omesenelo cvetišče, na površini katerega se razvijejo številni majhni oreški (Martinčič in sod., 2007).

2.3.1 Pridelava jagod v Sloveniji in svetu

Jagode v nekaterih državah predstavljajo pomemben delež kmetijske pridelave. Svetovna pridelava jagod je leta 2012 znašala 4.516.810 ton. Največja pridelovalka so ZDA, sledi pa ji Evropa, ki je pridelala 1.316.950 ton jagod. Največje pridelovalke v Evropi so Španija, Nemčija, Poljska in Združeno kraljestvo. Slovenija je leta 2012 pridelala 2.190 ton jagod (FAOSTAT, 2014).

Jagode se lahko izmed vseh sadnih vrst goji na največ načinov. Poznamo enkrat in večkrat rodne jagode, ki se med seboj razlikujejo po času tvorbe cvetov. V Sloveniji in tudi po svetu prevladuje pridelava spomladanskih in jesenskih jagod v tleh prekritih s plastično folijo pod plastičnimi tuneli. S plastičnimi tuneli ali vlakninami se jagode prekriva za hitrejše dozorevanje in zaradi zaščite pred nizkimi spomladanskimi temperaturami, točo in dežjem, ki je glavni dejavnik pri okužbi s sivo plesnijo (Štampar in sod., 2009).

2.3.2 Siva plesen jagod

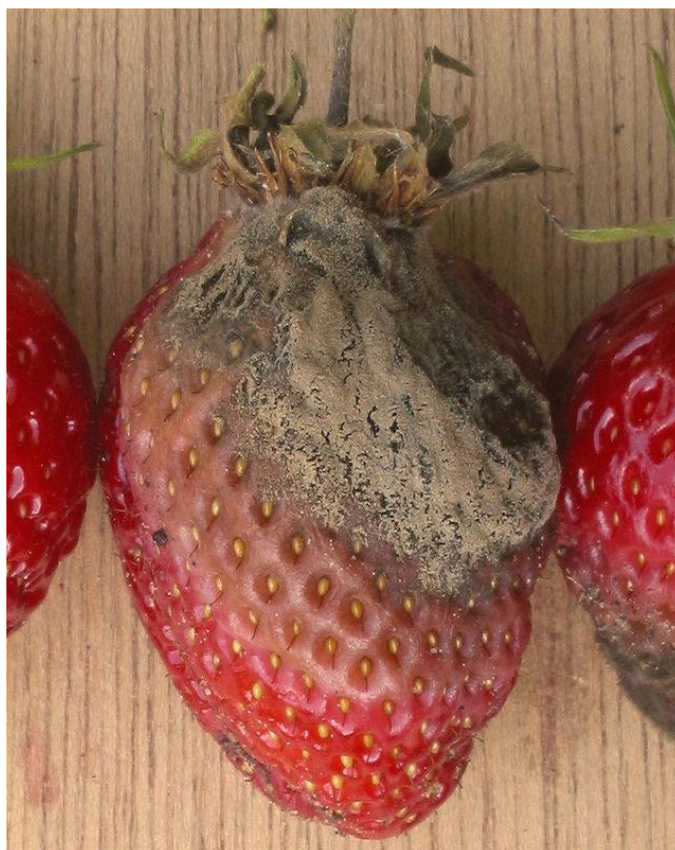
Jagode so podvržene številnim boleznim. Največji problem pri pridelavi je siva plesen, ki jo povzroča nekrotrofična gliva *Botrytis cinerea*. Infekcija se po navadi začne na starejših cvetovih in se nato kot nežna gniloba razširja po razvijajočih se plodovih. Sivo plesen je težko nadzorovati, ker ima različne načine napada, raznolike gostitelje in lahko preživi kot micelij, kot konidij ali daljše časovno obdobje kot sklerocij v odmrlih delih gostiteljske rastline. Sklerociji začnejo zgodaj spomladi tvoriti konidiofore in večjedrne konidije, ki so primarni vir okužbe pridelka (Williamson in sod., 2007).

Siva plesen se najbolje razvija pri visoki zračni vlažnosti, pri temperaturah med 15 in 25 °C in dlje časa prisotni površinski mokroti (Wilcox in Seem, 1994). Posebno pri jagodičevju dež v obdobju cvetenja močno poviša infekcijo (Williamson in sod., 2007). Najbolj dovzetni za okužbo so na novo odprti cvetovi (Sutton, 1998).

Sivo plesen preprečujejo in zdravijo na različne načine. Zmanjšamo jo lahko že na začetku sezone s preprečevanjem okužbe sadik s plesnijo. Prenos zmanjšamo, če sadike posadimo dovolj narazen ena od druge (Legard in sod., 2000). Za popolnejšo zaščito pred sivo plesnijo se uporablja fungicide. V Evropi je najbolj razširjen diklofluanid, v Severni Ameriki pa kaptan. Po načinu delovanja poznamo pet vrst fungicidov, ki se ločijo glede na njihov vpliv na respiracijo, sestavljanje mikrotubulov, inhibitorje biosinteze sterolov in drugo (Rosslenbroich and Stuebler, 2000). Fungicide se škropi v intervalih v času cvetenja in zorenja. Lahko pa se pred cvetenjem škropi zelene in odmrle liste, da se zavre nastajanje inokuluma sive plesni (Sutton, 1998). Izkazalo se je, da je nanašanje fungicidov najbolj učinkovito pri na novo odprtih cvetovih, manj učinkovito pa je pri zelenih, še ne zrelih plodovih (Mertely in sod., 2002). Problem uporabe fungicidov je razvoj odpornosti sive plesni in ostanki v pridelkih (Sutton, 1998).

Prav zaradi ostankov fitofarmaceutskih sredstev v pridelkih se vedno bolj uveljavlja alternativno zatiranje sive plesni, ki temelji na apliciranju antagonistov sive plesni. Biokontrolna sredstva, ki so uspešna pri zatiranju sive plesni, vključujejo filamentozne glive, med njimi *Trichoderma harzianum*, *Gliocladium roseum*, *Gliocladium catenulatum* in *Ulocladium oudemansii*, kvasovke kot je *Candida oleophila* ter bakterije vključujoč *Streptomyces griseoviridis*, *Bacillus subtilis* in *Pseudomonas syringa* (Williamson in sod., 2007).

G. catenulatum kot biokontrolno sredstvo, pod komercialnim imenom Prestop Mix (PM), proizvaja podjetje Verdera Oy. Dovoljenje in avtorske pravice za proizvodnjo tega sredstva je podjetje dobilo že leta 1998 (Directive 91/414/EEC).



Slika 2: Siva plesen jagod (*Botrytis cinerea*)

(vir: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Aardbei_Lambda_vruchtrot_Botrytis_cinerea.jpg)

2.3.3 Druge bolezni jagod

Jagode prizadenejo še druge bolezni kot so jagodna pepelasta plesen, ki jo povzroča *Sphaerotheca macularis*, rdeča listna pegavost jagod (*Diplocarpon earliana*), bela listna pegavost jagod (*Mycosphaerella fragariae*), jagodna koreninska gniloba (*Phytophthora cactorum*), črna pegavost jagod – antraknoza (*Colletotrichum acutatum*) in jagodna oglata listna pegavost (*Xanthomonas fragariae*). Poleg bolezni, ki jih povzročajo mikroorganizmi, pa jagode napadajo tudi drugi škodljivci kot so jagodov cvetožer, jajčasti rilčkar, gosenice in sovke, uši, navadna koprivina ali fižolova pršica, resarji, polži in širokolistni ter ozkolistni pleveli (Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, 2013).

3 MATERIALI IN METODE DELA

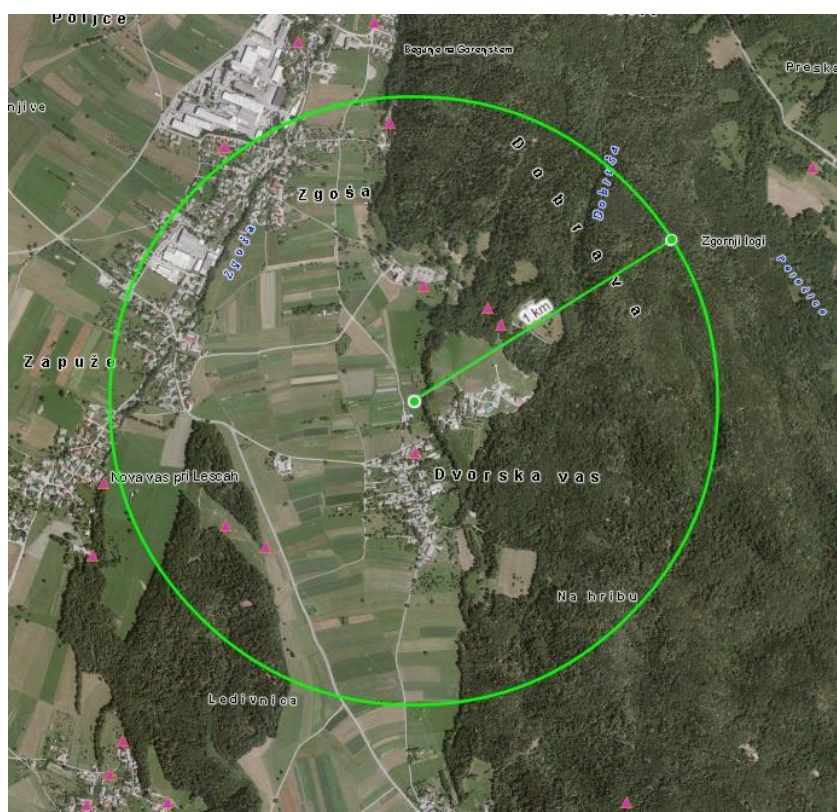
Poskuse in opazovanja smo izvajali na jagodah *Fragaria x Ananassa* Duchesne in na kranjski čebeli *Apis mellifera carnica* Pollman 1879. Poljski poskus smo izvajali v nasadu jagod v Dvorski vasi 24a, Begunje na Gorenjskem. Meritve količine biokontrolnega sredstva na čebelah smo opravili na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo. Ostale poskuse smo izvedli na Oddelku za entomologijo.

3.1 POLJSKI POSKUS

S poljskim poskusom smo želeli ugotoviti uspešnost in uporabnost kranjske čebele pri raznosu biokontrolnega zaščitnega sredstva PM na cvetove jagod. Zanimalo nas je ali čebele obiskujejo cvetove jagod, koliko spor imajo na sebi in učinkovitost metode pri zagotavljanju zdravja pridelka. Poskus je potekal v maju in juniju 2013 v Dvorski vasi na Gorenjskem (530 m n. v.). V okolici nasada, kjer je potekal poskus, so bile prisotne tudi druge čebelje družine. V radiju 1 km je bilo 7 čebelnjakov, v širši okolici pa še precej več (Slika 3). Nasad je bil obdan z nepokošenimi travniki, kjer so v času poskusa prevladoval naslednje cvetoče rastline: regrat, gabez, kozja brada, njivsko grabljišče, v okolici pa so bila tudi posamezna cvetoča sadna drevesa.

3.1.1 Priprava poskusnega nasada in čebelje družine

Poskus je potekal v nasadu velikem približno 0,25 ha (Slika 4). Jagode sorte Elsanta so bile posajene v 32 vrstah, ki so bile prekrivane s črno plastično folijo. Vsaka vrsta je bila dolga približno 50 metrov. Med vrstami je bila večinoma položena slama, na manjšem delu pa je bila pokošena trava. V celem nasadu je bilo urejeno kapljično namakanje.



Slika 3: Prisotnost drugih čebeljakov v radiju 1 km od poskusnega nasada. ▲ = čebeljak (vir: Javni pregledovalnik grafičnih podatkov MKGP, 2014)



Slika 4: Nasad na katerem je potekal poljski poskus (foto: D. Bevk, 2013)

V nasad smo 8. 5. 2013, ko je bilo odprtih približno 10 % cvetov jagod, pripeljali čebeljo družino na 10 satih v nakladnem panju z eno naklado. Družina je imela zalego v vseh razvojnih fazah in dovolj prostora za širjenje. Panj smo namestili na južnem robu nasada, 25 cm od tal, z izhodom obrnjenim proti nasadu. Na vhod panja smo namestili razdelilnik BeeTreat® (proizvajalec AASATEK Ltd, Helsinki, Finska, (Slika 5)), na katerega smo čebele navadili že prej. Razdelilnik ima dva prehoda. Skozi spodnjega čebele zapuščajo panj, preko zgornjega pa se vračajo. V spodnji prehod je lastnica nasada vsako jutro (če ni bilo dežja) okoli 8. ure nasula 5 g Prestopa Mix. Na podlagi izkušenj predhodnega leta, ko smo opazili, da se pripravek prehitro porabi, čebele pa so takoj po dodatku pripravka »predozirane«, smo v del, kamor se vsuje sredstvo, namestili podlogo s ščetinami, ki je omogočala bolj postopno porabo sredstva (Slika 6).

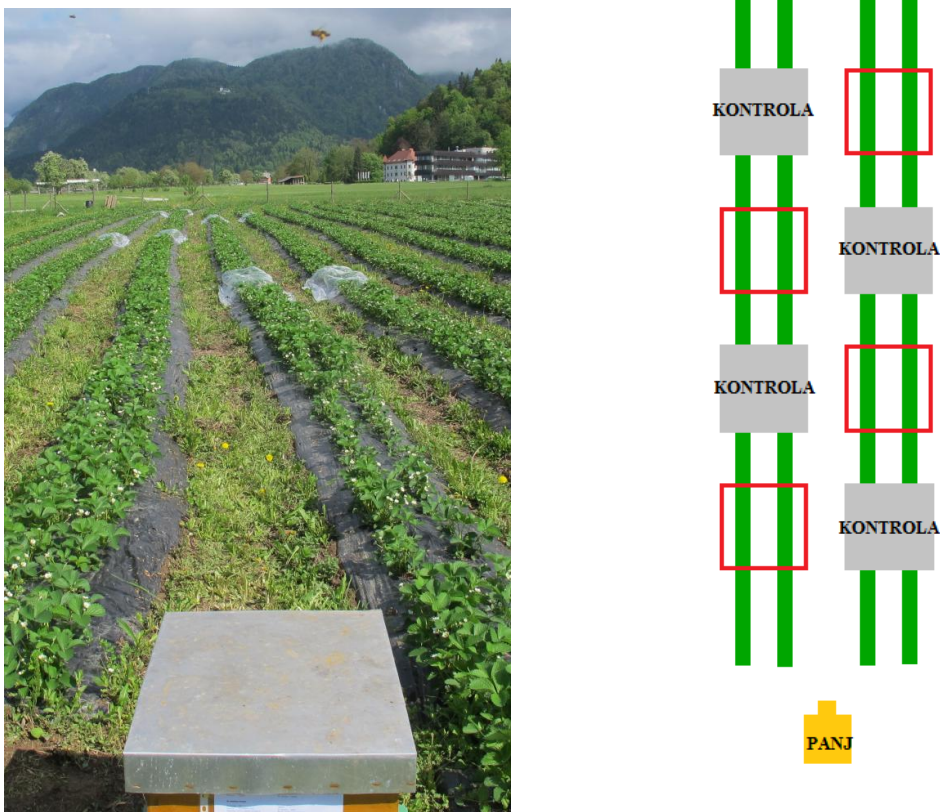


Slika 5: Razdelilnik BeeTreat® nameščen na nakladni panj (foto: D. Bevk, 2013)



Slika 6: Pogled v predal razdelilnika. Podloga s ščetinami je omogočala bolj postopno porabo sredstva (foto: D. Bevk, 2013)

V štirih vrstah, ki so potekale v smeri od panja, smo z vrvicami označili osem vzorčnih ploskev, velikih $2\text{ m} \times 2\text{ m}$. V vsaki ploskvi sta bili dve vrsti po 16 rastlin jagod, skupaj 32 rastlin. Prvi dve ploskvi sta bili od panja oddaljeni 10 metrov, preostale pa 20, 30 in 40 m. Štiri ploskve so bile kontrolne, zato smo jih pokrili z mrežo proti žuželkam in tako preprečili dostop čebelam (Slika 7).



Slika 7: Levo: Postavitev vzorčnih ploskev v nasadu. Polovica plošč je bila pokritih z mrežo – kontrola, druga polovica pa so bile opazovalne plošče (foto: D. Bevk, 2013). Desno: Shematski prikaz razporeditve vzorčnih ploskev. Ploskve in razdalje med njimi niso narisane v sorazmerju.

3.1.2 Pašna dejavnost čebel na cvetovih jagod

Želeli smo ugotoviti, kako intenzivna je paša čebel na cvetovih jagod. Pašno dejavnost čebel smo opazovali na vseh nepokritih vzorčnih ploskvah in po možnosti ob čim lepšem vremenu. Obiskovanje cvetov smo 8 dni opazovali med 9. in 10. uro ter 11. in 12. uro, dva dneva pa tudi med 13. in 14. ter 16. in 17. uro. Vsako opazovalno uro smo na vsaki izmed štirih poskusnih ploskev desetkrat po eno minuto beležili število čebel na cvetovih. Pri vsakem enominutnem opazovanju smo zabeležili največje število čebel, ki so bile istočasno znotraj poskusne ploskve. Ob vsakem opazovanju smo tudi zabeležili vremenske razmere in razpoložljivost alternativnih pašnih virov v okolici.

3.1.3 Količina biokontrolnega sredstva na čebelah

Zanimalo nas je, koliko spor imajo na sebi čebele, ki panj zapuščajo in koliko čebele, ki se vanj vračajo ter kako se količina spor spreminja preko dneva. Količino biokontrolnega sredstva na čebelah smo preverjali v laboratoriju s pomočjo nanosa na gojišča izdelana po receptu, ki ga je uporabil Peng (1992).

Čebele smo vzorčili 28. maja 2013 in sicer preko celega dneva. Vzorčili smo pred dodajanjem sredstva, takoj za tem, 15, 30, 45 in 60 minut po dodatku in nato vsako uro do 9. ure po dodatku PM. Tako smo tekom dneva vzorčili 14-krat. Vsakokrat smo vzorčili po pet čebel, ki so zapuščale panj (vzorec OUT) (Slika 8) in po pet čebel, ki so se vračale (vzorec IN) (Slika 9). Vsako čebelo posebej smo ujeli v vrečko in jo takoj shranili v ledu. Kasneje smo jih shranili pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki je priporočena za hranjenje spor daljše časovno obdobje (Tahvonen in sod., 1997). Tako zamrznjene so čebele počakale do analize v laboratoriju. Skupaj smo nabrali 140 čebel. Od tega smo analizirali po tri čebele OUT in tri čebele IN iz vsakega izmed 14 vzorčenj (analizirali smo po tri serije čebel).



Slika 8: Vzorčenje čebel, ki so izletavale iz panja preko razdelilnika

Analizo količine biokontrolnega sredstva na čebelah smo pričeli z ekstrakcijo spor glive *G. catenulatum*. Vsaki čebeli v svoji vrečki smo dodali 10 mL pufra PBS Tween. Vrečko smo rahlo pretresli, tako da je pufer oblil čebelo in vso notranjo površino vrečke. Nato smo pufer skupaj s čebelo prelili v centrifugirko, pri tem smo si po potrebi pomagali z ezo. Sledilo je 2-urno stresanje centrifugirke pri cca. 15 obratih/min na rotacijskem stresalniku Rotating Mixer-MMV14 (Heto-Holten). Po koncu stresanja smo iz centrifugirke odpipetirali 450 μ L pufra in ga nanесли na plošče.

Za vsako čebelo smo uporabili 4 plošče in na vsako nanесли po 100 μ L pufra. Za pozitivno kontrolo smo uporabili spore glive *G. catenulatum* v koncentraciji 10^6 /ml in jih nanесли na plošče v štirih različnih koncentracijah. Za negativno kontrolo smo na plošče nanесли pufer PBS Tween (Preglednica 2).

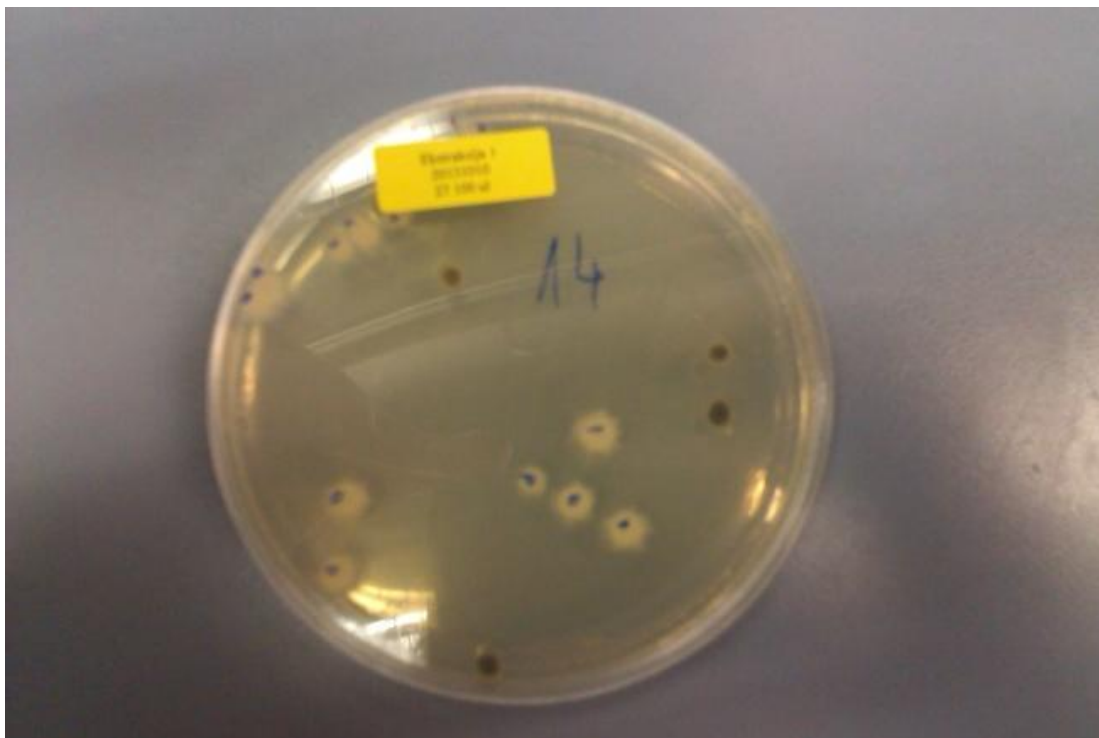
Preglednica 2: Nanos spor glive *G. catenulatum* na gojitvene plošče

| | Redčitev | Količina nanosa (μ L) | Št. plošč |
|-----------------|----------|----------------------------|-----------|
| Poz. kontrola 1 | 10 | 20 | 4 |
| Poz. kontrola 2 | 100 | 20 | 4 |
| Poz. kontrola 3 | 1000 | 20 | 4 |
| Poz. kontrola 4 | 10000 | 20 | 4 |
| Neg. kontrola | 0 | 100 | 4 |
| Vzorec IN * | 0 | 100 | 4 |
| Vzorec OUT * | 0 | 100 | 4 |

* Skupno smo analizirali 42 vzorcev IN in 42 vzorcev OUT. Iz vsakega izmed 14 vzorčenj smo analizirali po 3 čebele IN in po 3 čebele OUT

Spore glive smo nacepili na PDTSA (angl. potatoe dextrose triton streptomycin agar), ki ga je pri sorodnem poskusu uporabil Peng (1992). Gre za krompirjev dekstrozni agar - PDA (angl. potatoe dextrose agar), ki smo ga obogatili s Triton XR-100 in s streptomycin sulfatom. Končna koncentracija Tritona v gojišču je bila 0,2 %, streptomycin sulfata pa 50 mg/mL. V 1 L gojišča smo dodali 2 mL Tritona X-100 in 50 g streptomycin sulfata.

Gojitvene plošče smo po nacepivni spor inkubirali 4 dni na temperaturi 20-23 °C. Na vsaki plošči posebej smo prešteli rastoče kolonije (Slika 9). Iz štirih plošč smo izračunali povprečno število spor za posamezno čebelo v seriji. Nato smo iz vseh treh serij izračunali povprečje spor na čebelo za posamezen čas vzorčenja.



Slika 9: Gojitvena plošča na kateri so vidne rastoče kolonije glive *G. catenulatum* (označene z modro)

3.1.4 Učinek biokontrolnega sredstva na zdravje jagod

Želeli smo ugotoviti, kako je metoda učinkovita pri zaščiti jagod pred sivo plesnijo. Zanimalo nas je, koliko več zdravega pridelka je pri jagodah, ki so bile izpostavljene PM. Zrele jagode smo obirali v času, kot jih običajno pobirajo v nasadih. Na vsaki poskusni ploskvi, tudi na tistih, ki so bile pokrite z mrežo (kontrola), smo zjutraj pobrali zrele plodove, jih ločili na zdrave in bolne ter nato oboje prešteli in stehtali. Skupaj smo nabrali 1634 jagod. Maso, število in delež zdravih ter bolnih jagod smo primerjali med ploskvami, ki so bile dostopne čebelam in tistimi, ki so bile pokrite z mrežo.

3.2 VPLIV BIOKONTRLONEGA SREDSTVA NA SPOSOBNOST VRAČANJA V PANJ

Želeli smo preveriti, kako biokontrolno sredstvo vpliva na sposobnost vračanja čebel v panj. Poizkuse smo izvedli v Ljubljani v juliju 2013 in sicer v majhni čebelji družini naseljeni v panju Mini-plus. Mini-plus panj je nakladni panj, manjših dimenzij (30×30 cm), ki se navadno uporablja za vzrejo matic ali prezimovanje šibkejših čebeljih družin (Slika 14). V njem je šest majhnih satov (15×20 cm) s skupno površino $0,36 \text{ m}^2$. Za ta panj smo se odločili, ker je manjši od klasičnega nakladnega LR panja, družine zato manjše, kar omogoča lažje spremljanje označenih osebkov na vhodu in predvsem pregled družin zvečer.

Na vhodu panja smo dopoldan ujeli v tulce za označevanje matic po devet vračajočih pašnih čebel (Slika 10). Vzorčili smo samo čebele, ki so imele na nogah obnožino (cvetni prah). Tako smo zagotovili, da so bile vse poskusne čebele res izkušene pašne čebele in ne mlade čebele na orientacijskem poletu. V laboratoriju smo jih individualno označili s številkami za označevanje matic (Slika 11), nato pa smo po tri čebele združili v en tulec. Dobili smo tri skupine čebel, ki smo jih izpostavili različnim količinam biokontrolnega sredstva. Sredstvu smo jih izpostavili preko mreže tulca, tako da smo le-tega za 1 ali 15 sekund postavili v posodico s PM (Slika 12). Tretja, kontrolna skupina, sredstvu ni bila izpostavljena. Nato smo vse tri skupine čebel istočasno izpustili 40 m stran od panja. Na vhodu panja smo 15 minut spremljali, katere čebele so se vrstile in koliko časa so za to potrebovale (Slika 13). Da bi videli, če so se katere od manjkajočih čebel vrstile kasneje, smo zvečer panj odprli in pregledali čebele v njem (Slika 14). Za vsako skupino smo uporabili 165 čebel. Skupno smo jih testirali 495.



Slika 10: Lovljenje pašnih čebel, ki smo jih nato uporabili v poskusu (foto: D. Bevk, 2013)



Slika 11: Označevanje čebel s številkami za označevanje matic (foto: D. Bevk, 2013)



Slika 12: Izpostavitve čebel sredstvu preko mrežice tulca za označevanje matic (foto: D. Bevk, 2013)



Slika 13: Opazovanje označenih čebel, ki so se vrstile v panj v 15 minutah (foto: D. Bevk, 2013)



Slika 14: Panj Mini-plus, ki smo ga uporabili v poskusu vračanja čebel. Vsak poskusni dan smo ga zvečer odprli in pregledali čebele.

3.3 VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU

Želeli smo ugotoviti, kako PM vpliva na vedenje čebel v izboljššanem razdelilniku BeeTreat®, ki ima v delu, kamor vsujemo sredstvo, nameščeno podlogo s ščetinami in primerjati z vplivom iz prejšnje raziskave, kjer je bil razdelilnik brez podloge (Zapltnik, 2013). Poskuse smo izvajali v Ljubljani, julija in avgusta 2013 na eni čebelji družini v LR panju.

Čebele smo opazovali v predelu razdelilnika, kjer zapuščajo panj in pridejo v stik z zaščitnim sredstvom. Za opazovanje smo uporabljali digitalno mikro kamero (DigiMicro 2.0 Scale). Za potrebe snemanja smo razdelilnik nekoliko predelali. Čebele so bile na razdelilnik predhodno navajene.

Snemanje je potekalo tri dni zaporedoma v sončnem vremenu. S snemanjem smo začeli zjutraj med 8. in 9. uro. Petminutne posnetke v razdelilniku smo naredili pred dodajanjem PM, takoj po njem, 15 in 30 minut po tem ter nato na vsako uro. Zadnje snemanje smo izvedli 5 ur po dodatku sredstva.

3.4 ANALIZA PODATKOV

V programu Microsoft Excel 2007 smo izrisali črtne grafikone za pašno aktivnost čebel, stolpični graf z logoritemsko skalo za količino spor na čebelah in stolpični graf za delež mase in števila zdravih jagod po dnevih in za delež vrnjenih čebel. V programu SPSS 14.0 for Windows smo izrisali škatle z brki (boxplot diagrame) za številnost čebel med različno oddaljenimi poskusnimi ploskvami, maso zdravega pridelka, število zdravih jagod, maso posameznega ploda, delež mase in števila zdravih jagod ter čas vračanja.

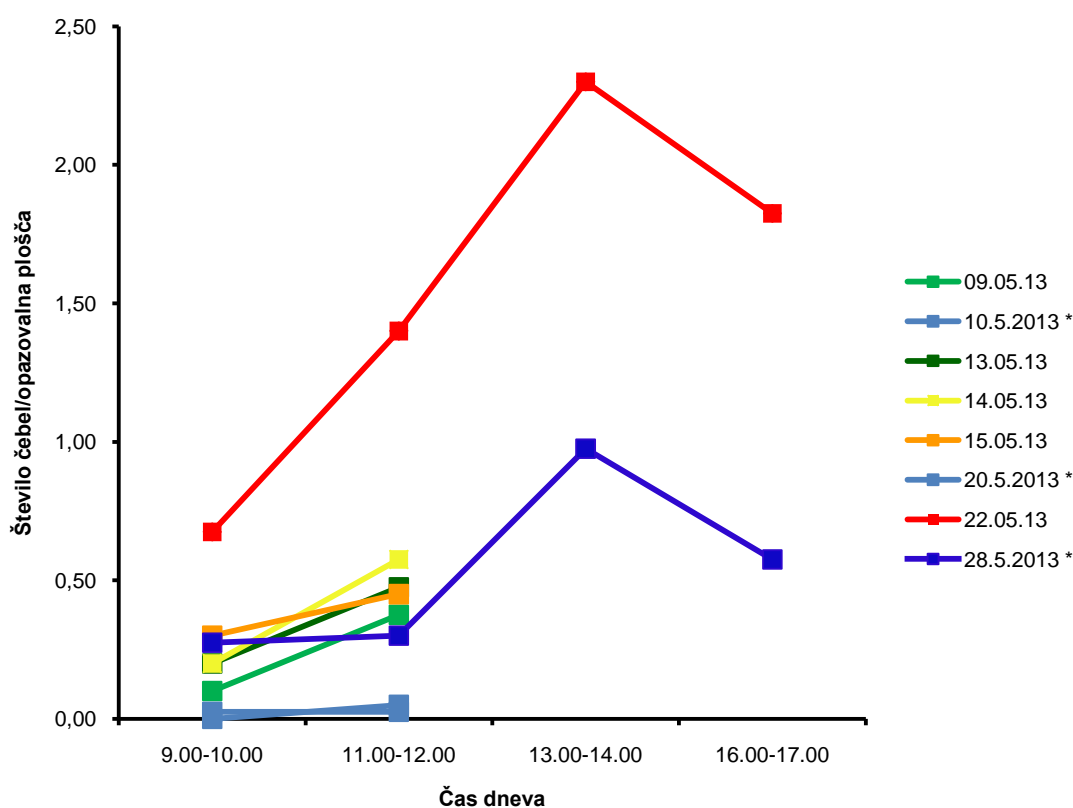
Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program SPSS 14.0 for Windows. Izračunali smo osnovne statistične parametre. Za ugotavljanje statistično značilnih razlik smo uporabili test χ^2 in Mann-Whitneyev U test.

4 REZULTATI

4.1 PAŠNA DEJAVNOST ČEBEL NA CVETOVIIH JAGOD

4.1.1 Dejavnost čebel preko dneva

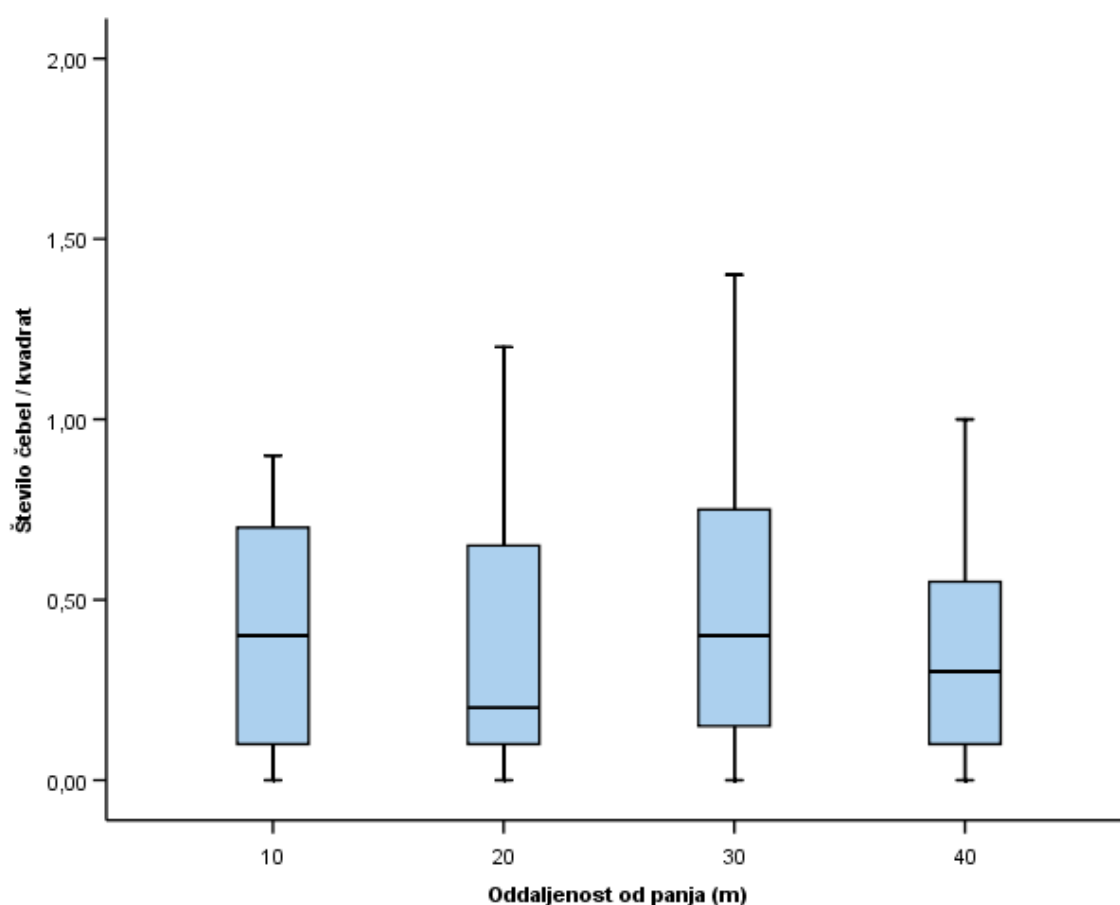
Pašno aktivnost čebel na cvetovih jagod smo opazovali 8 dni. Od tega so bili trije dnevi delno do pretežno oblačni, med vsemi opazovanji pa so bile dopoldanske temperature za nekaj °C nižje. Med 9.00 in 10.00 je bilo povprečno 0,2 čebele na opazovano ploskev. Med 11.00 in 12.00 je bila aktivnost večja in sicer 0,45 čebele na ploskev. Največje število čebel na cvetovih je bilo med 13.00 in 14.00 (1,64 čebele/ploskev). Med 16.00 in 17.00 pa je število čebel upadlo na 1,20 čebele na ploskev (Slika 15).



Slika 15: Pašna aktivnost čebel preko celega dne. S svetlo modro črto (—) sta prikazana dneva, ko je prevladovalo oblačno vreme in so bile temperature nižje kot drugače. S temno modro črto (—) pa dan, ko je bilo vreme oblačno, vendar temperature niso bile nižje kot običajno. Največja aktivnost je bila med 13. in 14. uro (1,64 čebele/ploskev) ter med 16. in 17. uro (1,20 čebele/ploskev). Prikazana so povprečja vseh štirih opazovalnih plošč ob določenem času opazovanja za vsak opazovalni dan posebej. Vsaka točka na grafu predstavlja 40 meritev.

4.1.2 Dejavnost čebel glede na oddaljenost od panja

Oddaljenost opazovalne ploskve od panja ni vplivala na pašno aktivnost čebel na cvetovih jagod. Z oddaljenostjo od panja število čebel na cvetovih ni niti padalo niti naraščalo. Razlike med vzorčnimi ploskvami niso bile statistično značilne ($p > 0,05$, Mann-Whitney U test) (Slika 16).



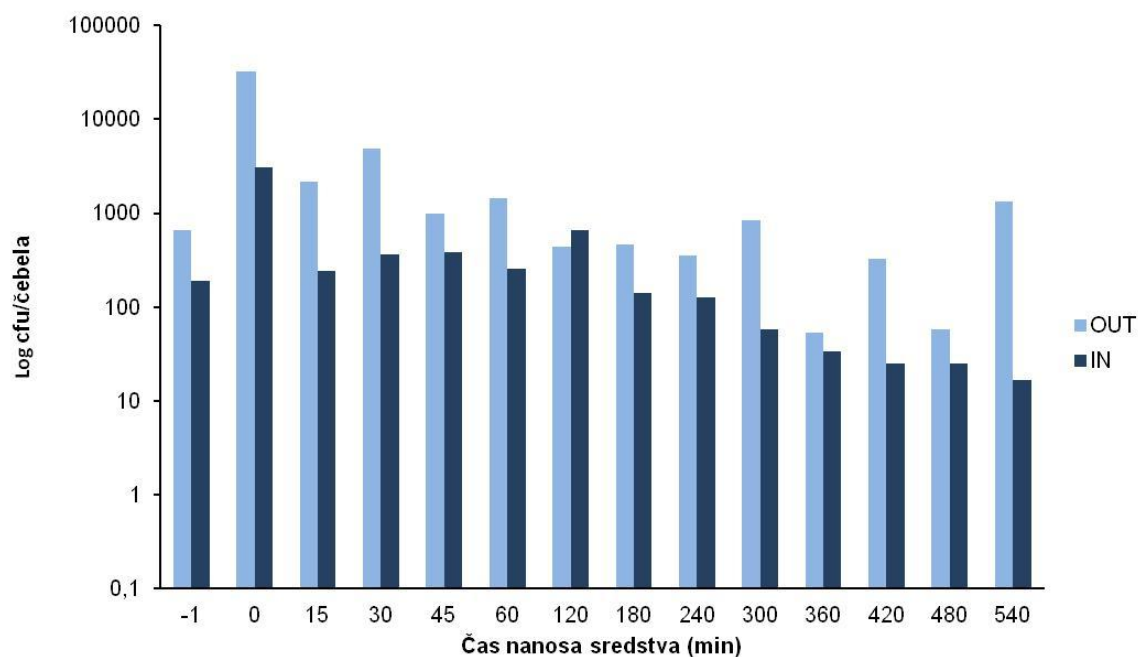
Slika 16: Število čebel na opazovanje po kvadratih, ki so bili različno oddaljeni od panja. Med njimi ni bilo statistično značilnih razlik. Na vsakem opazovalnem kvadratu smo zabeležili 200 podatkov, $N_{\text{skupaj}} = 800$

4.2 KOLIČINA BIOKONTROLNEGA SREDSTVA NA ČEBELAH

4.2.1 Število spor na čebelah

Število spor *Gliocladium catenulatum* na čebelah je preko dneva padalo, razlikovalo pa se je tudi med čebelami, ki so panj zapuščale in tistimi, ki so se vanj vračale. Količina spor na čebelah, ki so zapuščale panj (preko prehoda z biotičnim sredstvom), je bila najvišja takoj po dodajanju PM ($3,3 \times 10^4$ spor). Po 15 minutah je bilo število spor $2,2 \times 10^3$, po 30 minutah $4,9 \times 10^3$, po eni uri pa $1,5 \times 10^3$. Količina spor pri čebelah, ki so izletavale pozneje tekom dneva je bila precej nižja, vendar upadanje ni bilo enakomerno. Najmanj spor so imele čebele po 6 urah (53 spor), ob zadnjem vzorčenju (po 9 h) pa precej več. Zjutraj, pred aplikacijo sredstva, je bilo na čebelah povprečno 650 spor, kar pa je več kot minimalna količina spor.

Čebele, ki so se vračale v panj, so imele na svojih telesih bistveno manj spor. Takoj po dodajanju PM je bilo povprečno število spor $3,1 \times 10^3$. Pri kasneje vračajočih čebelah pa je bilo število spor opazno manjše in je dokaj enakomerno upadalo, z izjemo čebel vzorčenih po dveh urah od nasutja biokontrolnega sredstva, ki so imele na sebi povprečno 658 spor. Najmanj spor so imele čebel ob zadnjem vzorčenju (17 spor). Čebele, ki so se vračale pred nasutjem sredstva, so imele na sebi več kot 10-krat več spor od minimalne količine (192 spor) (Preglednica 3, Slika 17).



Slika 17: Povprečno število spor na čebelah, ki so zupuščale panj (OUT) in se vanj vračale (IN) ob določenem času vzorčenja. Vsak stolpec predstavlja povprečje treh meritev

Preglednica 3: Povprečno število spor na čebelo ob posameznem času vzorčenja (čas 0 predstavlja trenutek aplikacije sredstva)

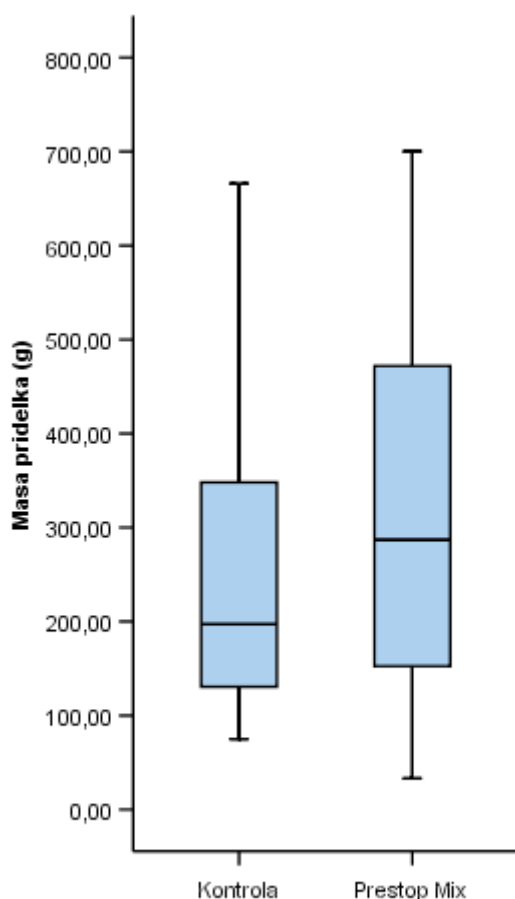
| Čas vzorčenja (min) | OUT (št. spor/čebelo) | IN (št. spor/čebelo) |
|---------------------|-----------------------|----------------------|
| -1 | 650 | 192 |
| 0 | 32583 | 3083 |
| 15 | 2150 | 241 |
| 30 | 4875 | 367 |
| 45 | 1000 | 383 |
| 60 | 1450 | 258 |
| 120 | 442 | 658 |
| 180 | 458 | 142 |
| 240 | 350 | 125 |
| 300 | 850 | 58 |
| 360 | 53 | 33 |
| 420 | 325 | 25 |
| 480 | 58 | 25 |
| 540 | 1342 | 17 |

4.3 UČINEK BIOKONTROLNEGA SREDSTVA NA ZDRAVJE JAGOD

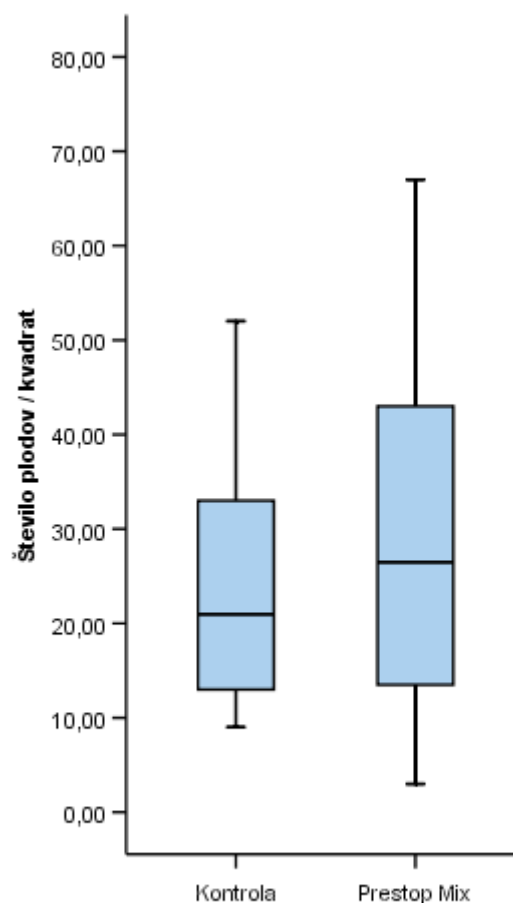
Učinek biokontrolnega sredstva smo določili na podlagi primerjave pridelka iz kvadratov, ki so bili izpostavljeni PM in kvadratov, ki so bili pokriti z mrežo.

4.3.1 Masa pridelka in število jagod

Primerjali smo maso pridelka in število plodov tretiranih in netretiranih rastlin. Masa plodov tretiranih rastlin (mediana 286,5 g) je bila v primerjavi z netretiranimi večja (197,0 g), vendar razlika ni bila statistično značilna ($p > 0,05$; Mann-Whitney U test; Slika 18). Prav tako niso bile značilne razlike v številu plodov. Mediana števila plodov tretiranih rastlin je bila 26,5, netretiranih pa 21,0 ($p > 0,05$; Mann-Whitney U test; Slika 19)



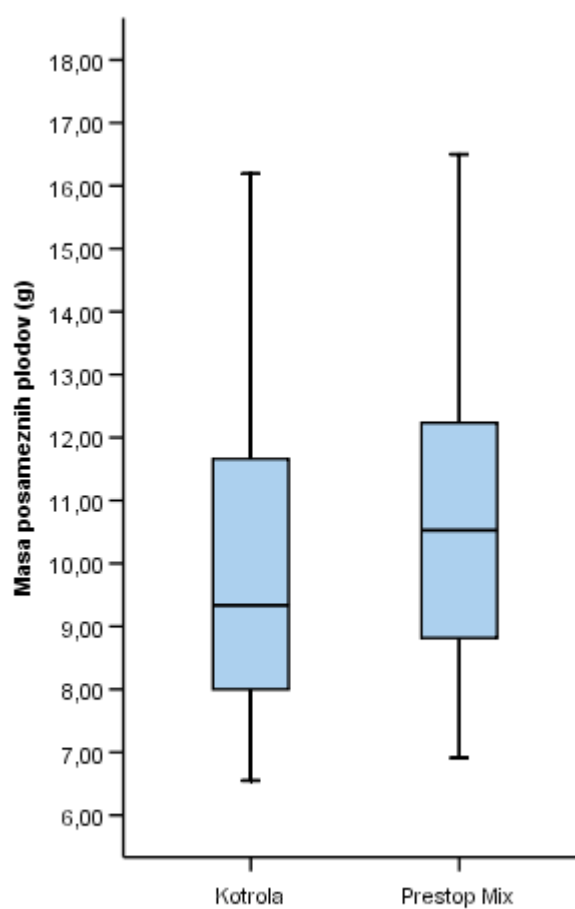
Slika 18: Masa pridelka tretiranih in netretiranih rastlin, $N_{\text{kont.}} = 28$, $N_{\text{PM}} = 28$



Slika 19: Število plodov tretiranih in netretiranih rastlin, $N_{\text{kont.}} = 28$, $N_{\text{PM}} = 28$

4.3.2 Masa plodov

Masa posameznega ploda pri jagodah, ki so bile izpostavljene PM (mediana 10,5 g), je bila v primerjavi s kontrolo (9,3 g) večja, vendar razlika ni bila statistično značilna ($p > 0,05$; Mann-Whitney U test; Slika 20).

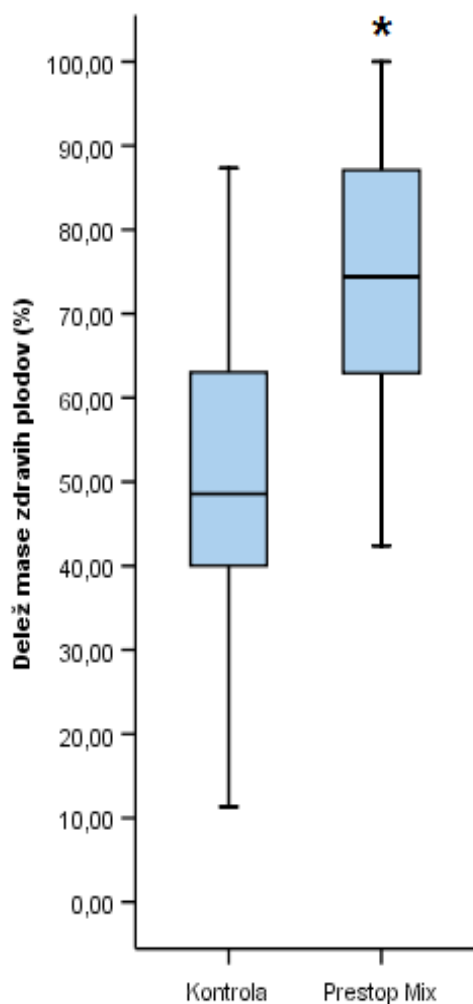


Slika 20: Masa plodov tretiranih in netretiranih rastlin, $N_{\text{kont.}} = 28$, $N_{\text{PM}} = 28$

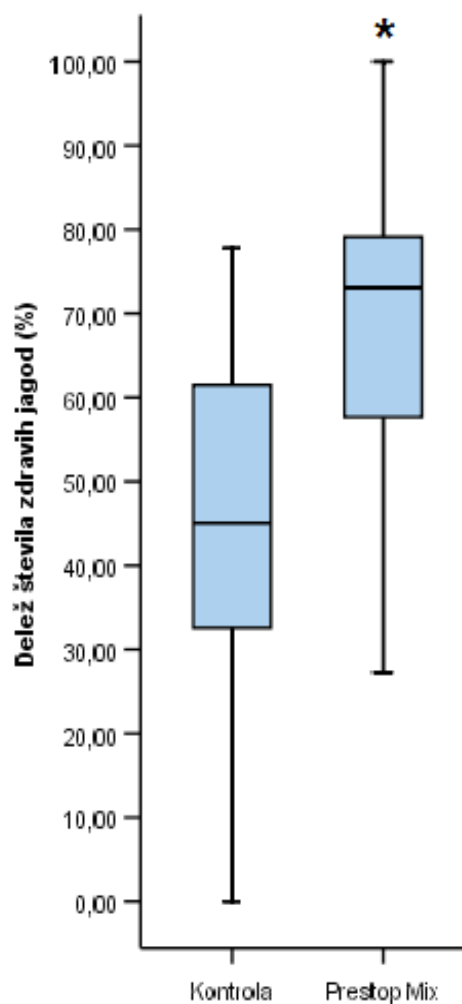
4.3.3 Delež mase in števila zdravih jagod

PM je povečal delež zdravih plodov za približno polovico. Delež mase zdravih plodov je bil pri rastlinah, ki so bile izpostavljene PM, značilno večji kot pri rastlinah, ki mu niso bile izpostavljene. Mediana deleža mase zdravih jagod netretiranih rastlin je bila 48,6 %, tretiranih pa 74,4 % ($p < 0,01$; Mann-Whitney U test; Slika 21).

Podobno je bil pri tretiranih rastlinah večji tudi delež števila zdravih jagod. Mediana deleža števila zdravih plodov netretiranih jagod je bila 45,1, tretiranih jagod pa 73,0 ($p < 0,01$; Mann-Whitney U test; Slika 22).



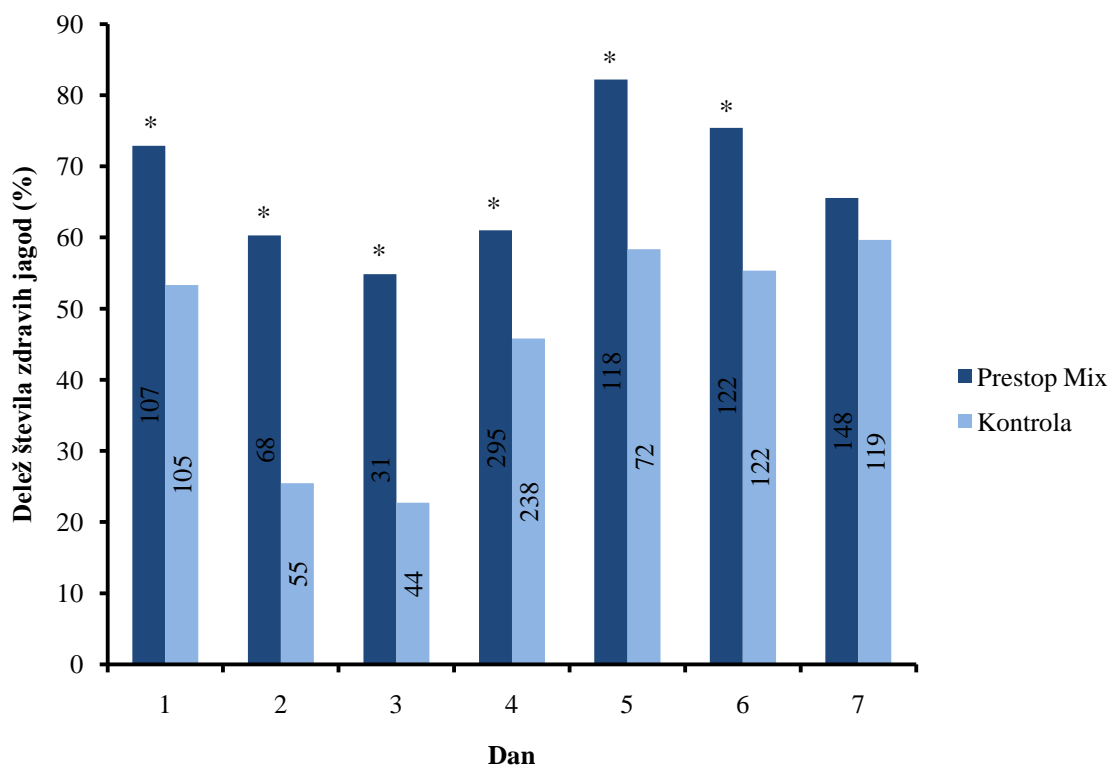
Slika 21: Delež mase zdravih plodov pri rastlinah, ki so/niso bile izpostavljene PM. * = statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo, Mann-Whitney U test, $p < 0,01$, $N_{\text{kont.}} = 28$, $N_{\text{PM}} = 28$



Slika 22: Delež števila zdravih jagod pri tretiranih in netretiranih rastlinah. * = statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo, Mann-Whitney U test, $p < 0,01$, $N_{\text{kont.}} = 28$, $N_{\text{PM}} = 28$

Dodatno smo delež zdravih plodov testirali tudi s hi kvadrat testom, ki je prav tako potrdil, da je delež števila zdravih plodov pri tretiranih rastlinah statistično značilno večji (62,3 %, $\chi^2 = 59,6$, $p < 0,001$).

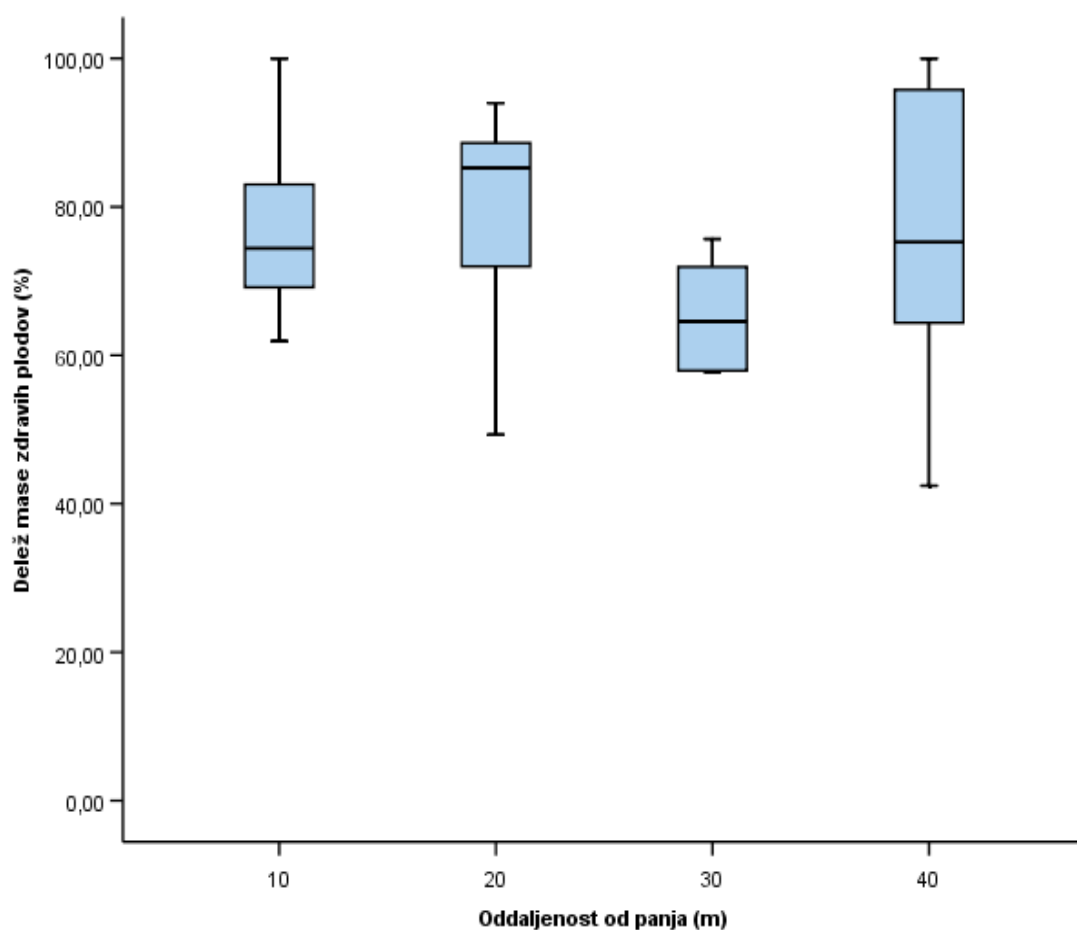
Učinek PM na število zdravih jagod je bil zaznaven, tudi če smo analizirali vsak dan posebej. Delež števila zdravih jagod, je bil pri tretiranih jagodah, razen zadnjega dne, značilno večji od deleža v kontrolni skupini ($p < 0,05$; test χ^2) (Slika 23).



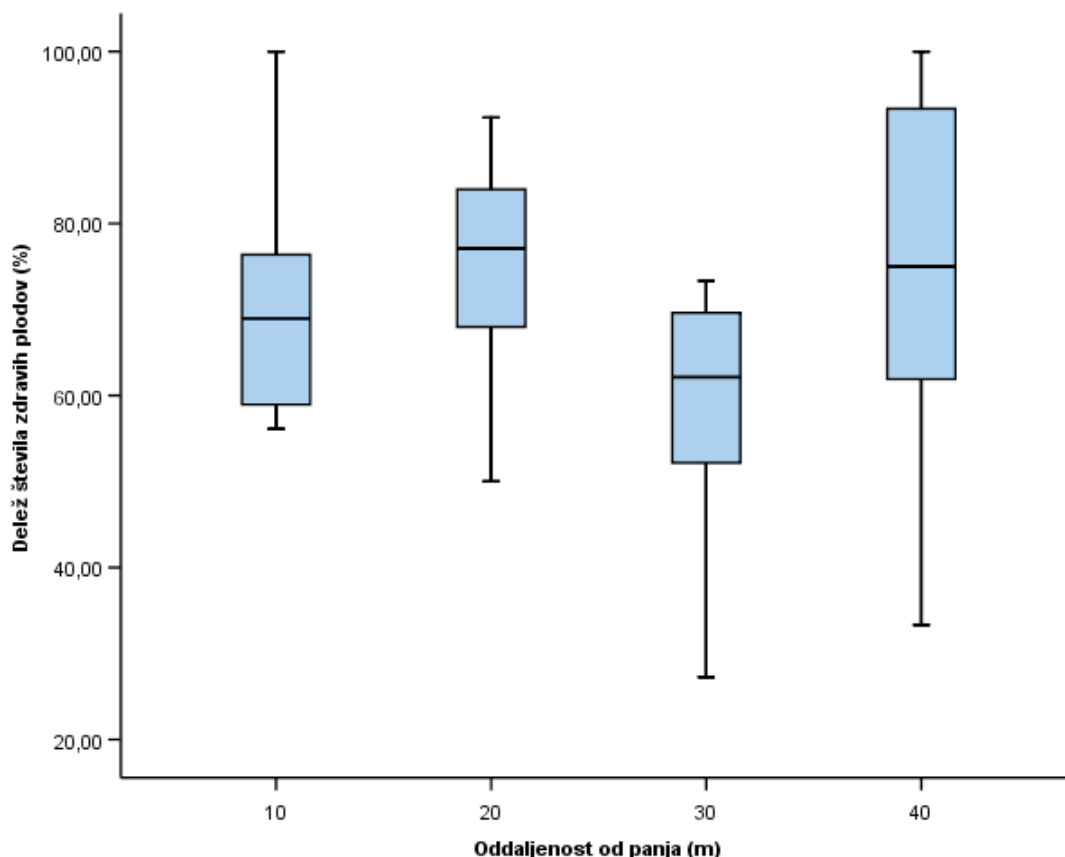
Slika 23: Deleži števila zdravih jagod prikazani za vsak dan obiranja. Primerjali smo med jagodami, ki so bile izpostavljene PM in med kontrolnimi. Razen pri zadnjem dnevu so bile razlike značilne (* = značilna razlika) ($p < 0,05$; test χ^2). V vsakem stolpcu je vpisano število meritev, $N_{\text{skupaj}} = 1634$

4.3.4 Učinek sredstva glede na oddaljenost od panja

Primerjali smo učinkovitost PM glede na oddaljenost vzorčnega kvadrata od panja. Delež zdravih plodov je bil v različnih kvadratih različen, vendar razlike niso bile statistično značilne. Z oddaljenostjo od panja delež mase in števila zdravih plodov ni niti naraščal niti padal ($p > 0,05$; Mann-Whitney U test; Slika 24, Slika 25).



Slika 24: Delež mase zdravih jagod glede na oddaljenost od panja. Na vsaki izmed štirih ploskev, ki so bile izpostavljene PM, smo opravili sedem meritev. Med njimi ni bilo statistično značilnih razlik



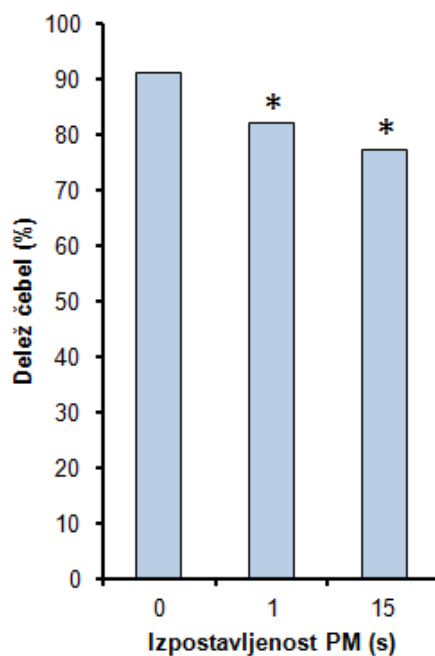
Slika 25: Delež števila zdravih jagod glede na oddaljenost od panja. Na vsaki izmed štirih ploskev, ki so bile izpostavljene PM, smo opravili sedem meritev

4.4 VPLIV BIOKONTROLNEGA SREDSTVA NA SPOSOBNOST VRAČANJA ČEBEL V PANJ

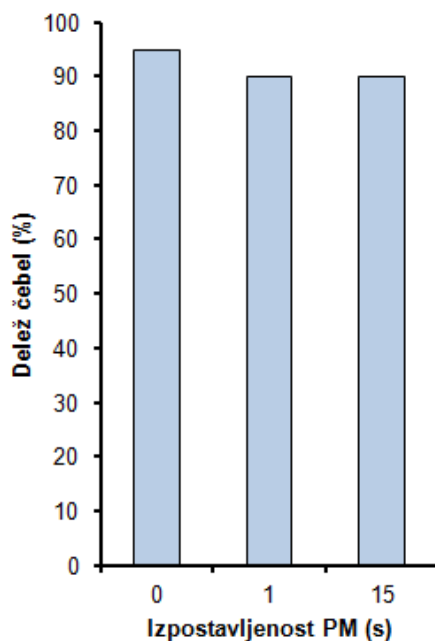
4.4.1 Delež čebel, ki so se vrnile v panj

Primerjali smo vračanje čebel, ki so bile izpostavljene različnim odmerkom PM. Primerjali smo vračanje v 15 min po izpustitvi in do večera. PM je na vračanje čebel vplival negativno. V kontrolni skupini se je v 15 minutah vrnilo 90,9 % čebel. Pri čebelah, ki so bile sredstvu izpostavljene 1 s je bil delež 1,11-krat manjši (81,8 %; $\chi^2 = 5,8$; $p < 0,05$), pri čebelah, ki so bile izpostavljene 15 s, pa 1,18-krat manjši (77,0 %; $\chi^2 = 11,9$; $p < 0,001$) (Slika 26).

Do večera so se vrnile skoraj vse čebele, razlike so bile manjše in niso bile več statistično značilne. V kontrolni skupini se je vrnilo 93,9 % čebel, v skupinah, ki sta bili sredstvu izpostavljeni 1 in 15 sekund pa 90,3 % (Slika 27).



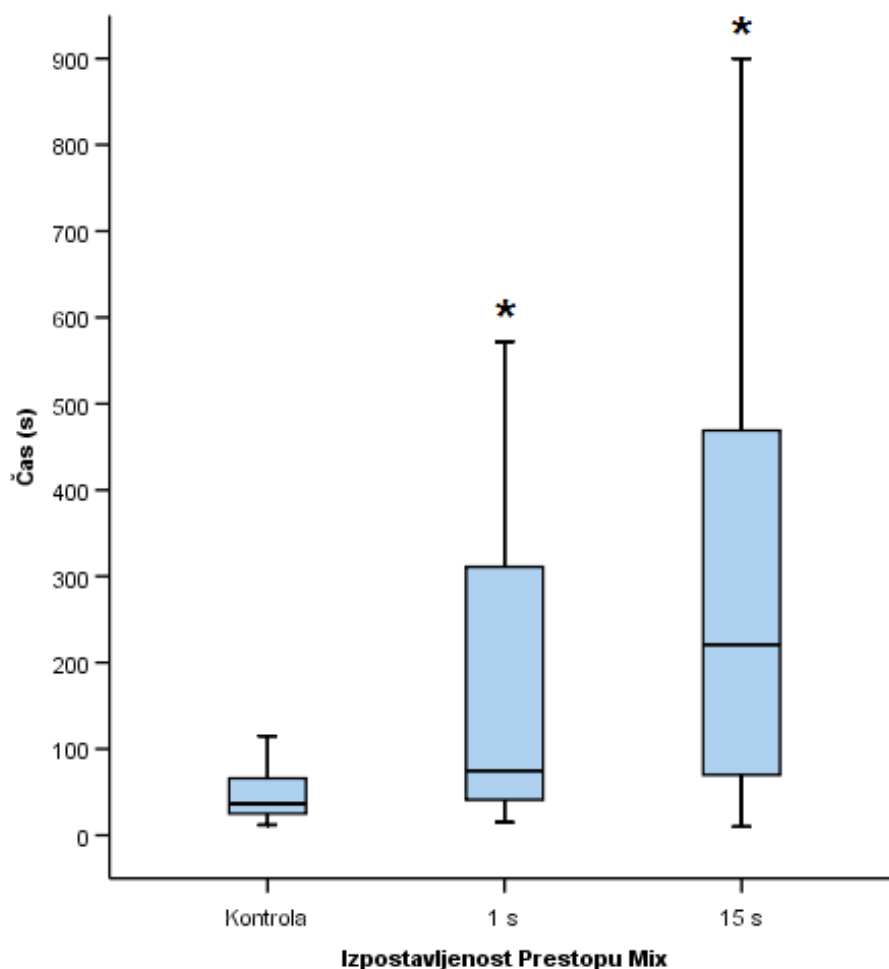
Slika 26: Delež čebel, ki so se vrnile v panj v prvih 15 minutah. *= statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (0), χ^2 , $p_{(\text{kontrola} : 1 \text{ min})} < 0,05$, $N_{\text{kont.}} = 165$, $N_{1 \text{ min}} = 165$; χ^2 , $p_{(\text{kontrola} : 15 \text{ min})} < 0,001$, $N_{15 \text{ min}} = 165$



Slika 27: Delež vseh čebel, ki so se vrnile do večera ($N = 495$). Razlike med kontrolo (0) in tretiranima skupinama (1 in 15s) ni bilo, $N_{\text{kont.}} = 165$, $N_{1 \text{ min}} = 165$, $N_{15 \text{ min}} = 165$

4.4.2 Čas, ki so ga čebele porabile, da so se vrstile v panj

Čebele, ki so bile izpostavljene PM, so za vračanje v panj rabile dalj časa. Mediana časa vračanja kontrolne skupine je bila 37,0 s, med tem ko so čebele, ki so bile PM izpostavljene 1 sekundo, za vračanje porabile dvakrat več (75,0 s; $p < 0,001$; Mann-Whitney U test), čebele, ki so bile izpostavljene 15 sekund pa šestkrat toliko časa (221,0 s; $p < 0,001$; Mann-Whitney U test) (Slika 28). Statistično značilna razlika je bila tudi med 1 sekundo in 15 sekund izpostavljenimi čebelami ($p < 0,001$; Mann-Whitney U test).



Slika 28: Čas, ki so ga čebele potrebovale, da so se vrstile v panj. *= statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolo (0), Mann-Whitney U test, $p_{(kont. : 1 s)} < 0,001$, $N_{kont.} = 165$, $N_{1 s} = 165$; $p_{(kont. : 15 s)} < 0,001$; $N_{15 s} = 165$; $p_{(1 s : 15 s)} < 0,001$

4.5 VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU

Opazovali smo vedenje čebel v novejši verziji razdelilnika pred in po dodatku PM in ga primerjali z vedenjem v prvotni verziji (Zaplotnik, 2013). PM je vplival na vedenje čebel takoj po dodatku sredstva, ko je bila njegova količina velika. Po eni uri je bilo stanje večinoma normalizirano.

Pred dodajanjem PM v razdelilnik so čebele prečkale podlogo s ščetinami v ravni liniji. Opaziti je bilo tudi čebele, ki so se skozi ta del razdelilnika vračale v panj.

Po nasutju PM pa so bile čebele nekoliko vznemirjene. Sredstvo je oviralo normalen prehod preko ščetinaste podloge in izletavanje iz panja. Agresivnega vedenja, ki je bilo značilno v stari verziji razdelilnika, nismo opazili. Čebele so bile izpostavljene manjšim količinam sredstva, zato smo le redko opazili čebele, ki bi zaradi prekomerne izpostavljenosti obležale. Količina sredstva v razdelilniku se je postopno zmanjševala, istočasno pa se je zmanjševal tudi vpliv na vedenje. Ostanki sredstva so ostali v razdelilniku do naslednjega dne.

5 RAZPRAVA

5.1 PAŠNA DEJAVNOST ČEBEL NA JAGODAH

Rezultati so pokazali, da je bila intenzivnost čebelje paše na cvetovih jagod v popoldanskem času veliko večja kot v dopoldanskem. Predvidevamo, da je bila dejavnost čebel odvisna od vremenskih razmer, predvsem temperatur, ki so bile v dopoldanskem času nižje. Nižje dopoldanske temperature so bile poleg trenutnih vremenskih razmer tudi posledica lege nasada. Nasad je bil bolj izpostavljen popoldanskemu kot jutranjemu soncu.

Na pašno dejavnost čebel so lahko vplivali tudi alternativni viri paše. Spomladanske sorte jagod, ki so bile posajene tudi v poskusnem nasadu, začnejo s cvetenjem okoli začetka maja, odvisno od vremenskih razmer (Štampar in sod., 2009). Ravno v tem času je tudi veliko drugih virov čebelje paše (nepokošeni travniki, sadno drevje, ...), ki so morda bolj privlačni za čebele in le te zato manj intenzivno obiskujejo cvetove jagod. To težavo lahko zmanjšamo tako, da pripeljemo v nasad čebelje družine v času, ko so cvetovi jagod za čebele najbolj privlačni. To je v trenutku, ko je odprtih 5 do 10 % cvetov (Ngugi in sod., 2002). Poleg tega mora biti družina močna, polna mlade zalege, ki spodbuja čebele k nabiranju cvetnega prahu. Čebele bi lahko dodatno spodbudili k obiranju cvetov jagod z dražilno krmo, ki bi ji dodali vonj jagodnih cvetov.

Oddaljenost od panja ni vplivala na pašno dejavnost čebel. Čebele so s podobno intenziteto obiskovale cvetove jagod v vseh delih nasada, tudi na tistih, ki so bili najbolj oddaljeni od panja (40 m). Rezultat je bil pričakovan, saj je glede na to, da čebele lahko letijo na pašo celo nekaj kilometrov daleč, 40 m razmeroma majhna razdalja.

Poleg čebel smo na cvetovih jagod opazili tudi druge opraševalce. Največ je bilo muh trepetavk, ki so bile najbolj številčne ob začetku cvetenja. Opazili pa smo tudi posamezne čmrlje in hrošče. Drugih potencialnih opraševalcev nismo opazili oziroma nanje nismo bili pozorni, saj nas je predvsem zanimal obisk čebel.

Glede na to, da je bilo v okolici nasada prisotnih tudi več drugih čebeljih družin, na cvetovih jagod zagotovo nismo opazili le naših čebel, temveč tudi druge. Z vidika poskusa nas je zanimalo predvsem ali so cvetovi jagod za čebele zanimivi. Iz naših rezultatov je razvidno, da so, zato sklepamo, da so bile na cvetovih tudi naše čebele, ki so raznašale PM. Za metodo bi bilo dobro, da bi bil delež naših čebel na cvetovih čim večji. Glede na bližino

domnevamo, da so naše čebele prevladovala, čeprav dokazov o tem nimamo. Da so na cvetovih jagod bile prisotne res naše čebele, pa lahko posredno sklepamo iz učinka na zdravje jagod.

5.2 KOLIČINA BIOKONTROLNEGA SREDSTVA NA ČEBELAH

Količina spor na čebelah, ki so zapuščale panj, je bila najvišja ($3,3 \times 10^4$) takoj po aplikaciji PM, nato je upadala, vendar ne enakomerno. Presenetljivo visoke so bile vrednosti zadnjega vzorčenja, ko smo pričakovali najnižje število spor. Možna razlaga je, da je rezultat posledica majhnega vzorca in s tem posledičnega velikega vpliva slučajnosti. Čebele ne prehajajo razdelilnika le po sredini, kjer se sredstvo hitreje porabi, vendar tudi ob straneh, kjer je prehod čebel manjši in se tam sredstvo ohrani dlje časa. Tako imajo lahko tudi pozneje izletajujoče posamezne čebele na sebi višjo količino spor. Podobno si lahko razlagamo relativno visoko količino spor pri čebelah, ki so panj zapuščale zjutraj pred dodajanjem sredstva. Najverjetneje je bil PM prisoten v razdelilniku še od prejšnjega dne, predvsem na krajnih delih ščetinaste podloge. Nekatere čebele pred jutranjim izletom hodijo večkrat na brazdo panja preverjat, kdaj bodo zunanje razmere ugodne za izlet. V našem primeru so pri tem večkrat prečkale podlogo s PM. Prav zato je lahko količina spor na njih tako visoka. Z večjim vzorcem bi tovrstne vplive lahko izničili.

Količina spor na čebelah je bila tekom dneva različna in večino časa verjetno ne dovolj visoka za učinkovito zaščito cvetov. V literaturi zasledimo, da mora biti količina zaščitnega sredstva za uspešen prenos na cvetove večja od 10^4 spor/čebelo (Thomson in sod., 1992; Johnson in sod., 1993a; Dag in sod., 2000; Bilu in sod., 2004). Tako količino sredstva so v našem poskusu prenašale le čebele, ki so izletavale iz panja takoj po dodajanju PM. Za optimalno zaščito cvetov jagod bi bilo idealno, da bi bila količina spor na čebelah, ki izletavajo na pašo, visoka dlje časa. Tako bi se zadostna količina spor prenesla na večje število cvetov. Problem prehitre in neenakomerne porabe biotičnega sredstva v razdelilniku so opazili že v predhodni raziskavi in predlagali nekaj izboljšav (Zaplotnik, 2013). Bolj enakomerno porabo sredstva smo zagotovili s ščetinasto podlogo, ki smo jo vstavili v razdelilnik. Sredstvo, ki smo ga nanegli na podlogo, je tako ostalo v razdelilniku dlje časa.

Količina spor na telesih vračajočih čebel je bila veliko manjša kot pri izletajočih, kar je bilo pričakovano in zaželeno. Vračajoče čebele so imele na svojih telesih takoj po aplikaciji PM 10-krat manj spor kot izletne ob enakem času. Pri čebelah, ki so se vračale pozneje, je količina spor upadala bolj enakomerno.

Čebele med pašo niso izgubile vseh spor, zato so jih vnašale tudi v panj. Sredstvo PM je v praškasti obliki in se dobro oprime telesa, ki je gosto odlačeno. Količina spor na telesih čebel, ki se vračajo v panj, bi morala biti čim manjša, da bi bilo tudi tveganje za prisotnost ostankov sredstva v čebeljih pridelkih čim manjše.

5.3 UČINEK PRESTOPA MIX NA ZDRAVJE JAGOD

PM je povečal delež mase in števila zdravih jagod. Delež zdravih jagod je bil v primerjavi s kontrolno skupino večji približno za polovico, kar je zelo dober rezultat. Zaznaven je bil tudi učinek na delež števila zdravih jagod za vsak dan posebej. Oddaljenost vzorčne ploskve od panja ni vplivala na delež zdravih jagod. To smo pričakovali, saj je 40 metrov za čebele zelo kratka razdalja, poleg tega pa je bila v vseh vzorčnih ploskvah tudi podobna pašna aktivnost čebel. Raznos biokontrolnega sredstva je bil po celotnem nasadu primerljiv.

Učinkovitost zaščite jagod pred sivo plesnijo je odvisna od več dejavnikov. V prvi vrsti od nanosa sredstva na cvetove jagod. V našem primeru smo uporabili čebele, ki so se izkazale za uspešne prenašalke, kar se je odrazilo v povečanem deležu zdravih jagod. Oviro pri prenosu sredstva čebelam predstavljajo vremenske razmere. V primeru deževnega obdobja z nizkimi temperaturami čebele ne izletavajo na pašo, zato je takrat tudi količina zaščitnega sredstva na cvetovih jagod majhna. Poleg tega se v takih vremenskih razmerah siva plesen zelo dobro razvija (Williamson in sod., 2007) in povzroča velike izgube pridelka.

Kontrolne rastline so bile pokrite z mrežo, zato niso bile zaščitene le pred PM, ampak tudi pred oprашevanjem čebel. Kljub temu statistično značilnih razlik v količini pridelka med kontrolno in tretirano skupino ni bilo, kar je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji.

Število in masa plodov sta odvisna od več dejavnikov. Med najpomembnejšimi je kvaliteta opraitve (Sutton, 1998), zato smo v kontrolni skupini pričakovali veliko manjši pridelek. Domnevamo, da so odsotnost čebel nadomestile številne žuželke, predvsem muhe, ki smo

jih opazili pod mrežo. Tam so se izlegle ali pa so tja zašle. Zaradi omejenega prostora in stalnega iskanja izhoda, so z gibanjem verjetno prenašale tudi cvetni prah med cvetovi in jih uspešno oprahšile.

5.4 VPLIV PRESTOPA MIX NA SPOSOBNOST VRAČANJA ČEBEL V PANJ

PM je negativno vplival na sposobnost vračanja čebel. Učinek je bil opazen v prvih 15 min opazovanja, medtem ko zvečer razlik med tretiranimi in netretiranimi čebelami nismo opazili. Za vračanje so čebele porabile dvakrat oziroma šestkrat toliko časa. V vseh skupinah se je do večera vrnila velika večina čebel, kar pomeni, da so izpostavljenost sredstvu preživele.

Domnevamo, da je podaljšan čas vračanja posledica fizikalnih lastnosti PM in ne morebiti njegove strupenosti. Sredstvo je v obliki praška, ki se zelo dobro oprime čebel. Ko so izpostavljene večjim količinam sredstva, so lahko njihova krila otežena s praškom, imajo omejen dotok kisika zaradi zamašitve trahej ali pa prašek prekrije njihove oči in se ne morejo orientirati. Predvidevamo, da se pred povratkom v panj čistijo, zato se vrnejo kasneje.

Pri vrednotenju rezultatov je potrebno upoštevati, da so bile čebele v poskusu izpostavljene razmeroma velikim količinam sredstva, kakršnim so pri aplikaciji sredstva v panj izpostavljene le prve čebele, ki prečkajo razdelilnik. Velika večina čebel je izpostavljena manjšim odmerkom, zato domnevamo, da je uporaba v normalno razvitih družinah varna.

5.5 VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU

Sredstvo PM je vplivalo na vedenje čebel v razdelilniku, vendar bistveno manj kot v predhodni raziskavi (Zaplotnik, 2013). Pri našem opazovanju sredstvo takoj po aplikaciji ni izzvalo agresivnega vedenja, poleg tega je bilo zelo redko opaziti čebele, ki bi obležale v sredstvu. V primerjavi s prejšnjim opazovanjem je bilo sredstvo v razdelilniku prisotno dlje časa, vedenje pa se je normaliziralo bistveno hitreje.

Čebele uporabljene v našem poskusu so bile sredstvu izpostavljene že pred opazovanjem (v poljskem poskusu), zato so se nanj lahko privadile. Manjšega vpliva na vedenje tako ne moremo pripisati samo razliki v razdelilniku.

5.6 PREDLOGI ZA IZBOLJŠANJE APLIKACIJE SREDSTVA

Rezultati prvega poljskega poskusa v Sloveniji so zelo dobri. Za dokončno potrditev ustreznosti metode v naših razmerah, bi bile potrebne ponovitve poskusa.

V skladu z navodili proizvajalca smo sredstvo v razdelilnik vsuli zjutraj. Rezultati pašne aktivnosti čebel so pokazali, da so bile čebele najbolj aktivne po 12. uri. Za večjo učinkovitost nanosa bi bilo mogoče bolje, da bi sredstvo vsuli šele dopoldne ali v sredini dneva. Tako bi mogoče večji delež sredstva končal na cvetovih jagod.

Takoj po aplikaciji sredstva imajo čebele, ki zapuščajo panj, na svojih telesih (pre)visoko količino spor, zaradi česar se nekaj pripravka lahko izgubi. Temu bi se lahko izognili, če bi dodajali polovično dozo sredstva dvakrat na dan. To bi za pridelovalca sicer pomenilo več dela, a bi bil izkoristek verjetno večji.

Sredstvo nedvomno vpliva na vedenje čebel, vendar menimo, da vpliv ni tolikšen, da bi vplival na preživetje družin. Izgubo posameznih čebel lahko zdrava družina nadomesti. Kljub temu bi bilo dobro vpliv še zmanjšati. To bi lahko dosegli s spremembo oblike sredstva, tako da bi se čebel manj oprijemalo.

Ker so nasadi v Sloveniji razmeroma majhni, menimo, da je precejšnja možnost, da čebele tarčne kulture ne bi obiskovale v zadostni meri, ampak bi se usmerile na druge pašne vire v okolici. Pri uporabi čebel za nanos biokontrolnih sredstev je zato nujno spremljati dejavnost čebel. Verjetnost obiskovanja cvetov jagod bi lahko spodbudili tudi tako, da bi jih dražilno krmili s sladkorno raztopino z vonjem cvetov. V primeru, da bi čebele kljub temu letale drugam, je potrebno sredstvo nanesti na druge načine.

Menimo, da metoda ob določenih izboljšavah lahko predstavlja perspektiven način zaščite bolezni in bi lahko prispevala k razvoju ekološkega kmetijstva.

6 SKLEPI

Na osnovi naših rezultatov sklepamo naslednje:

Čebele najbolj aktivno obiskujejo cvetove jagod v sredini dneva in sicer po vsem nasadu z enako intenziteto, ne glede na oddaljenost od panja.

Količina spor glive *G. catenulatum* je tako na izletavajočih kot vračajočih čebelah največja takoj po aplikaciji sredstva. Vračajoče imajo sicer manj spor, vendar zaradi njihove prisotnosti obstaja precejšnje tveganje za prisotnost ostankov sredstva v čebeljih pridelkih.

Pri jagodah izpostavljenih Prestopu Mix je delež zdravih jagod približno za polovico večji in po celotnem nasadu podoben.

Prestop Mix podaljša čas vračanja čebel, ne vpliva pa na delež čebel, ki se vrnejo do večera.

Prestop Mix je v izboljšanem razdelilniku prisoten dlje časa in ima manjši vpliv na vedenje čebel v primerjavi s prvotno verzijo razdelilnika.

Sodeč po prvem poljskem poskusu je metoda učinkovita za zaščito jagod pred sivo plesnijo in varna za čebelo. Za dokončno potrditev bi bili potrebni dodatni poskusi. Z aplikacijo sredstva v dopoldanskem času bi učinkovitost mogoče lahko še povečali, s spremembo oblike sredstva pa zmanjšali vpliv na vedenje čebel.

7 POVZETEK

Evropa je druga največja pridelovalka jagod na svetu. Največje izgube pridelka povzroča siva plesen (*Botrytis cinerea*), ki jo zatirajo s fitofarmaceutskimi sredstvi. Problem uporabe fungicidov je razvoj odpornosti sive plesni, predvsem pa negativni vplivi na okolje in ostanki v pridelkih. Prav zato se vse bolj razširja ekološka pridelava, ki omejuje uporabo le-teh. Namesto pesticidov se pri ekološki pridelavi uporabljajo tudi biotična sredstva. Takšno sredstvo je tudi Prestop Mix (PM), ki vsebuje spore glive *Gliocladium catenulatum*.

Načini nanašanja biotičnih sredstev so različni. Lahko se jih nanaša s škropljenjem, vendar ta način ni dovolj učinkovit. Kot alternativo lahko uporabimo raznos s pomočjo čebel. Sredstvo dodamo v razdelilnik nameščen na panj, čebele pa ga pri izhodu iz panja poberejo ter prenašajo na cvetove.

V magistrskem delu smo ugotavljali učinkovitost kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*) pri raznosu sredstva PM. To smo ugotavljali na podlagi pašne aktivnosti čebel na cvetovih jagod, količini biokontrolnega sredstva na čebelah in učinka sredstva na zdravje jagod. Ugotavljali smo tudi, kako PM vpliva na sposobnost vračanja čebel v panj in vedenje čebel v razdelilniku.

Poljski poskus je potekal na nasadu jagod v Dvorski vasi na Gorenjskem. V nasad smo ob začetku cvetenja jagod pripeljali čebeljo družino in v različni oddaljenosti od panja označili osem vzorčnih ploskev. Polovico smo jih pokrili z mrežo in tako preprečili dostop čebel. Vsako jutro smo v razdelilnik vsuli 5 g PM.

Pašno aktivnost čebele smo opazovali preko celega dne in ugotovili, da so najbolj intenzivno obiskovale cvetove med 13. in 14. uro in sicer po vsem nasadu s podobno intenziteto, ne glede na oddaljenost od panja. V skladu z navodili proizvajalca smo sredstvo vsuli v razdelilnik zjutraj. Glede na rezultate bi bilo mogoče bolje, da bi sredstvo vsuli šele dopoldan ali v sredini dneva. Tako bi mogoče večji delež sredstva končal na cvetovih jagod.

Količino biokontrolnega sredstva smo določili tako na čebelah, ki so panj zapuščale, kot tudi na čebelah, ki so se vanj vračale. Vzorčili smo jih preko celega dne, prvič zjutraj pred dodajanjem PM v razdelilnik in za tem še 13-krat v določenem časovnem razmiku. Količino spor na telesih čebel smo nato analizirali s pomočjo nanosa na gojišča. Največ spor so imele čebele, ki so panj zapuščale zjutraj takoj po aplikaciji sredstva, nato pa se je

količina neenakomerno zmanjševala. Vračajoče so ravno tako imele največ spor takoj po dodatku sredstva, vendar 10-krat manj kot čebele, ki so panj zapuščale. Spore so bile na čebelah tudi pred dodajanjem sredstva, tako da se je sredstvo očitno obdržalo v razdelilniku in/ali na čebelah do naslednjega dne. Ker so bile spore tudi na vračajočih čebelah, obstaja precejšnje tveganje za prisotnost ostankov sredstva v čebeljih pridelkih.

Učinek PM na zdravje jagod smo ugotavljali na podlagi razmerja med zdravimi in obolelimi jagodami. PM je povečal delež mase in števila zdravih jagod. Delež zdravih jagod je bil v primerjavi s kontrolno skupino večji približno za polovico, kar je zelo dober rezultat. Učinek sredstva na število zdravih jagod je bil opazen tudi vsak dan posebej. Delež zdravih jagod je bil po celotnem nasadu podoben, kar pomeni, da je bil raznos sredstva po nasadu primerljiv.

Vpliv PM na sposobnost vračanja v panj smo opazovali v majhni čebelji družini. Pašne čebele smo ulovili, označili, izpostavili različnim količinam sredstva, izpustili in nato opazovali njihov čas vračanja. PM je podaljšal čas vračanja in sicer za dvakrat čebelam, ki so bile sredstvu izpostavljene 1 s in za šestkrat čebelam, ki so bile sredstvu izpostavljene 15 s. Ne glede na tretma se je v vseh skupinah do večera vrnila velika večina čebel, kar pomeni, da so izpostavljenost sredstvu preživele. Podaljšan čas vračanja je najverjetneje posledica fizikalnih lastnosti PM in ne morebiti njegove strupenosti.

Vpliv PM na vedenje čebel v razdelilniku smo opazovali v izboljšanem razdelilniku BeeTreat®, ki ima v delu, kamor vsujemo sredstvo, nameščeno podlogo s ščetinami in ga primerjali z vplivom iz prejšnje raziskave, kjer je bil razdelilnik brez podloge. Sredstvo je vplivalo na vedenje čebel v razdelilniku, vendar bistveno manj kot v predhodni raziskavi. Pri našem opazovanju sredstvo takoj po aplikaciji ni izzvalo agresivnega vedenja, poleg tega je bilo zelo redko opaziti čebele, ki bi obležale v sredstvu. V primerjavi s prejšnjim opazovanjem je bilo sredstvo v razdelilniku prisotno dlje časa, vedenje pa se je normaliziralo bistveno hitreje.

Rezultati so pokazali, da ta metoda predstavlja perspektiven način zaščite jagod pred sivo plesnijo in tako lahko prispeva k razvoju ekološkega kmetijstva v Sloveniji. Ker so pri nas nasadi majhni, je pri uporabi čebel za raznos biotičnega sredstva nujno opazovati ali čebele obiskujejo tarčno rastlino in ne morebiti alternativne pašne vire v okolici. Čeprav ima sredstvo določen vpliv na vedenje čebel, menimo, da ta ni tolikšen, da bi ogrožal preživetje družin. S spremembo oblike sredstva, bi bil vpliv lahko še manjši.

8 VIRI

- Albano S., Chagon M., de Oliveira D., Houle E., Thibodeau P. O., Mexia A. 2009. Effectiveness of *Apis mellifera* and *Bombus impatiens* as dispensers of the Rootshield biofungicide (*Trichoderma harzianum*, strain T-22) in a strawberry crop. *Hellenic Plant Protection Journal*, 2: 57-66
- Al-mazra'awi M. S., Shipp J. L., Broadbent A. B., Kevan P. G. 2006b. Biological control of *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae) and *Frankiniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) vectored *Beauveria bassiana* in greenhouse sweet pepper. *Biological Control*, 37: 89-97
- Biesmaijer J. C., Roberts A. P. M., Reemer M., Ohlemuller R., Edwards M., Peters T., Schaffers A. P., Potts S. G., Kleukers R., Thomas C. D., Settele J., Kunin W. E. 2006. Parallel declines in pollinators and insect pollinated plants in Britain and Netherlands. *Science*, 313: 351-354
- Bilu A., Dag A., Elad Y., Shafir S. 2004. Honey bee dispersal of biocontrol agents: an evaluation of dispensing devices. *Biocontrol Science and Technology*, 14: 607-617
- Božič J. 2008. Življenje čebel. V: Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje 1. Zdešar P. (ur.). Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 112-136
- Brimmer T. A., Boland G. J. 2003. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 100: 3-16
- Brittain C. A., Vighi M., Bommarco R., Settele J., Potts S. G. 2010. Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology*, 11: 106-115
- Butt T. M., Carreck N. L., Ibrahim L., Williams I. H. 1998. Honey bee mediated infection of pollen beetle (*Meligethes aeneus* Fab.) by the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology*, 8: 533-538
- Cane J. H., Tepedino V. J. 2001. Causes and extent of declines among native North American invertebrate pollinators: detection, evidence, and consequences. *Conservation Ecology* 5, 1: 1

- Card S. D., Pearson M. N., Clover G. R. G. 2007. Plant pathogens transmitted by pollen. *Australian Plant Pathology*, 36: 455-461
- Casida J. E. 2010. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2923-2931
- Casida J. E., Durkin K. A. 2013. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58: 99-117
- CORE organic II Call 2010. 2010. Tjele, International Centre for Research in Organic Food Systems: 15 str.
- Cota L. V., Maffia L. A., Mizubuti E. S. G., Macedo P. E. F. 2009. Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold. *Biological Control*, 50: 222-230
- Cota L. V., Maffia L. A., Mizubuti E. S. G., Macedo P. E. F., Antunes R. F. 2008. Biological control of strawberry gray mould by *Clonostachys rosea* under field conditions. *Biological Control*, 48: 515-522
- Cutler P., Slater R., Edmunds J. F., Maienfisch P., Hall R. G., Earley G. P., Pitterna T., Pal S., Paul V-L., Goodchild J., Blacker M., Hagmann L., Crossthwaite A. J. 2013. Investigating the mode of action of sulfoxaflor: a fourth-generation neonicotinoid. *Pest Management Science*, 69: 607-619
- Dag A., Weinbaum S. A., Thorp R., Eiskowitch D. 2000. Evaluation of pollen dispensers ('inserts') effect on fruit set and yield in almond. *Journal of Apicultural Research*, 39: 117-123
- Dedej S., Delaplane K. S., Scherm H. 2004. Effectiveness of honey bees in delivering the biocontrol agent *Bacillus subtilis* to blueberry flowers to suppress mummy berry disease. *Biological Control*, 31: 422-427
- Delfosse E. S. 2005. Risk and ethics in biological control. *Biological control*, 35: 319-329
- Directive 2009/128/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. 2009. *Official Journal of the European Union*, 309: 71-86

http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2009.309.01.0071.01.SLV (4. 9. 2014)

- Ellis J. D., Evans J. D., Pettis J. 2009. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49, 1: 134-136
- Escande A. R., Laich F. S., Pedraza M. V. 2002. Field testing of honeybee-dispersed *Trichoderma spp.* to manage sunflower head rot (*Sclerotinia sclerotiorum*). *Plant Pathology*, 51: 346-351
- FAOSTAT database. 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations 2012. Rome, FAOSTAT
<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QC/E> (11. 9. 2014)
- Farina W. M., Gruter C., Acosta L., Mc Cabe S. 2007. Honeybees learn floral odors while receiving nectar from foragers within the hive. *Naturwissenschaften*, 94: 55-60
- Forrest J., Thomson J. D. 2009. Background complexity affects colour preference in bumblebees. *Naturwissenschaften*, 96: 921-925
- Free J. B. 1969. Influence of odour of a honeybee colony's stores on the behaviour of its foragers. *Nature*, 222: 778
- Gabriel D., Tschardt T. 2007. Insect pollinated plants benefit from organic farming. *Agriculture. Ecosystems & Environment*, 118: 43-48
- Gallai N., Salles J. M., Settele J., Vaissière B. E. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68: 810-821
- Ghazoul J. 2005. Buzziness as usual? Questioning the global pollination crisis. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 7: 367-373
- Gregorc A. 2008. Anatomija in fiziologija čebele. V: Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje 1. Zdešar P. (ur.). Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 37-101

- Gross H. R., Hamm J. J., Carpenter J. E. 1994. Design and application of a hive-mounted device that uses honey bees (Hymenoptera: Apidae) to disseminate *Heliothis nuclear polyhedrosis* virus. *Biological Control*, 23: 492-501
- Guerra-Sanz J. M. 2008. Crop pollination in greenhouses. V: Bee pollination in agriculture ecosystems. James R. R., Pitts-Singer T. (ur.). New York, Oxford University Press: 27-46
- Hokannen H. M. T., Menzler-Hokkanen I. 2007. Use of honeybees in the biological control of plant diseases. *Entomological Research*, 37: A62-A63
- International Pollinators Initiative: The São Paulo Declaration on Pollinators. Report on the Recommendations of the Workshop on the Conservation and Sustainable Use of Pollinators in Agriculture with Emphasis on Bees. 1999. Brasilia, Brazilian Ministry of the Environment: 51 str.
- Javni pregledovalnik grafičnih podatkov MKGP. 2014. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije
http://rkg.gov.si/GERK/WebViewer/#map_x=500000&map_y=100000&map_sc=1828571
(4. 1. 2015)
- Johnson K. B., Stockwell V. O., Mclaughlin R. J. 1993a. Effect of antagonistic bacteria on establishment of honey bee-dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control. *Phytopathology*, 83: 995-1002
- Jyoti J. L., Brewer G. J. 1999. Honey bees (Hymenoptera: Apidae) as vectors of *Bacillus thuringiensis* for control of banded sunflower moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*, 28, 6: 1172-1176
- Kapongo J. P., Shipp L., Kevan P. 2008b. Optimal concentration of *Beauveria bassiana* vectored by bumble bees in relation to pest and bee mortality in greenhouse tomato and sweet pepper. *Biocontrol*, 53: 797-812
- Kevan P. G., Kapongo J-P., Al-mazra'awi M., Shipp L. 2008. Honey bees, bumble bees and biocontrol. V: Bee pollination in agriculture ecosystems. James R. R., Pitts-Singer T. (ur.). New York, Oxford University Press: 65-79

- Kovach J., Petzoldt R., Harman G. E. 2000. Use of honeybees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for *Botrytis* control. *Biological Control*, 18: 235-242
- Legard D. E., Xiao C. L., Mertely J. C., Chandler C. K. 2000. Effects of plant spacing and cultivar on incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry. *Plant Disease*, 84: 531-538
- Lima G., Ippolito A., Nigro F. and Salerno M. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*, 10: 169-178
- Liu Z., Yao X., Zhang Y. 2008. Insect nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs): important amino acid residues contributing to neonicotinoid insecticides selectivity and resistance. *African Journal of Biotechnology*, 7: 4935-4939
- Maccagnani B., Mocioni M., Gullino M. L., Ladurner E. 1999. Application of *Trichoderma harzianum* by using *Apis mellifera* as a vector for the control of grey mold of strawberry: first results. *IOBC Bull*, 22: 161-164
- Maccagnani B., Mocioni M., Ladurner E., Gullino M. L., Maini S. 2005: Investigation of hive-mounted devices for the dissemination of microbiological preparations by *Bombus terrestris*. *Bulletin of Insectology*, 581: 3-8
- Mertely J. C., MacKenzie S. J., Legard D. E. 2002. Timing of fungicide applications for *Botrytis cinerea* based on development stage of strawberry flowers and fruit. *Plant Disease*, 86: 1019-1024
- Martinčič, A., T. Wraber, N. Jogan, A. Podobnik, B. Turk in B. Vreš, 2007: Mala flora Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- Mommaerts V., Smaghe G. 2011. Entomovectoring in plant protection. *Arthropod – Plant Interaction*, 5: 81-95
- Mommaerts V., Sterk G., Hofmann L., Smaghe G. 2009. A laboratory evaluation to determine the compatibility of microbiological control agents with the pollinator *Bombus terrestris*. *Pest Management Science*, 65: 949-955

- Mommaerts, V., Put K., Vandeven J., Jans K., Sterk G., Hoffmann L., Smaghe G. 2010. Development of a new dispenser for microbiological control agents and evaluation of dissemination by bumble bees in green-house strawberries. *Pest Management Science*, 66: 1199-1207
- Naug D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*, 142: 2369-2372
- Ngugi H. K., Scherm H., Lehman J. S. 2002. Relationship between blueberry flower age, pollination and conidial infection by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. *Ecology Population Biology*, 92: 1104-1109
- Orr D. 2009. Biological control and integrated pest management. V: *Integrated Pest Management: Vol. 1: Innovation-Development Process*. Peshin R., Dhavan A. K. (ur.). Berlin, Springer Science+Business Media: 207-239
- Peng G., Sutton J. C., Kevan P. G. 1992. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent to *Gliocladium roseum* strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 14: 117-129
- Potts S. G., Roberts S. P. M., Dean R., Marris G., Brown M. A., Jones R., Neumann P., Settele J. 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 49, 1: 15-22
- Rosslbroich H.-J., Stuebler D. 2000. *Botrytis cinerea* - history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 19: 557-561
- Sgolastra F., Renzi T., Draghetti S., Medrzycki P., Lodesani M., Maini S., Porrini C. 2012. Effects of neonicotinoid dust from maize seed-dressing on honey bees. *Bulletin of Insectology*, 65: 273-280
- Shafir S., Dag A., Bilu A., Abu-Toamy M., Elad Y. 2006. Honeybee dispersal of the biocontrol agent and *Trichoderma harzianum* T39: effectiveness in suppressing *Botrytis cinerea* on strawberry under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 119-128

- Spaethe J., Tautz J., Chittka L. 2001. Visual constraints in foraging bumblebees: flower size and color affect search time and flight behaviour. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 98: 3898-3903
- Steffan-Dewenter I., Kuhn A. 2003. Honeybee foraging in differentially structured landscapes. *Proceedings of the Royal Society of London*, 270: 569-75
- Sundh I., Goettel M. S. 2012. Regulating biocontrol agents: a historical perspective and a critical examination comparing microbial and macrobial agents. *Biological Control*, 58, 5: 575-593
- Sutton J. C. 1998. Botrytis fruit rot (gray mold) and blossom blight. V: *Compendium of Strawberry Diseases*. Maas J. L. (ur.). St. Paul, APS Press: 28-31
- Sutton J. C., Peng G. 1993. Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in cropping systems. *Annual Review Phytopathology*, 31: 473-493
- Štampar F., Lešnik M., Veberič R., Solar A., Koron D., Usenik V., Hudina M., Osterc G. 2009. *Sadjarstvo*. Ljubljana, Kmečki glas: 416 str.
- Tahvonen R. T., Avikainen H. H., Keskinen M. T., Lahdenperä M-L., Seiskari P. T., Teperi, E. P., Tuominen U. A. 1997. Fungus *Gliocladium catenulatum* for biological control of plant diseases. EU patent specification EP 0 792 348 B1: 24 str.
<http://patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/9b2229daa7bb30eb5ed9/EP0792348B1.pdf>. (3. 1. 2015)
- Tapparo A., Marton D., Giorio C., Zanella A., Solda L., Marzaro M., Vivan L., Girolami V. 2012. Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. *Environmental Science & Technology*, 46: 2592-2599
- Tautz J. 2010. Čudežni svet čebel. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 287 str.
- Tehnološka navodila za integrirano pridelavo sadja. 2013. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, Republika Slovenija: 62 str.

http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Kmetijstvo/Integrirana_pridelava/TN_sadje_2013_popravek.pdf (11. 9. 2014)

- Thom C. 2003. The trumble dance of honey bees can be caused by hive-external foraging experience. *The Journal of Experimental Biology*, 206: 2111-2116
- Thomas M. B., Willis A. J. 1998. Biocontrol - risky but necessary? *Trends in Ecology and Evolution*, 13, 8: 3
- Thomson S. V., Hansen D. R., Flint K. M., Vandenberg J. D. 1992. Dissemination of bacteria antagonistic to *Erwinia amylovora* by honey bees. *Plant Disease*, 76: 1052–1056
- Van der Steen J. J. M., Langerak C. J., Van Tongeren C. A. M., Dik A. J. 2003. Aspects of the use of honeybees and bumblebees as vector of antagonistic micro-organisms in plant disease control. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting*, 15: 41-46
- Van der Zee R., Pisa L., Andonov S., Brodschneider R., Charrière J. D., Chlebo R., Coffey M., Crailsheim K., Dahle B., Gajda A., Gray A., Drazic M. M., Higes M., Kauko L., Kence A., Kence M., Kezic N., Kiprijanovska H., Kralj J., Kristiansen P., Hernandez R. M., Mutinelli F., Nguyen B. K., Otten C., Özkirim A., Pernal S. F., Peterson M., Ramsay G., Santrac V., Soroker V., Topolska G., Uzunov A., Vejsnæs F., Wei S., Wilkins S. 2012. Managed honey bee colony losses in Canada, China, Europe, Israel and Turkey, for the winters of 2008-9 and 2009-10. *Journal of Apicultural Research*, 51, 1: 100-114
- Van Engelsdorp D., Underwood R., Caron D., Hayes J. Jr. 2007. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006-2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*, 147: 599-603
- Vandenbergi J. D. 1990. Safety of four entomopathogens for caged adult honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 83: 755-759
- Vanneste J. L. 1996. Honey bees and epiphytic bacteria to control fire blight, a bacterial disease of apple and pear. *Biocontrol News Information*, 17: 67-78
- Wilcox W. F., and Seem R. C. 1994. Relationship between strawberry gray mold incidence, environmental variables, and fungicide applications during different periods of the fruiting season. *Phytopathology*, 84: 264-270

- Williams N. M., Minckley R. L., Silveira F. A. 2001. Variation in native bees faunas and its implications for detecting community change. *Conservation Ecology*, 54: 57-89
- Williamson B., Tudtyinski B., Tudzynski P., van Kan J. A. L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 5: 561-580
- Winfree R., Aguilar R., Va'zquez D. P., Lebuhn G., Aizen M. A. 2009. A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology*, 90: 2068-2076
- Wolf S., Moritz R. F. A. 2008. Foraging distance in *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, 39: 419-427
- Yu H., Sutton J. C. 1997. Effectiveness of bumblebees and honeybees for delivering inoculum of *Gliocladium roseum* to raspberry flowers to control *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 10: 113-122
- Zaplotnik Š. 2013. Varnost biotičnega sredstva glive *Gliocladium catenulatum* za prenašalko kranjsko čebelo. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 62 str.

ZAHVALA

Hvala prof. dr. Andreju Čoklu, ki me je sprejel pod svoje mentorstvo.

Somentorju, dr. Danilu Bevku, se iskreno zahvaljujem za odlično mentorstvo in za vso pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Hvala za vse podeljene nasvete, izkušnje in znanje.

Recenzentu, prof. dr. Janku Božiču, se zahvaljujem za korekten pregled magistrske naloge, vse popravke in nasvete.

Andreju in Aniti Šlibar, ki sta dovolila, da smo opravljali poljski poskus na njunem nasadu jagod, se zahvaljujem za vso pomoč, sodelovanje in prijaznost.

Dr. Mancij Pirc, Lidiji Matičič in Špeli Prijatelj Novak iz Oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo se zahvaljujem za izvedbo analize spor. Mancij za celotno izvedbo analize, Lidiji in Špeli pa za pripravo gojišč in nacepljanje ekstraktov.

Hvala vsem sošolcem in prijateljem, ki ste me podpirali na moji študijski poti. Skupaj z vami je bil študij veliko lepši.

Na koncu iskrena hvala moji družini, ki mi vedno stoji ob strani.