

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Špela ZAPLOTNIK

VARNOST BIOTIČNEGA SREDSTVA GLIVE
***Gliocladium catenulatum* ZA PRENAŠALKO**
KRANJSKO ČEBELO

Magistrsko delo
(Magistrski študij – 2. stopnja)

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Špela ZAPLOTNIK

**VARNOST BIOTIČNEGA SREDSTVA GLIVE *Gliocladium*
catenulatum ZA PRENAŠALKO KRANJSKO ČEBELO**

Magistrsko delo
(Magistrski študij – 2. stopnja)

**SAFETY OF FUNGAL BIOCONTROL AGENT *Gliocladium*
catenulatum TO ITS VECTOR THE CARNIOLAN HONEY BEE**

M. Sc. Thesis
(Master Study Programmes)

Ljubljana, 2013

Vsi poskusi magistrskega dela in statistična obdelava podatkov so bili opravljeni na Oddelku za entomologijo Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

Na predlog Komisije za študij 1. in 2. stopnje je Senat Oddelka za biologijo potrdil prijavo magistrskega dela in za mentorja imenoval prof. dr. Andreja Čokla (Nacionalni inštitut za biologijo), za somentorja pa dr. Danila Bevka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rudi VEROVNIK
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:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Špela Zaplotnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 638.12:582(043.3)=163.6
KG	biokontrola/ <i>Gliocladium catenulatum</i> /učenje/smrtnost/vedenje/ <i>Apis mellifera carnica</i>
AV	ZAPLOTNIK, Špela, diplomirana biologinja (UN)
SA	ČOKL, Andrej (mentor)/BEVK, Danilo (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2013
IN	VARNOST UPORABE BIOTIČNEGA SREDSTVA GLIVE <i>Gliocladium catenulatum</i> ZA PRENAŠALKO KRANJSKO ČEBELO
TD	Magistrsko delo
OP	X, 62 str., 4 pregl., 29 sl., 120 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Siva plesen (<i>Botrytis cinerea</i>) je ena glavnih bolezní jagod, ki jo lahko zatiramo s fungicidi ali z biotičnimi sredstvi. Za prenos slednjih lahko uporabimo tudi čebele. Ugotavljali smo vpliv biotičnega sredstva Prestop Mix (PM) s sporami glive <i>Gliocladium catenulatum</i> na odzivnost na prehranske dražljaje, smrtnost in vedenje čebel v in pred razdelilnikom, nameščenim na vhodu panja. Vpliv na odzivnost na prehranske dražljaje smo testirali s klasičnim pogojevanjem refleksa iztegovanja jezička. Rezultati vpliva niso potrdili. Vpliv na smrtnost smo spremljali štiri dni v kletkah v inkubatorju. V primerjavi s kontrolno skupino je bila smrtnost pri čebelah, ki so bile PM izpostavljene samo prvi dan, dvakrat, pri čebelah, ki so bile PM izpostavljene vsak dan pa štirikrat večja. Vedenje čebel v razdelilniku in pred njim smo spremljali s kamero. PM je zelo spremenil vedenje čebel. Zelo se je zmanjšalo število direktnih prehodov razdelilnika, čebele pa so se PM skušale izogibati. Spremembe so bile najbolj očitne prvo uro, nato pa so se manjšale. Predlagamo izboljšavo razdelilnika in spremembo pripravka PM, da bo negativen vpliv na čebele manjši, učinkovitost raznosa pa večja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDK 638.12:582(043.3)=163.6
CX biocontrol/*Gliocladium catenulatum*/learning/mortality/behavior/*Apis mellifera carnica*
AU ZAPLOTNIK, Špela
AA ČOKL, Andrej (supervisor)/BEVK, Danilo (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2013
TI SAFETY OF FUNGAL BIOCONTROL AGENT *Gliocladium catenulatum* TO ITS VECTOR THE CARNIOLAN HONEY BEE
DT M. Sc. Thesis
NO X, 62 p., 4 tab., 29 fig., 120 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 be spread by bees. We examined the impact of the biocontrol agent Prestop Mix (PM) with *Gliocladium catenulatum* spores on bees' response to food stimuli, mortality, and behavior inside and outside of a dispenser mounted on a hive. We tested effects on response to food stimuli by classical conditioning of the proboscis extension reflex. The results did not confirm any effect. We monitored the impact on mortality in cages in an incubator for four days. Compared with the control group, mortality was two times higher for the bees that were exposed to PM only on the first day and four times higher for bees that were exposed to PM every day. We monitored the bees' behavior inside and outside the dispenser with a camera. PM drastically changed the bees' behavior. There was a significant decrease in number of direct crossings of the dispenser and bees were trying to avoid PM. Changes were most obvious in the first hour, and then subsided. We suggest some improvements to the dispenser and also a change in the preparation of PM in order to decrease the negative effect on honey bees and also increase the efficiency with which it is spread.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 MEDONOSNA ČEBELA <i>Apis mellifera</i>	2
2.1.1 Kranjska čebela <i>Apis mellifera carnica</i>	2
2.1.2 Čebelja družina.....	3
2.1.3 Stanje čebel v današnjem času (Umiranje čebel)	3
2.2 BIOKONTROLA	4
2.2.1 Splošno o biokontroli.....	4
2.2.2 Biotična sredstva.....	5
2.2.3 Uporaba žuželk pri prenosu biotičnega sredstva	5
2.2.3.1 Uporaba čebel pri prenosu biotičnega sredstva	6
2.3 VPLIVI FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV NA MEDONOSNO ČEBELO .	7
2.3.1 Vpliv fitofarmacevtskih sredstev na smrtnost čebel	7
2.3.2 Vpliv na učenje	8
2.3.2.1 Splošno o učenju čebel	8
2.3.2.2 Metode raziskovanja učenja čebel.....	9
2.3.2.3 Vpliv fitofarmacevtskih sredstev na učenje	9
2.3.3 Vpliv na pašno dejavnost.....	10
2.3.3.1 Pomen in lastnosti pašnega vedenja	10
2.3.3.2 Vedenje na vhodu.....	11
2.4 SIVA PLESEN <i>Botrytis cinerea</i>	12
2.4.1 Splošno o sivi plesni.....	12
2.4.2 Zatiranje sive plesni	13
2.4.2.1 Fungicidi za zatiranje sive plesni jagod in njihov vpliv na čebele.....	13
2.4.2.2 Biotična sredstva za zatiranje sive plesni jagod	14
3 MATERIALI IN METODE DELA	15

3.1	ODZIVNOST NA PREHRANSKE DRAŽLJAJE	15
3.1.1	Priprava in imobilizacija čebel.....	15
3.1.2	Občutljivost na saharozo	17
3.1.3	Testiranje odziva po enkratnem draženju s pogojnim dražljajem.....	17
3.2	SMRTNOST.....	20
3.3	VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU IN PRED NJIM.....	21
3.4	ANALIZA PODATKOV	28
4	REZULTATI	29
4.1	ODZIVNOST NA PREHRANSKE DRAŽLJAJE	29
4.1.1	Odzivnost in občutljivost na saharozo.....	29
4.1.2	Testiranje odziva po enkratnem draženju s pogojnim dražljajem (1 min in 12 min).....	31
4.2	SMRTNOST.....	32
4.3	VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU IN PRED NJIM.....	34
4.3.1	Vedenje pred razdelilnikom	34
4.3.2	Vedenje čebel v razdelilniku.....	36
4.3.2.1	Pogostost posameznih vedenj v dneh brez in s Prestopom Mix.....	36
4.3.2.2	Pogostost posameznih vedenj v dnevu brez in prvem dnevu s Prestopom Mix....	39
4.3.2.3	Dolgotrajnejša izpostavitve čebel Prestopu Mix	43
5	RAZPRAVA.....	46
5.1	VPLIV PRESTOPA MIX NA ODZIVNOST NA PREHRANSKE DRAŽLJAJE	46
5.2	VPLIV PRESTOPA MIX NA SMRTNOST	46
5.3	VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU IN PRED NJIM.....	47
5.3.1	Vedenje pred razdelilnikom	47
5.3.2	Vedenje čebel v razdelilniku.....	47
5.3.2.1	Pogostost posameznih vedenj v dneh brez in s Prestopom Mix.....	47
5.3.2.2	Pogostost posameznih vedenj v dnevu brez in prvem dnevu s Prestopom Mix....	48
5.3.2.3	Dolgotrajnejša izpostavljenost čebel Prestopu Mix	48
5.4	PRIPRAVA ČEBEL NA TRETIRANJE S PRESTOPOM MIX	49
5.5	PREDLOGI IN MOŽNE IZBOLJŠAVE RAZDELILNIKA IN BIOTIČNEGA SREDSTVA	49
6	SKLEPI	50
7	POVZETEK.....	51
8	VIRI	53

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Potek snemanja po dnevih z ali brez Prestopa Mix v razdelilniku. Po posameznih dnevih je prikazano tudi, kolikokrat je bila posamezna družina čebel predhodno izpostavljena Prestopu Mix.	23
Pregl. 2: Izpostavljenost poskusnih družin Prestopu Mix in potek snemanja po urah v posameznem dnevu. V dnevih s Prestopom Mix smo snemanje izvajali tudi 15 in 30 minut po dodatku biotičnega sredstva v razdelilnik.	24
Pregl. 3: Odzivnost na saharozo pri čebelah, ki so bile nato vključene v prvi in drugi poskus testiranja 1 ali 12 min po enem pogojnem dražljaju. Merilo odzivnosti je bil PER odziv na vsaj 40 % raztopino saharoze.	29
Pregl. 4: Število vseh čebel in vseh vedenjskih dogodkov v posameznih dneh izpostavitve čebel druge družine Prestopu Mix v uri pred dodatkom in takoj po dodatku sredstva v razdelilnik.	44

KAZALO SLIK

Sl. 1: Kranjska čebela (<i>Apis mellifera carnica</i>) (vir: http://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:Apis_mellifera_carnica_worker_hive_entrance_3.jpg).....	2
Sl. 2: Siva plesen jagod (<i>Botrytis cinerea</i>) (vir: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Aardbei_Lambda_vruchtrot_Botrytis_cinerea.jpg)	13
Sl. 3: Lonček z biotičnim sredstvom Prestop Mix (Zaplotnik Š., 2012)	16
Sl. 4: Tretiranje čebel s Prestopom Mix (Zaplotnik Š., 2012).....	16
Sl. 5: Čebele fiksirane na kovinskih tulcih (Zaplotnik Š., 2012)	17
Sl. 6: Čebela izpostavljena zračnemu toku, ki je bil usmerjen v njene tipalnice. (Zaplotnik Š., 2012)	18
Sl. 7: V tok zraka smo za 3 sekunde spustili vonj eteričnega olja, nato pa čebelo nagradili s 40 % sladkorno raztopino. (Zaplotnik Š., 2012)	18
Sl. 8: PER odziv na vonj po 1 ali 12 min. Čebela, ki je bila po določenem času zopet izpostavljena vonju in je povezala vonj z nagrado (sladkorno raztopino), je ob tem iztegnila jeziček. (Zaplotnik Š., 2012)	19
Sl. 9: Stimulator Stimulus controler za dovajanje zračnega toka (Zaplotnik Š., 2012).....	19
Sl. 10: Kovinske kletke s čebelami v inkubatorju za ugotavljanje vpliva sredstva Prestop Mix na smrtnost. (Zaplotnik Š., 2012)	20
Sl. 11: Razdelilnik z mikro kamero, nameščen na panj (Bevk D., 2012).....	21
Sl. 12: Odprt razdelilnik z biotičnim sredstvom. Na del razdelilnika, ki ga morajo čebele prečkati pri izhodu iz panja, smo naenkrat dodali 5 g biotičnega sredstva. (Bevk D., 2012)	22
Sl. 13: Občutljivost na saharozo pri čebelah, ki so bile nato vključene v prvi poskus testiranja po enem pogojnem dražljaju. * = statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino (Mann-Whitney <i>U</i> test, $p < 0.05$, $N = 216$).....	30
Sl. 14: Občutljivost na saharozo pri čebelah, ki so bile nato vključene v drugi poskus testiranja po enem pogojnem dražljaju. * = statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino (Mann-Whitney <i>U</i> test, $p < 0.01$, $N = 229$).....	31
Sl. 15: Delež čebel s PER odzivom na pogojni dražljaj 1 in 12 minut po testiranju odziva po enem pogojnem dražljaju ($N_1 \text{ min} = 216$, $N_{12 \text{ min}} = 229$), ni statistično značilnih razlik.....	32
Sl. 16: Smrtnost po dnevih, * = statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino (χ^2 , p (kontrola:akutno) 1. dan < 0.05 , $N = 400$, p (kontrola:kronično) 1. dan < 0.05 , $N = 400$; χ^2 , p (kontrola:kronično) 2. dan < 0.01 , $N = 380$; χ^2 , p (kontrola:kronično) 3. dan < 0.05 , $N = 361$; χ^2 , p (kontrola:kronično) 4. dan < 0.01 , $N = 349$).	33
Sl. 17: Kumulativna smrtnost po dnevih, * = statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino (χ^2 , p (kontrola:akutno) $_{96 \text{ h}} < 0.05$, p (kontrola:kronično) $_{96 \text{ h}} < 0.05$, $N = 400$ (200 za posamezno skupino čebel)).	33
Sl. 18: Največ čebel, ki so bile vidno kontaminirane, je bilo takoj po nasutju sredstva v razdelilnik, kasneje pa jih je bilo vedno manj. (Bevk D., 2012).....	34
Sl. 19: Bela čebela, ki je po izletu iz panja padla na tla (Bevk D., 2012)	35
Sl. 20: Čebela, ki se je pri prehodu polja s Prestopom Mix obrnila na hrbet (Zaplotnik Š., 2012)	36

- Sl. 21: Tri čebele v pretepu (Zaplotnik Š., 2012) 37
- Sl. 22: Pogostost posameznih vedenj v dnevih brez (K) in s Prestopom Mix (PM) v posameznem času snemanja. Pogostost posameznega vedenja je izračunana glede na število vseh vedenjskih dogodkov. Združeni so podatki iz obeh družin. V vsakem snemalnem času smo poskušali pridobiti po pet enominutnih posnetkov. Iz različnih razlogov (tehnične težave, nepregledni posnetki zaradi zaprašene kamere) smo jih v nekaterih primerih analizirali tudi manj. V prvi vrstici nad vsakim stolpcem je prikazano število testnih dni, v drugi število vseh čebel in v tretji število vseh vedenj. Ker smo snemanje v času 15 in 30 minut izvajali le v dneh s Prestopom Mix, v dneh brez za ta čas ni podatkov. Podrobnosti poteka poskusa so opisane v podpoglavju 3.3 in Preglednici 2. 38
- Sl. 23: Pogostost direktnega prehoda v posameznem času snemanja. Združeni so podatki za prvo in drugo družino za dan brez in prvi dan s sredstvom v času od ene ure pred (- 60 min) do ene ure po (60 min) dodatku sredstva v razdelilnik. Ker v dnevu brez PM v času 15 in 30 minut snemanja nismo izvajali, smo za ta čas zaradi lažjega grafičnega prikaza dodali niz "ni bilo opazovano". * = statistično značilna razlika v primerjavi z dnevom brez PM (χ^2 , $p < 0.05$, $N_{-60 \text{ min}} = 77$, $N_{0 \text{ min}} = 87$, $N_{60 \text{ min}} = 157$). 39
- Sl. 24: Pogostost izleta iz razdelilnika v posameznem času snemanja. Združeni so podatki za prvo in drugo družino za dan brez in prvi dan s sredstvom v času od ene ure pred (- 60 min) do ene ure po (60 min) dodatku sredstva v razdelilnik. Ker v dnevu brez PM v času 15 in 30 minut snemanja nismo izvajali, smo za ta čas zaradi lažjega grafičnega prikaza dodali niz "ni bilo opazovano". * = statistično značilna razlika v primerjavi z dnevom brez PM (χ^2 , $p < 0.05$, $N_{-60 \text{ min}} = 77$, $N_{0 \text{ min}} = 87$, $N_{60 \text{ min}} = 157$). 40
- Sl. 25: Pogostost obračanja na hrbet v posameznem času snemanja. Združeni so podatki za prvo in drugo družino za dan brez in prvi dan s sredstvom v času od ene ure pred (- 60 min) do ene ure po (60 min) dodatku sredstva v razdelilnik. Ker v dnevu brez PM v času 15 in 30 minut snemanja nismo izvajali, smo za ta čas zaradi lažjega grafičnega prikaza dodali niz "ni bilo opazovano". Ni statistično značilnih razlik ($N_{-60 \text{ min}} = 77$, $N_{0 \text{ min}} = 87$, $N_{60 \text{ min}} = 157$). 41
- Sl. 26: Pogostost preskoka dela razdelilnika s Prestopom Mix v posameznem času snemanja. Združeni so podatki za prvo in drugo družino za dan brez in prvi dan s sredstvom v času od ene ure pred (- 60 min) do ene ure po (60 min) dodatku sredstva v razdelilnik. Ker v dnevu brez PM v času 15 in 30 minut snemanja nismo izvajali, smo za ta čas zaradi lažjega grafičnega prikaza dodali niz "ni bilo opazovano". Ni statistično značilnih razlik ($N_{-60 \text{ min}} = 77$, $N_{0 \text{ min}} = 87$, $N_{60 \text{ min}} = 157$). 42
- Sl. 27: Pogostost pretepa v posameznem času snemanja. Združeni so podatki za prvo in drugo družino za dan brez in prvi dan s sredstvom v času od ene ure pred (- 60 min) do ene ure po (60 min) dodatku sredstva v razdelilnik. Ker v dnevu brez PM v času 15 in 30 minut snemanja nismo izvajali, smo za ta čas zaradi lažjega grafičnega prikaza dodali niz "ni bilo opazovano". * = statistično značilna razlika v primerjavi z dnevom brez PM (χ^2 , $p < 0.01$, $N_{-60 \text{ min}} = 77$, $N_{0 \text{ min}} = 87$, $N_{60 \text{ min}} = 157$). 43
- Sl. 28: Pogostost posameznih vedenj v uri pred dodatkom Prestopa Mix v razdelilnik v posameznih dneh izpostavitve sredstvu. Prikazani so podatki za dni, v katerih smo izvajali snemanje (dan pred izpostavitvijo, prvi, peti, šesti in osmi dan izpostavitve čebel Prestopu Mix). Delež je izračunan glede na skupno število vseh vedenjskih

dogodkov v petih enominutnih posnetkih v posameznem času opazovanja.

Podrobnosti poteka poskusa so opisane v podpoglavju 3.3 in Preglednici 2, število čebel in vedenjskih dogodkov pa je navedeno v Preglednici 4. * = statistično značilna razlika v primerjavi z dnevom brez PM (χ^2 , $p < 0.05$)..... 44

- Sl. 29: Pogostost posameznih vedenj takoj po dodatku Prestopa Mix v razdelilnik v posameznih dneh izpostavitve sredstvu. Prikazani so podatki za dni, v katerih smo izvajali snemanje (dan pred izpostavitvijo, prvi, peti, šesti in osmi dan izpostavitve čebel Prestopu Mix). Delež je izračunan glede na skupno število vseh vedenjskih dogodkov v petih enominutnih posnetkih v posameznem času opazovanja. Podrobnosti poteka poskusa so opisane v podpoglavju 3.3 in Preglednici 2, število čebel in vedenjskih dogodkov pa je navedeno v Preglednici 4. * = statistično značilna razlika v primerjavi z dnevom brez PM (χ^2 , $p < 0.05$), x = statistično značilna razlika v primerjavi s prvim dnevom s PM (χ^2 , $p < 0.05$)..... 45

1 UVOD

Jagode predstavljajo pomemben pridelek po vsem svetu (Jensen in sod., 2013). V Evropi kot največji pridelovalki jagod je zelo razširjena ekološka pridelava. Pri takem načinu gojenja je raba fitofarmaceutskih sredstev omejena, kar mnogokrat predstavlja problem pri zatiranju raznih bolezni (CORE organic II, 2010). Ena izmed glavnih bolezni jagod je siva plesen, ki jo je zelo težko nadzorovati, povzroča pa velike izgube pridelka (Williamson in sod., 2007). Namesto uporabe klasičnih fitofarmaceutskih sredstev, se danes vse bolj uvaja biotično zatiranje (biokontrola). Gre za uporabo organizmov (tudi mikroorganizmov) kot biotičnih sredstev, s katerimi zatiramo neželene bolezni in škodljivce.

Prvotne študije z uporabo biotičnih sredstev v obliki škropiv za zatiranje sive plesni jagod niso bile preveč obetavne. Težava škropljenja je, da 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, 2010). Boljši način prenosa biotičnih sredstev na rastline je uporaba žuželk kot uspešnih opraševalcev. Med njimi prevladujejo predvsem čebele. Te lahko biotično sredstvo pripravljeno v obliki praška poberejo pri izhodu iz panja in ga med pašo ob obiskovanju cvetov prenesejo na ciljne kulture. Tako prispevajo k zaščiti rastlin, hkrati pa z opraševanjem poskrbijo za večji donos pridelka.

Čebele so se kot uspešne prenašalke biotičnih sredstev izkazale že v mnogih raziskavah. Uporabljali so jih za prenos različnih sredstev za zatiranje mnogih bolezni rastlin, med drugim tudi sive plesni jagod (Peng in sod., 1992; Kovach in sod., 2000; Shafir in sod., 2006; Hokannen in Menzler-Hokannen, 2007). Uspešnost takšne strategije biokontrole je poleg prenašalca odvisna tudi od biotičnega sredstva ter samih interakcij med prenašalcem in sredstvom. Na uspeh čebel pri prenosu biotičnih sredstev pa vpliva tudi tip razdelilnika, ki ga namestimo na panj in v katerem čebele sredstvo poberejo (Mommaerts in Smagghe, 2011).

Pri zatiranju sive plesni kot biotična sredstva preizkušeno delujejo nekatere glive. Rezultati raziskave na Finskem kažejo, da je pri zatiranju te bolezni uspešna tudi gliva *Gliocladium catenulatum* (Hokannen in Menzler-Hokannen, 2007). Pri izbiri določenega biotičnega sredstva za uspešno zatiranje bolezni pa ni pomembna le učinkovitost samega sredstva, ampak je nujna tudi zagotovitev varnosti za ljudi, okolje in prenašalca. Z našo raziskavo smo zato želeli ugotoviti, če je biotično sredstvo Prestop Mix, ki vsebuje spore glive *Gliocladium catenulatum*, varno za prenašalko kranjsko čebelo (*Apis mellifera carnica*). V tem magistrskem delu smo raziskali vpliv omenjenega biotičnega sredstva na odzivnost na prehranske dražljaje, smrtnost in vedenje čebel. Cilj je bil tudi najti morebitne pomanjkljivosti razdelilnika in predlagati izboljšave.

Z različnimi poskusi smo testirali hipotezo, da Prestop Mix ne vpliva na odzivnost na prehranske dražljaje, smrtnost čebel ter vedenje na vhodu panja in je zato za čebele kot prenašalke varno. Med rezultati kontrolnih in tretiranih skupin pri vseh treh poskusih (odzivnost na prehranske dražljaje, smrtnost in vedenje) torej nismo pričakovali razlik.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MEDONOSNA ČEBELA *Apis mellifera*

Medonosna čebela, *Apis mellifera* je ena izmed najbolj razširjenih vrst iz rodu *Apis*. Naravno je razširjena v Afriki in večjem delu Evrope, človek pa jo je zanesel v različne dele sveta (Gregori in sod., 2003). Čebele so kot opraševalci pomembne tako z ekološkega kot tudi z ekonomskega vidika. Z opraševanjem rastlin prispevajo k večji biotski pestrosti (Pham-Delègue in sod., 2002), v veliki meri pa vplivajo tudi na proizvodnjo človeške in živalske hrane (Auguštin, 2008).

2.1.1 Kranjska čebela *Apis mellifera carnica*

Kranjska čebela *A. m. carnica* poleg temne čebele, *A. m. mellifera* in italijanske čebele, *A. m. ligustica* spada med najpomembnejše podvrste medonosne čebele v Evropi. Pogosto jo zaradi njene barve imenujemo kar sivka, saj je med evropskimi podvrstami najbolj siva. Njena izvorna dežela je Slovenija, razširjena pa je od vzhodnega obrobja Julijskih Alp in Visokih Tur, prek Panonske nižine in do Karpatov. S prilagajanjem krajevnim razmeram so nastali štirje ekotipi kranjske čebele – alpski, panonski, mediteranski in kraško-dinarski, razlikujejo pa se po morfologiji in usmerjenosti na določene paše (Gregori in sod., 2003; Gregori, 2008).

Kranjsko čebelo odlikuje njena miroljubnost in velik donos medu, nagnjena pa je k rojenju. Zaradi dobre orientacije se ne zaletava v sosednje panje. Prezimuje v majhnih družinah in je zmerna pri količini hrane, ki jo porabi pozimi. Zanja je značilen hiter spomladanski razvoj. Njena prilagodljivost ji omogoča dober izkoristek različnih naravnih pašnih virov (Gregori in sod., 2003; Rejski..., 2010).



Slika 1: Kranjska čebela (*Apis mellifera carnica*)

(vir: http://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:Apis_mellifera_carnica_worker_hive_entrance_3.jpg)

2.1.2 Čebelja družina

Posamezna čebela ni sposobna živeti samostojno, preživi lahko le v čebelji družini, ki deluje kot superorganizem. Čebeljo družino sestavljajo matica, čebele delavke in troti (Tautz, 2010). Vsaka družina ima le eno matico, 1000 do 2000 trotov in nekaj deset tisoč delavk. Vsak izmed članov družine ima svojo vlogo (Brvar, 2008; Tautz, 2010).

Čebelja družina šteje približno 50.000 osebkov v poletnem in 20.000 v zimskem času in je s stalnim menjavanjem svojih članov praktično nesmrtna. Matica se zamenja na vsakih tri do pet let, delavke na vsake štiri tedne do dvanajst mesecev, troti pa živijo le dva do štiri tedne. V primeru družine s 50.000 osebki se tako vsak dan zamenja približno 1 % čebel (Tautz, 2010).

Matica je edina spolno razvita samica v družini (Tautz, 2010). Njena glavna funkcija je zalega oplojenih in neoplojenih jajčec. Iz oplojenih se razvijejo čebele delavke in matice, iz neoplojenih pa troti (Brvar, 2008; Tautz, 2010). Matica ima dobro razvite feromonske žleze. S feromoni namreč usmerja življenje in delo v čebelji družini (Brvar, 2008).

Vse delavke so neplodne samice in v svojem življenju glede na starost, genetsko ozadje in potrebe družine opravljajo različne funkcije, kot so čiščenje, gradnja satja, negovanje zaroda, zračenje panja in straženje, v zadnjem obdobju svojega življenja pa izletavajo na pašo (Devillers 2002; Tautz, 2010). Funkcije v panju navadno opravljajo do tri tedne stare čebele, starejše pa se posvečajo paši (Božič, 2008).

Troti so v čebelji družini prisotni od pomladi do jeseni (Gregorc, 2002). Njihova osnovna funkcija je oploditev matic (Tautz, 2010). Vsak trot se pari samo enkrat, po oploditvi matice v zraku umre. Preostale trote konec poletja ali na začetku jeseni delavke na silo odstranijo iz panja (Gregorc, 2002; Čebelarški..., 2008).

2.1.3 Stanje čebel v današnjem času (Umiranje čebel)

V zadnjih desetletjih so tako v Evropi kot tudi v ZDA prisotne večje izgube čebeljih družin (Ellis in sod., 2010; Potts in sod., 2010). Največje so predvsem zimske izgube (Guzmán-Novoa in sod., 2010; Dainat in sod., 2012; van der Zee in sod., 2012). V Evropi so te v zimi 2009-2010 znašale med 7 in 30 % (van der Zee in sod., 2012). Jeseni leta 2006 so čebelarji v ZDA začeli poročati o izgubah čebeljih družin, ki so znašale kar od 30-90 %, simptomi pa se niso ujemali z že znanimi, ki so bili navadno vzrok za večje izgube. Nov pojav visokih izgub čebeljih družin, pri čemer gre za izgubo odraslih čebel iz družine, pri tem pa ni opaziti mrtvih čebel v panju ali okrog njega, so poimenovali CCD (angl. colony collapse disorder) (Naug, 2009; Ellis in sod., 2010).

Glavni vzroki CCD-ja še vedno niso povsem raziskani, so pa verjetno sorodni tistim, ki domnevno povzročajo splošne izgube čebel (Ellis in sod., 2010). To so razni škodljivci in bolezni, pesticidi in pomanjkanje hrane pa tudi podnebne spremembe (Poročilo..., 2008; Neumann in Carreck, 2010). Vsi ti dejavniki lahko vplivajo samostojno ali v kombinaciji z drugimi (Dainat in sod., 2012).

Med boleznimi je najbolj znana bolezen varoza, ki jo povzroča zajedavska pršica *Varroa destructor*. Mnoge študije jo navajajo kot glavni vzrok za izgube čebeljih družin (Genersch in sod., 2010; Guzmán-Novoa in sod., 2010; Dainat in sod., 2012). Med boleznimi čebeljih družin, ki jih povzročajo glive, je zelo razširjena nosemavost. Pri medonosni čebeli jo povzročata mikrosporidiji *Nosema apis* in *Nosema ceranae* (Gregorc, 2008; Evans in Schwarz, 2011). Pogosti povzročitelji bolezni so tudi virusi. Takšna sta na primer virus deformiranih kril (angl. deformed wing virus – DWV) in virus akutne paralize čebel (angl. acute bee paralysis virus) (Gregorc, 2008; Genersch in sod., 2010).

Čebele so izpostavljene mnogim kemičnim pesticidom (Pham-Delègue in sod., 2002). Ti se uporabljajo v intenzivnem kmetijstvu za preprečevanje škode, zatiranje ali nadzor neželenih vrst rastlin in živali, ki vplivajo na slabšo kakovost in zmanjšujejo količino kmetijskih pridelkov (Auguštin, 2008). V Evropi poročajo o večjih izgubah čebeljih družin lociranih v bližini kmetijskih rastlin tretiranih z neonikotinoidom imidaklopridom (Rortais in sod., 2005). Poleg neonikotinoidov so za čebele nevarne tudi druge skupine insekticidov, kot so organski fosforjevi estri, nereistoksini in karbamati (Auguštin, 2008). Pesticide iz skupine akaricidov za zatiranje varoje v panje vnašajo tudi čebelarji (Rademacher in Harz, 2006).

Podnebne spremembe, ki prinašajo zvišanje temperatur, spremenjen padavinski režim in vse več ekstremnih dogodkov, na čebele vplivajo stresno. Glavne posledice so lahko namreč pomanjkanje zimskih zalog hrane, brezpašna obdobja in vplivi na življenjski cikel čebel, ki se bodo ob neukrepanju le še okrepile in bodo sčasoma lahko pomenile enega izmed glavnih vzrokov za umiranje čebel (Auguštin, 2010).

2.2 BIOKONTROLA

2.2.1 Splošno o biokontroli

Biokontrola ali biološka kontrola je način zatiranja škodljivcev z namerno uporabo njihovih naravnih sovražnikov z namenom zniževanja številčnosti populacije škodljivcev (Delfosse, 2005 cit. po De Bach, 1974). Temelji na ekoloških interakcijah med organizmi, kot so predacija, parazitizem, antagonizem, herbivorija, patogenost in kompeticija. Gre torej za uporabo živih organizmov kot biotičnih sredstev, s čimer želimo znižati stopnjo kemičnega zatiranja (Thomas in Willis, 1998). Pogosto je to najbolj primerna strategija za zatiranje splošno razširjenih škodljivcev in škodljivcev, ki imajo potencial, da postanejo splošno razširjeni (Delfosse, 2005).

Glede na izvor biotičnega sredstva in namen s katerim je sredstvo uporabljeno, ločimo klasično biokontrolo, augmentacijo in ohranjanje. Pri klasični biokontroli gre za vnos naravnih sovražnikov v tujerodna območja (Sundh in Goettel, 2012). Augmentacija pomeni povečanje populacije naravnih sovražnikov, kar dosežemo s periodičnim izpustom le-teh v zelena območja za zatiranje domorodnih ali tujerodnih škodljivih organizmov (Orr, 2009). Ohranjanje pa vključuje predvsem zagotavljanje pogojev, ki ustrezajo naravnim sovražnikom določenih škodljivcev (Sundh in Goettel, 2012).

2.2.2 Biotična sredstva

Večina biotičnih sredstev so tako imenovana makrobiotična sredstva, ki vključujejo nevretenčarske predatorje, parazitoide in herbivore. Poznamo pa tudi mikrobiotična sredstva, kamor spadajo mikroorganizmi z antagonistično in patogeno aktivnostjo (Sundh in Goettel, 2012 cit. po Vincent in sod., 2007). Nevretenčarje kot biotična sredstva navadno uporabljamo pri kontroli drugih nevretenčarjev ali plevelov. Mikrobiotična sredstva pa lahko uporabljamo za zatiranje žuželčjih škodljivcev, pršic, nematodov, plevelov, mikroorganizmov, ki so vzrok rastlinskih bolezni in celo vretenčarjev. Kot biotična sredstva se včasih uporabljajo tudi ekstrakti rastlin, ki vplivajo na vedenje žuželk in transgene rastline, ki proizvajajo žuželčje strupe (Sundh in Goettel, 2012).

Pri izbiri in uporabi biotičnih sredstev moramo biti previdni, saj imajo poleg pozitivnih lahko tudi negativne vplive tako na tarčne kot tudi na netarčne organizme, okolje in zdravje ljudi (Delfosse, 2005; Thomas in Willis, 1998). Pred dejansko uporabo nekega biotičnega sredstva težko napovemo njegovo učinkovitost in stranske učinke, kar pogosto predstavlja problem. Prav zato je pred uporabo vsakega sredstva potrebno zagotoviti minimalno tveganje (Thomas in Willis, 1998).

Poznamo različne pripravke in s tem povezane načine aplikacije biotičnih sredstev. Pri zatiranju rastlinskih škodljivcev in bolezni je pogosta uporaba biotičnih sredstev v obliki škropiv (Sutton in Peng, 1993; Lima in sod., 1997; Cota in sod., 2008; Cota in sod., 2009). Pršenje oziroma škropljenje rastlin z biotičnim sredstvom pogosto ni najbolj učinkovito. V primeru kratkoživih rastlin zaradi aplikacije biotičnega sredstva v neustreznem času razvoja rastlin mnoge ostanejo nezaščitene, poleg tega pa le majhna količina substrata doseže tarčo, velik del pa se sprostí v tla in okolico (Yu in Sutton, 1997). Za prenos biotičnih sredstev, ki so pripravljena v obliki praška, lahko uporabljamo tudi žuželke, predvsem čebele in čmrlje (Peng in sod., 1992; Johnson in sod., 1993; Yu in Sutton, 1997; Cornish in sod., 1998; Jyoti in Brewer, 1999; Kovach in sod., 2000; Dedej in sod., 2004; Shafir in sod., 2006; Al-Mazra'awi in sod., 2007; Hokannen in Menzler-Hokannen, 2007; Albano in sod., 2009; Kapongo in sod., 2008).

2.2.3 Uporaba žuželk pri prenosu biotičnega sredstva

Žuželke pri opraševanju rastlin mnogokrat skupaj s cvetnim prahom prenašajo tudi viruse ter glivne in bakterijske spore in s tem prispevajo k širjenju rastlinskih bolezni (Card in sod., 2007). Njihovo sposobnost prenosa pa lahko izkoristimo tudi v biokontroli. S prenosom mikrobnih biotičnih sredstev kot so virusi, bakterije in glive, pripomorejo k zatiranju rastlinskih patogenov in škodljivcev. Dejavniki, ki vplivajo na uspešno uporabo žuželk za prenos biotičnih sredstev (angl. entomovector technology, entomovectoring) so odnosi med prenašalcem in biotičnim sredstvom, na uspešnost prenosa pa vpliva tudi oblika priprave biotičnega sredstva in razdelilnik, v katerem prenašalec biotično sredstvo pobere. Pomembno je, da izberemo najučinkovitejše biotično sredstvo, ki ga določimo na osnovi več faktorjev, rastlinske vrste, prenašalčeve stopnje obiskovanja določene vrste rastlin in njegove sposobnosti uspešnega prenašanja mikrobnega biotičnega sredstva (Mommaerts in Smagghe, 2011).

Uporaba žuželk v biokontroli je pomembna predvsem z vidika zmanjšanja uporabe sintetičnih pesticidov, ki vplivajo tako na zdravje ljudi kot tudi na okolje, poleg tega pa se ob pogosto uporabljenih pesticidih škodljivcem razvije odpornost na le-te. S pršenjem biotičnih sredstev tudi ne dosežemo takšnih učinkov kot z uporabo žuželk za njihov prenos, saj so žuželke sposobne prenosa sredstva direktno na tarčno mesto (cvet). Čeprav so mikrobna biotična sredstva (glive, bakterije in virusi) izolirana iz okolja, žuželke prihajajo z njimi v stik v nenaravnih pogojih, zato je vedno potrebno oceniti varnost določenega sredstva za prenašalca (Mommaerts in Smagghe, 2011).

2.2.3.1 Uporaba čebel pri prenosu biotičnega sredstva

Čebele so bile kot najpomembnejši opraševalci že večkrat uporabljene za prenos biotičnih sredstev za zatiranje mnogih bolezni in škodljivcev določenih rastlin (Shafir in sod., 2006; Hokannen in Menzler-Hokannen, 2007). Izkazale so se kot uspešne prenašalke biotičnih sredstev *Gliocladium roseum*, *Gliocladium catenulatum*, *Trichoderma harzianum* T39 in *Trichoderma harzianum* 1295-22 za zatiranje sive plesni malin in jagod (Peng in sod., 1992; Yu in Sutton, 1997; Kovach in sod., 2000; Shafir in sod., 2006; Hokannen in Menzler-Hokannen, 2007). Uspešnost prenosa biotičnega sredstva *Trichoderma harzianum* T-22 na jagode je pri čebelah preizkušal Albano s sodelavci (2009). Uporabili so jih tudi za prenos biotičnih sredstev *Bacillus subtilis* QRD132 za zatiranje monilije borovnic (Dedej in sod., 2004) in *Erwinia herbicola* Eh252 za zatiranje hruševega ožiga jablan in hrušk (Cornish in sod., 1998). Kot prenašalci biotičnega sredstva *Bacillus thuringiensis* so se kot uspešna alternativa uporabi insekticidov izkazale tudi pri zatiranju sončničnega škodljivca, večše *Cochylis hospes* (Jyoti in Brewer, 1999).

Čebele biotično sredstvo navadno poberejo pri izhodu iz panja. Na panj namestimo razdelilnik, v katerega na izhodnem delu dodamo zeleno biotično sredstvo. Ko zapuščajo panj, so čebele prisiljene prečkati del razdelilnika s sredstvom, ki se prime njihovega telesa in ga prenašajo na pašo (Bilu in sod., 2004). Včasih se namesto razdelilnikov uporabljajo razni aplikatorji biotičnih sredstev (Jyoti in Brewer, 1999) pa tudi naprave (angl. pollen insert) nameščene na panj, ki čebelam omogočajo, da pri izhodu iz panja poberejo cvetni prah ali kakšno drugo sredstvo (Cornish in sod., 1998).

Učinkovitost čebel pri prenosu biotičnih sredstev je poleg njih samih odvisna od tipa naprave, v katero namestimo določeno sredstvo, biotičnega sredstva in privlačnosti rastlin za čebele (Kovach in sod., 2000; Bilu in sod., 2004). Razdelilnik (oziroma kakršnakoli druga naprava) mora omogočati, da čebele, ki jih uporabljamo kot prenašalce, lahko določeno sredstvo na poti skozenj uspešno poberejo, poleg tega pa ne sme motiti pašnega vedenja čebel. Pomembno je tudi, da se določeno biotično sredstvo v njem obdrži dovolj dolgo (Mommaerts in Smagghe, 2011), saj bi bilo stalno odpiranje razdelilnika in dodajanje sredstva za čebele stresno.

Pri uporabi čebel pri biokontroli pogosto težavo predstavlja slabo vreme. V deževnih dneh namreč čebele ne izletavajo, oziroma izletavajo zelo slabo, zato so neobiskane rastline bolj podvržene okužbam (Mommaerts in Smagghe, 2011). V takšnih primerih se lahko poslužujemo biotičnih sredstev pripravljenih v obliki škropiv (Yu in Sutton, 1997).

2.3 VPLIVI FITOFARMACEVTSKIH SREDSTEV NA MEDONOSNO ČEBELO

Fitofarmacevtska sredstva (FFS), za katera pogosteje uporabljamo izraz pesticidi, so anorganske ali organske spojine, ki jih uporabljamo za zatiranje škodljivcev rastlin, mikroorganizmov, ki so povzročitelji mnogih rastlinskih bolezni in plevelov (Maček in Kač, 1990).

Ker se za zatiranje škodljivcev uporabljajo različni tipi FFS v različnih odmerkih in se FFS razlikujejo glede na obstojnost v okolju, lahko pogosto vplivajo tudi na netarčne organizme. Takšni so mnogi oprasovalci, med katerimi so najpomembnejše čebele (Farooqui, 2013). Pašne čebele pridejo v stik s pesticidi med nabiranjem cvetnega prahu in medicine, s čimer pa jih lahko prenašajo tudi v panj (Yang in sod., 2010). Tako so pesticidom pogosto izpostavljene tudi mlajše čebele v panjih in ličinke (Pham-Delègue in sod., 2002).

Učinki pesticidov so lahko letalni (povzročijo smrt) in subletalni. Letalni odmerek zaradi upoštevanja le enega parametra (smrtnosti) in časovno kratkih testov pomeni le delno oceno škodljivih učinkov pesticidov, zato se danes izvaja vse več raziskav o subletalnih učinkih pesticidov na netarčne organizme (Decourtye in Pham-Delègue, 2002; Desneux, 2007; Yang in sod., 2008). Subletalni učinki so tisti, ki ne povzročajo smrti organizmov neposredno, ampak pri čebelah vplivajo predvsem na njihovo vedenje, učenje, pašno dejavnost, orientacijo (Thompson in Maus, 2007).

Pri vseh pesticidih, ki se uporabljajo za varstvo rastlin, je potrebno oceniti njihovo strupenost za čebele (Devillers, 2002). Ločimo akutno in kronično izpostavljenost organizmov pesticidom. Akutno strupenost določenega pesticida ugotavljamo pri enkratni in kratkotrajni (akutni) izpostavljenosti organizma temu pesticidu. Izmerimo jo kot odmerek oziroma koncentracijo pesticida, ki povzroči smrt pri 50 % testiranih organizmov (LD_{50} – angl. lethal dose 50, LC_{50} – angl. lethal concentration 50). Kronično strupenost pa ugotavljamo pri dolgotrajnejši (kronični) izpostavitvi poskusnih organizmov ponavljajočim odmerkom določenega pesticida (Pesticide..., 2006).

Testi za ugotavljanje akutne toksičnosti fitofarmacevtskih sredstev se navadno izvajajo v laboratorijih, pri čemer so čebele na različne načine (kontaktno, oralno) izpostavljene določenemu sredstvu (Ramirez-Romero in sod., 2005). Pri akutnih testih smrtnost navadno beležimo po 24 ali 48 urah. Na ta način najhitreje dobimo podatke o letalnih učinkih pesticidov, vendar pa laboratorijski testi ne odražajo vedno dejanskega stanja v naravnih pogojih (Devillers, 2002; Ramirez-Romero in sod., 2005), zato so zaželena tudi testiranja na prostem. Ker so ta zaradi spremenljivosti pogojev bolj zahtevna, laboratorijske raziskave še vedno prevladujejo (Cluzeau, 2002; Ramirez-Romero in sod., 2005).

2.3.1 Vpliv fitofarmacevtskih sredstev na smrtnost čebel

Življenjska doba čebele delavke je odvisna predvsem od letnega časa izleganja, ki je v veliki meri povezan z aktivnostjo delavk in dostopnostjo ter kvaliteto hrane. Tako delavka, ki se izleže v poletnem času, običajno živi od 15 do 38 dni, spomladi in jeseni od 30 do 60 dni, čez zimo pa v povprečju 140 dni, lahko pa tudi 300 dni in več (Gregorc, 2008).

Življenjsko dobo čebel pogosto zmanjšujejo razne bolezni in škodljivci, v veliki meri pa tudi zastrupitve s pesticidi.

Strupenost fitofarmaceutskih sredstev za čebele navadno izražamo v mikrogramih ali nanogramih aktivne snovi na čebelo. Strupenost posameznih pesticidov izražamo z LD₅₀ vrednostjo, ki pomeni letalno (smrtno) dozo pesticida, pri kateri v 24 urah umre 50 % čebel (Auguštin, 2008).

Na smrtnost čebel neposredno ali posredno (preko subletalnih učinkov) vplivajo mnoga fitofarmaceutska sredstva. Za čebele so najbolj toksični insekticidi, še posebej skupina neonikotinoidov. Gre za sistemske insekticide, ki jih rastlina absorbira skozi korenine in liste, z rastlinskim sokom pa se nato prenesejo po celi rastlini (Auguštin, 2008; Hopwood in sod., 2012). Krupke s sodelavci (2012) je v mrtvih čebelah našel sledi klotianidina, s katerim je bila tretirana koruza v pašnem območju teh čebel. V gutacijski tekočini na listih tretirane koruze z neonikotinoidi so dokazane letalne doze imidakloprida, klotianidina in tiametoksama. Čeprav gutacijske kapljice ne predstavljajo enega glavnih virov vode za čebele, v primeru zaužitja takšne tekočine čebela umre v nekaj minutah (Girolami in sod., 2009; Hopwood in sod., 2012). Tudi v laboratorijskih testih so dokazali, da sta klotianidin in tiametoksam za čebele zelo strupena, tako v primeru zaužitja kot tudi posrednega kontakta (Laurino in sod., 2011). Subletalni odmerki imidakloprida in tiametoksama tudi posredno povzročajo visoko stopnjo smrtnosti zaradi izgube sposobnosti vračanja pašnih čebel v panj (Bortolotti in sod., 2003; Henry in sod., 2012).

Poleg neonikotinoidov na smrtnost čebel dokazano vplivajo tudi drugi pesticidi, kot so na primer diazinon, karbaril, resmetril (MacKenzie in Winston, 1989), amitraz (Vandenberg in Shimanuki, 1990) in deltametrin (Decourtye in sod., 2004).

2.3.2 Vpliv na učenje

2.3.2.1 Splošno o učenju čebel

Čebele so v svojem kratkem življenju tekom leta izpostavljene različnim ekološkim razmeram, na katere pa niso genetsko prilagojene (Menzel in Müller, 1996). Prav zato v vsakodnevem življenju čebel učenje igra pomembno vlogo (Abramson, 1997). Pašne čebele, ki iščejo hrano, si morajo zapomniti lokacijo, kjer so hrano našle, torej se morajo naučiti pot, ki jih vodi od panja do paše in spet nazaj domov (Scheiner in sod., 2004; Menzel in Müller, 1996). Pri orientaciji si pomagajo z raznimi vzorci pokrajine in nebesnimi znamenji. Na dolgih poteh (razdalje nekaj kilometrov) iskanja hrane se torej naučijo prepoznati orientacijske točke v naravi (Menzel in Müller, 1996; Tautz, 2010). Poleg lokacije paše se čebele tudi zelo hitro naučijo, kdaj je v cvetovih medičina in na kakšen način se jih morajo lotiti, da iz njih pridobijo čim več nektarja (Tautz, 2010).

Primer asociativnega učenja v naravi je pri pašnih čebelah obiskovanje cvetov. Ko čebela v zameno za obisk cveta prejme nagrado (medičina, cvetni prah), si zapomni vonj, obliko oziroma barvo cveta (Menzel in Müller, 1996; Pham-Delègue in sod., 2002) in bo tako naslednjič vedela, kje bo dobila hrano (nagrado). Pogoji, da se čebela nauči povezati karakteristike določenega cveta z nagrado je ta, da zazna pogojni dražljaj (vonj, barvo) tik

pred prejetjem nagrade (nepogojni dražljaj) (Menzel in Müller, 1996). Določen vonj si čebele zapomnijo že ob enkratni izkušnji in ga po nekaj pozitivnih izkušnjah ne zamenjajo več z drugimi. Za prepoznavanje barve in oblike cvetov pa navadno potrebujejo malo več časa (v večini primerov zadošča 3 do 5 pozitivnih izkušenj) (Tautz, 2010).

2.3.2.2 Metode raziskovanja učenja čebel

Za raziskovanje učenja čebel navadno uporabljamo dva pristopa: čebele imobiliziramo ali pa poskuse izvajamo kar s prosto letečimi čebelami. Slednja metoda omogoča simulacijo naravnih razmer, učenje pa je pri prosto letečih čebelah posledica njihovih lastnih odločitev, ki jih sprejemajo med pašo. V primeru imobilizacije čebel lahko spremljamo potek učenja v nadzorovanih razmerah (sami izbiramo dražljaje in določamo čas med pogojnim in nepogojnim dražljajem), odpovemo pa se opazovanju naravnega vedenja čebel (Mauelshagen in Greggers, 1993; Decourtye in sod., 2004).

V laboratoriju učenje navadno raziskujemo na imobiliziranih čebelah s klasičnim pogojevanjem PER refleksa (refleks iztegovanja jezička, angl. proboscis extension reflex), ki temelji na povezovanju pogojnega in nepogojnega dražljaja (Mauelshagen in Greggers, 1993; Decourtye in sod., 2004). Čebelo najprej izpostavimo vonju (pogojni dražljaj), takoj zatem pa se s sladkorno raztopino (nepogojni dražljaj) dotaknemo njenih tipalnic, ki so glavni kemosenzorični organ čebel. Ob dotiku tipalnic s sladkorno raztopino lačna čebela refleksno iztegne jeziček in ob tem jo s sladkorno raztopino tudi nagradimo. Ko čebelo po določenem času zopet izpostavimo vonju, iztegne jeziček, ker pričakuje nagrado. Vonj, pogojni dražljaj torej poveže s sladkorno raztopino, nepogojnim dražljajem (Bitterman in sod., 1983; Menzel in Giurfa, 2001; Scheiner in sod., 2003). Poleg vonja pogojni dražljaj lahko predstavlja tudi mehanski dražljaj (Menzel, 1993). Čeprav opisana metoda onemogoča izvajanje poskusov v naravnih razmerah, so rezultati pridobljeni s pogojevanjem s PER refleksom primerljivi s pridobljenimi v raziskavah s prosto letečimi čebelami (Mauelshagen in Greggers, 1993; Laloi in sod., 2000).

Pomembno vlogo pri asociativnem učenju ima občutljivost na saharozo (Scheiner in sod., 2001). Saharoza kot ena glavnih komponent medicine (poleg glukoze in fruktoze) (Corbet, 2003) namreč služi kot nagrada pašnim čebelam ob obiskovanju cvetov (Scheiner in sod., 2004). Čebele, ki se odzivajo na nižje koncentracije saharoze, so občutljivejše od tistih, ki se odzivajo na višje koncentracije (Page in sod., 1998). Scheiner s sodelavci (1999; 2001; 2003) navaja, da se čebele, ki so na saharozo bolj občutljive, bolje učijo. Ugotovili so, da so nabiralke cvetnega prahu na saharozo občutljivejše kot nabiralke medicine (Page in sod., 1998; Scheiner in sod., 2001; Scheiner in sod., 2003), stopnja občutljivosti pa se pri obojih preko sezone spreminja (Scheiner in sod., 2003).

2.3.2.3 Vpliv fitofarmaceutskih sredstev na učenje

Vpliv FFS na učenje čebel pogosto ugotavljamo v laboratoriju na podlagi poskusov s klasičnim pogojevanjem PER refleksa, v nekaterih študijah pa čebele prosto letajo do vira hrane kontaminiranega z določenim pesticidom (Decourtye in sod., 2004; Ramirez-Romero in sod., 2005). Pesticidi, ki z eno ali drugo metodo dokazano vplivajo na učenje čebel, so na primer imidakloprid (Decourtye in sod., 2004) fipronil (Decourtye in sod.,

2005), deltametrin (Decourtye in sod., 2005; Ramirez-Romero in sod., 2005) endosulfan, prokloraz (Decourtye in sod., 2005) in kumafos (Bevk, 2012).

Pesticidi pa poleg asociativnega učenja lahko vplivajo tudi na neasociativno učenje, kakršna je habituacija PER odziva ob ponavljajočem draženju tipalnic s sladkorno raztopino brez nagrade (Guez in sod., 2001). Število poskusov potrebnih za dosego habituacije se zaradi pesticidov poveča ali zmanjša. Vpliv je bil med drugim pokazan za imidakloprid in njegove metabolite (Guez in sod., 2001; Guez in sod., 2003) ter za kumafos (Bevk, 2012).

2.3.3 Vpliv na pašno dejavnost

2.3.3.1 Pomen in lastnosti pašnega vedenja

Čebele na svojih pašnih poletih nabirajo cvetni prah, nektar, vodo, propolis in mano (Menzel, 1993). Delavke, ki nabirajo večje količine cvetnega prahu, nabirajo manj medicine in obratno (Page in sod., 2000). Pašne čebele se odpravijo na pašo, kadar je zunanja temperatura višja od 12 °C (Tautz, 2010). Do zadovoljivega vira hrane lahko preletijo tudi več kilometrov (v večini letajo na pašo, ki je oddaljena 2 do 4 kilometre) ter obišejo več sto cvetov v enem samem pašnem poletu (Menzel in Müller, 1996; Tautz, 2010). Pri paši je za čebele najpomembnejše, da si zapomnijo lastnosti cvetov in lokacijo paše (Menzel in Müller, 1996). Čebela, ki odkrije novo pašo, posreduje njeno lokacijo (oddaljenost in smer) ostalim čebelam s plesom, ki ga izvaja na satju. V primeru, da se paša nahaja blizu panja (v oddaljenosti približno 50 metrov), čebela izvaja krožni ples, če je paša bolj oddaljena pa njeno lokacijo posreduje drugim čebelam z zibajočim plesom (von Frisch, 1973).

Za izraženost pašnega vedenja morajo poleg telesne pripravljenosti obstajati motivirajoči dražljaji, kot so zalega, prazno satje, feromoni matice in lakota po paši (Božič, 2008). Običajno se čebele iz panjskih v pašne razvijejo pri starosti okrog treh tednov, vendar pa to vedno ne drži. Pogosto je starost, pri kateri posamezne delavke opravljajo različne naloge, povezana s potrebami čebelje družine. V primeru pomanjkanja hrane se mnogo mladih čebel predčasno odpravi na pašo, opaziti pa je tudi povečano aktivnost že obstoječih pašnih čebel (Schulz in sod., 1998; Ament in sod., 2010). Delež čebel, ki se predčasno razvijejo v pašne, je odvisen tudi od deleža starejših čebel v čebelji družini. Več kot je starejših, manj mlajših se bo predhodno odpravilo na pašo (Huang in Robinson, 1996).

Pri odraščanju v pašno čebelo imajo pomembno vlogo hormoni. Eden glavnih je pri čebelah juvenilni hormon III. Čeprav je pri pašnih čebelah nivo tega hormona višji kot pri panjskih pa glede na raziskave juvenilni hormon ne aktivira pašnega vedenja pač pa le vpliva na njegov začetek s pospešitvijo razvoja iz panjskih čebel v pašne (Sullivan in sod., 2000; Schulz in sod., 2002; Božič, 2008). Zelo verjetno pripravi čebele na sprejemanje dražljajev, ki jih vzbujajo k pašni aktivnosti. To so nov cvetni prah, mana in medicina v panju, stik s pašnimi čebelami, pobrenčavanje pašnih in pašno vznemirjenih čebel, z medsebojnim izmenjavanjem hrane dobljeni vzorci nektarja in mane, brenčanje plesalk in izvajanje plesa (Božič, 2008).

2.3.3.2 Vedenje na vhodu

Poleg pašnih čebel, ki zapuščajo in se vračajo v panj, na vhodu panja lahko opazujemo čebele stražarke. Panj stražijo le nekatere čebele običajno nekaj ur ali maksimalno nekaj dni preden postanejo pašno aktivne. Običajno se sprehajajo po panjski bradi in s pomočjo anten pregledujejo čebele, ki poskušajo vstopiti v panj. Zanje je značilna obrambna drža. Sprednji par nog je dvignjen, antene so usmerjene naprej, krila so zložena, ob pripravljenosti napada pa razprta (Butler in Free, 1952). V panj spuščajo domače čebele in tiste, ki prinašajo nektar in cvetni prah, vsiljivce pa odganjajo. Domače čebele naj bi stražarke spoznale na osnovi vonja, ki je tipičen za posamezno čebeljo družino (Butler in Free, 1952; Božič, 2008).

Ob pomanjkanju paše se pogosto poveča ogroženost panja zaradi roparjev, kot so ose ali čebele iz drugih družin (Butler in Free, 1952). Panjev pa ne ogrožajo le druge žuželke, ampak zalega in med privlačita tudi večje plenilce, kakršen je na primer medved (Stabentheiner in sod., 2002). V primerih, ko je čebelja družina bolj ogrožena, ima navadno tudi večje število stražark (Božič, 2008). Stražarke se z vsiljivcem spopadejo na različne načine, lahko tudi s pikom pa čeprav s tem žrtvujejo svoje življenje (Butler in Free, 1952).

Občasno na vhodu panja lahko opazimo tudi starejše čebele, ki opravljajo higienska dela, kot so odstranjevanje drobirja, raznih tujkov ter odmrle in bolne zalege iz panja (Božič, 2008). To vedenje je genetsko določeno (Spivak, 1996) in je najverjetneje ključnega pomena za preprečevanje razvoja bolezni, kot so varoza, poapnela zalega in huda gniloba zalege (Gilliam in sod., 1983; Spivak, 1996; Božič, 2008).

Pri raziskavah vedenja čebel na vhodu si lahko pomagamo s spremljanjem njihove aktivnosti. Pomemben podatek pri ocenjevanju aktivnosti čebel je število čebel, ki zapuščajo in se vračajo v panj v določenem času (Struye in sod., 1994). Za štetje so pogosto v uporabi elektronski števci, ki temeljijo na infrardečem zaznavanju gibanja (Campbell in sod., 2008). V raziskavah vpliva različnih substanc na čebele nam takšni števci omogočajo odkrivanje izgube čebel (Pham-Delègue in sod., 2002). Uporabni so tudi pri pridobivanju koristnih podatkov o aktivnosti pašnih čebel v različnih vremenskih pogojih. Na ta način lahko ugotavljamo, kako na njihovo aktivnost vplivajo različni podnebni elementi (temperatura, vlaga, padavine, vetrovi, sončno sevanje) (Devillers in sod., 2004). Pri interpretaciji rezultatov moramo upoštevati, da na aktivnost čebel na vhodu panja vplivajo tudi mnogi drugi dejavniki, kot so razpoložljivost, raznolikost in lokacija pašnih virov pa tudi sama stopnja izkušenosti pašnih čebel, zdravje čebelje družine in izpostavljenost različnim strupom (Struye in sod., 1994; Devillers in sod., 2004; Campbell in sod., 2008). Število čebel na vhodu panja je le eden izmed podatkov, ki je pomemben pri spremljanju aktivnosti čebel in je uporaben v študijah o njihovem vedenju (Struye in sod., 1994).

Pri spremljanju vedenja čebel zunaj in znotraj panja so nam lahko v veliko pomoč kamere, ki jih namestimo na panj. S snemanjem namreč ne motimo aktivnosti čebel. Slaba stran te metode je lahko težavno pregledovanje posnetkov, ki so zaradi hitrega gibanja čebel in spreminjanja svetlobnih razmer tekom dneva lahko nejasni (Campbell in sod., 2008).

O vplivu pesticidov na vedenje čebel na vhodu panja je bilo izvedenih zelo malo raziskav. Predmet raziskav je večinoma le pašno vedenje, ne pa vedenje na vhodu. S števcom čebel, ki zapuščajo in se vračajo v panj, so ugotovili, da imidaklopid in deltametrin vplivata na zmanjšano aktivnost na vhodu panja (Decourtye in sod., 2004). Opazovanja na vhodu se nanašajo tudi na vplive FFS na pašno dejavnost. Tako so dokazali vpliv diazinona, karbanila in resmetrila na pašno dejavnost čebel (MacKenzie in Winston, 1989). S pomočjo radiofrekvenčnega čitalca na vhodu panja so ugotovili, da subletalne doze tiametoksama zmanjšujejo pašni uspeh, saj se mnogo čebel ne vrne iz paše (Henry in sod., 2012). Podobno v primeru imidakloprida navaja Bortolotti s sodelavci (2003). Zmanjšana pašna dejavnost je bila potrjena tudi za kumafos (Bevk, 2012).

2.4 SIVA PLESEN *Botrytis cinerea*

2.4.1 Splošno o sivi plesni

Botrytis cinerea je glavni patogeni organizem, ki povzroča sivo plesen na mnogih sadnih rastlinah in zelenjavi (Shafir in sod., 2006) in s tem velike izgube pridelkov po vsem svetu (Williamson in sod., 2007). Najpogosteje se pojavlja na jagodah, grozdju, malinah, robidah pa tudi na korenju, brokoliju, solati in fižolu (Williamson in sod., 2007, cit. po Droby in Licher, 2004). Težave s to glivo se pojavljajo pri gojenju na prostem in tudi v zaščiteneih prostorih, saj za okužbe ne potrebuje veliko vlage (Štampar in sod., 2005). Ker ima patogen široko območje gostiteljev, različne mehanizme napada in lahko okuži vse rastlinske organe v večini razvojnih stopenj, je sivo plesen težko nadzorovati (Williamson in sod., 2007).

Siva plesen jagod poleg plodov napada tudi cvetove, živice in razrastišče. Napadeno tkivo izgubi turgor in nekoliko uplahne, nato se sivo-rjavo obarva, kmalu pa ga obda značilna siva prevleka (Štampar in sod., 2005). Okužba se pogosto pojavi proti koncu cvetenja, nato pa se v obliki mehke gnilobe iz cvetov razširi na razvijajoče se plodove (Williamson in sod., 2007). Blanco s sodelavci (2006) navaja, da siva plesen jagod lahko povzroči kar do 50 % izgub pridelka. Škode pa ne povzroča le med gojenjem, ampak je tudi glavni vzrok za izgube med skadiščenjem in transportom jagod (Essghaier in sod., 2009).



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

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

2.4.2 Zatiranje sive plesni

Najpogostejši način za zatiranje te plesni je kemična kontrola, ki pa ima številne neželene stranske učinke, kot so negativni vplivi na oprasčevanje, kaljivost semen in zorenje plodov (Yi in sod., 2003). Za zmanjševanje okužb se običajno uporabljajo fungicidi, ki pa v velikih količinah, ki so potrebne za doseg zadovoljivega nadzora bolezni, povzročajo težave, kot so ostanki fungicidov v plodovih (Legard in sod., 2001, 2005), obenem pa se lahko ob pogosto uporabljenih fungicidih škodljivcem razvije odpornost na le-te. Danes je tudi med potrošniki vse večje povpraševanje po sadju, ki je pridelano brez uporabe kemičnih sredstev (Shafir in sod., 2006). Zaradi vsega naštetega se uporaba raznih fungicidov skuša vse bolj zmanjševati (Paavanen-Huhtala in sod., 2000). Leggard s sodelavci (2005) je dokazal, da lahko tudi z manjšimi količinami določenih fungicidov, ki jih uporabimo v pravilnem času, dosežemo zadovoljive rezultate pri zatiranju sive plesni jagod.

2.4.2.1 Fungicidi za zatiranje sive plesni jagod in njihov vpliv na čebele

Fungicidi so fitofarmacevtska sredstva, ki jih uporabljamo za preprečevanje glivičnih bolezni na gojenih rastlinah (Auguštin, 2008). Tudi v Sloveniji za spopadanje s sivo plesnijo jagod, ki velja za najnevarnejšo izmed bolezni plodov, uporabljamo mnoge fungicide. Nekatere neznailne botriticide, kot sotelilfluamid, klorotalonil in azoksistrobin običajno uporabimo vsaj dvakrat od začetka rasti jagod pa do cvetenja. V obdobju od cvetenja do obiranja je značilna uporaba specifičnih botriticidov, kot so fenheksamid, vinklozolin, ciprodinil in fludioksonil, ki jih nanašamo po potrebi (Lešnik, 2005). Seznam

registriranih fitofarmaceutskih sredstev (FITO-INFO, 2012) za zatiranje sive plesni jagod poleg že naštetih navaja uporabo tudi nekaterih drugih fungicidov, kot so pirimetanil, iprodion, boskalid in piraklostrobin.

Znano je, da so fungicidi v večini za čebele manj nevarni, zato je njihova uporaba na cvetočih rastlinah pogosto dovoljena in posledično so njihove sledi pogoste v cvetnem prahu in nektarju rastlin, ki jih čebele obiskujejo (Kubik in sod., 1999). V Združenih državah Amerike je Johnson s sodelavci (2010) zbral podatke o raziskavah sledi pesticidov v cvetnem prahu, ki so ga nabirale pašne čebele, v odraslih čebelah, medu in vosku. Večina zgoraj omenjenih fungicidov (razen sotolilfluorida in fludioksonila) je bilo prisotnih v različnih vzorcih voska in cvetnega prahu, sledi nekaterih so bile odkrite tudi v odraslih čebelah in medu. Kubik s sodelavci (1999) navaja podatke o visokih sledih vinklozolina in iprodiona v matičnem mlečku. Glede na rezultate njegove raziskave so bile vsebnosti vinklozolina v matičnem mlečku kar do 220-krat, sledi iprodiona pa do 132-krat večje kot v medu, ki so ga čebele nabirale na češnjah tretiranih z omenjenima fungicidoma.

2.4.2.2 Biotična sredstva za zatiranje sive plesni jagod

Uspešna alternativna metoda za zatiranje sive plesni jagod je biokontrola (Cota in sod., 2009). Namesto fungicidov se uporabljajo in za uporabo preizkušajo predvsem mikrobiotična sredstva (Essghaier in sod., 2009). Pri tem so se uspešno izkazale že mnoge glive. Primer je gliva *Clonostachys rosea* (uporablja se tudi ime *Gliocladium roseum*), ki v času gojenja jagod to bolezen zatira učinkoviteje od fungicidov (Cota in sod., 2008, 2009). Kot antagonist sive plesni jagod se uporablja tudi gliva *Gliocladium catenulatum* (Hokannen in Menzler-Hokannen, 2007). Pri nizki in srednji stopnji okuženosti jagod sivo plesen uspešno zatira tudi gliva *Trichoderma harzianum* T39 (Shafir in sod., 2006). Uporaba gliv *Aureobasidium pullulans* L47 in *Candida oleophila* L66 kot mikrobiotičnih sredstev je bolj učinkovita ob cvetenju jagod kot za preprečevanje gnitja plodov pred ali po obiranju. Sredstvo *A. pullulans* L47 se je izkazalo celo uspešnejše od fungicida vinklozolina (Lima in sod., 1997). Pri zmanjševanju škode, ki jo siva plesen povzroča med skladiščenjem jagod, je upešna *Rhodotorula glutinis*, velik potencial pri tem pa ima tudi *Rhodotorula mucilaginosa* (Zhang in sod., 2007, 2012). Dommez s sodelavci (2011) ugotavlja, da so pod laboratorijskimi pogoji pri zatiranju sive plesni plodov jagod uspešne tudi bakterije *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter intermedius*, *Kurthia sibirica*, *Paenibacillus polymyxa* in *Pantoea agglomerans*. Kot uporabna biotična sredstva pri zmanjševanju škode, ki jo siva plesen povzroča med skladiščenjem jagod pa Essghaier s sodelavci (2009) navaja bakterije iz rodov *Planococcus*, *Virgibacillus*, *Terribacillus* in *Halomonas*.

Robinson-Boyer s sodelavci (2009) ugotavlja, da je kombinacija več biotičnih sredstev pri zatiranju sive plesni jagod manj uspešna od uporabe posameznega bolj učinkovitega biotičnega sredstva.

3 MATERIALI IN METODE DELA

Vse poskuse smo izvajali na kranjski čebeli (*Apis mellifera carnica* Pollman 1879) in sicer na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani na Oddelku za entomologijo. Del poskusov smo opravili v laboratoriju, del pa na prostem.

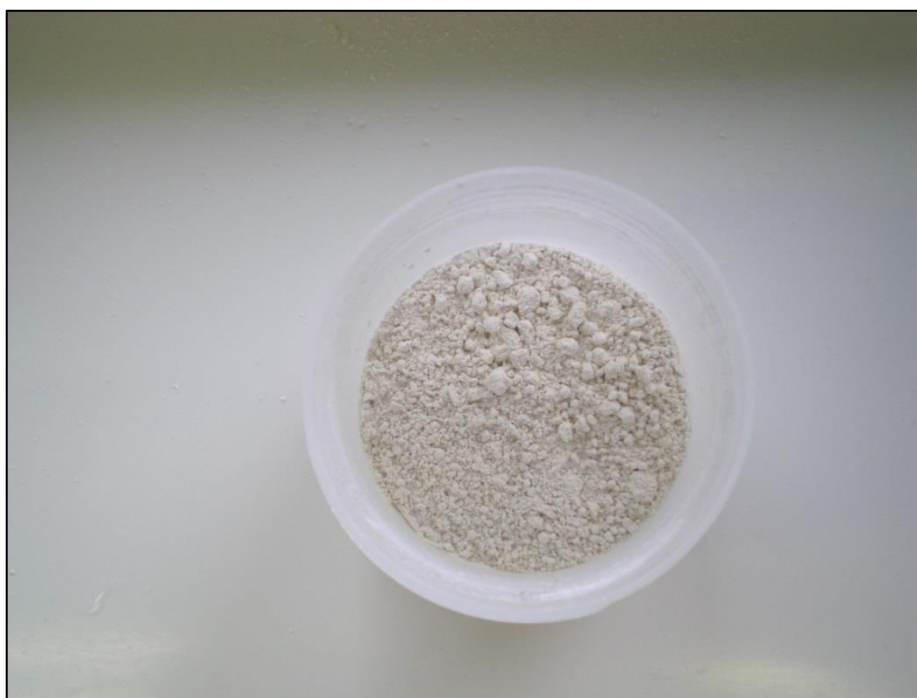
3.1 ODZIVNOST NA PREHRANSKE DRAŽLJAJE

S poskusi odzivnosti na prehranske dražljaje smo želeli ugotoviti, kako biotično sredstvo Prestop Mix (z glivo *Gliocladium catenulatum*) vpliva na začetno fazo učenja čebel. Poskuse smo izvajali junija in julija 2012. Vse čebele v poskusih so bile pašne čebele neznane starosti.

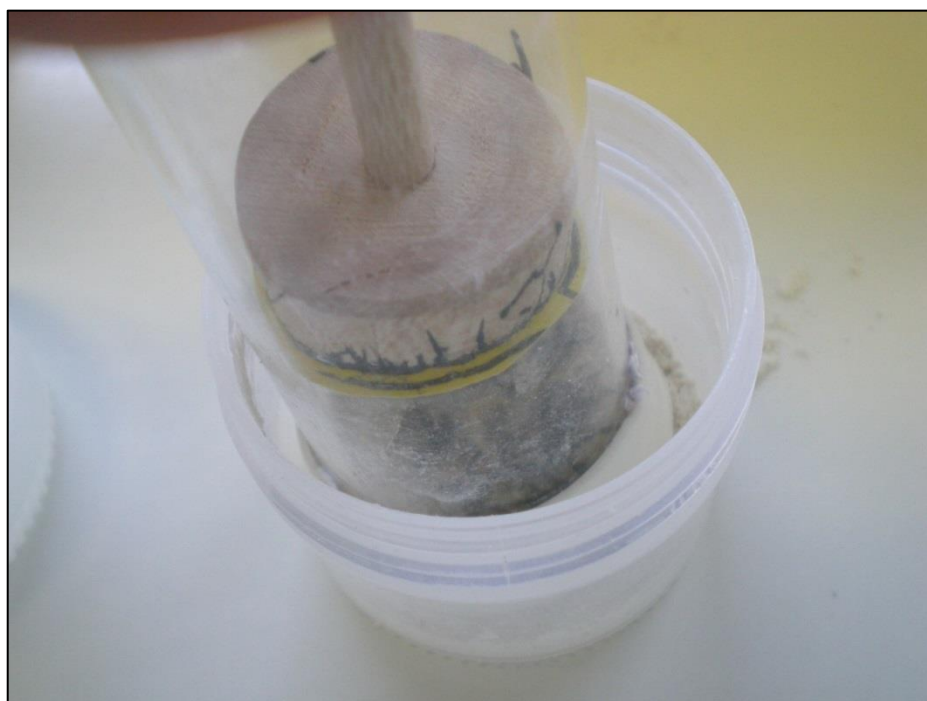
3.1.1 Priprava in imobilizacija čebel

Čebele smo najprej na vhodu panja naložili v plastične tulce za označevanje matic. Za eno serijo smo naložili po 11 čebel za vsako skupino (kontrola, Prestop Mix), kasneje smo jih v poskusu uporabili 10. Ena čebela pri vsaki skupini je vedno predstavljala rezervo, v primeru, da je bila katera od ujetih za poskuse neprimerna.

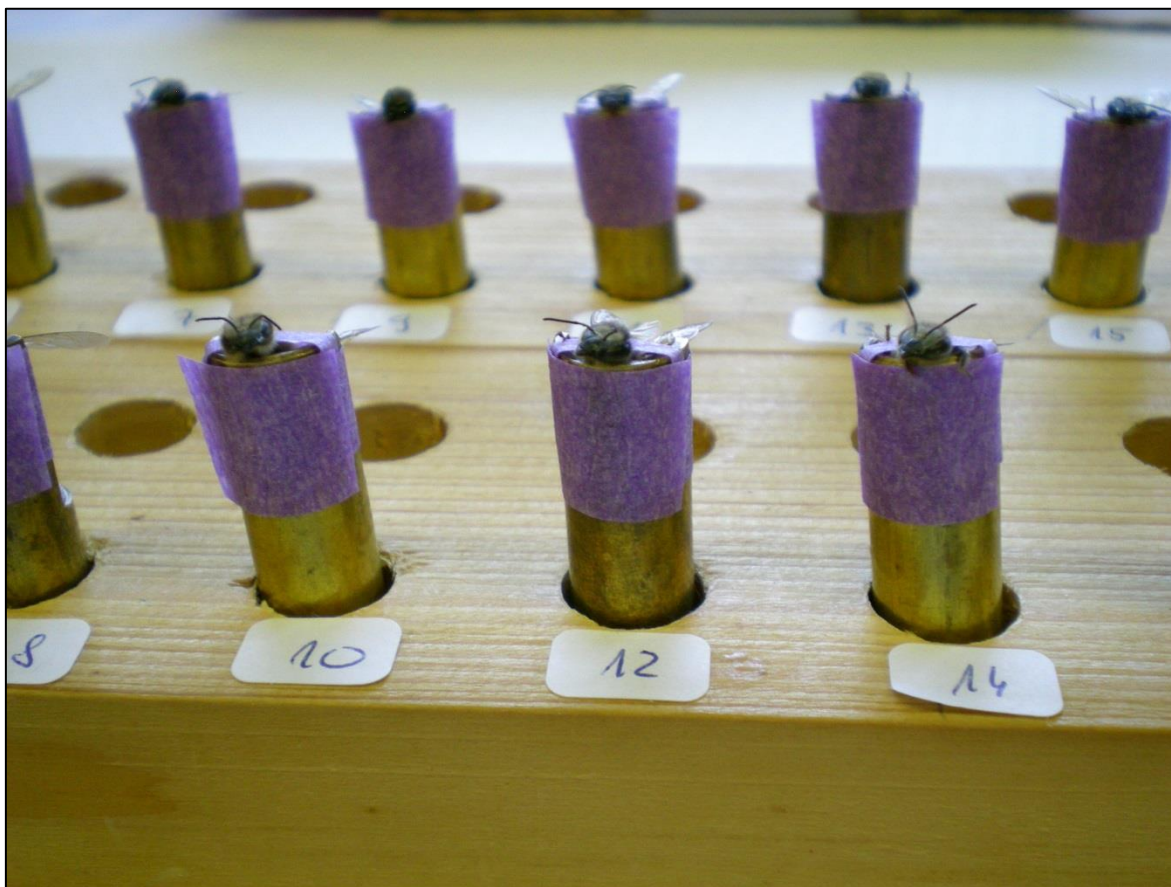
V laboratoriju smo čebele iz posamezne skupine združili v plastičen tulec. Eno skupino smo izpostavili Prestopu Mix tako, da smo tulec s čebelami za 15 sekund vstavili v 50-ml lonček, v katerem je bilo 5 g biotičnega sredstva. V stik s sredstvom so prišle preko mreže na dnu tulca. Nato smo počakali 15 minut, da so se čebele lahko očistile in si izmenjale hrano. Za zagotovitev enakih pogojev pri obeh skupinah so bile kontrolne čebele združene enako dolgo kot tretirane. Po 15 minutah smo čebele ponovno razdružili tako, da smo vsako dali v svoj tulec. Temu je sledila imobilizacija. Čebele smo v steklenih kozarčkih postavili na ledeno kopel, da so otrpnile. Nato smo jih z lepilnim trakom fiksirali na kovinske tulce tako, da so lahko prosto premikale tipalnice in obustni aparat (Menzel in Giurfa, 2001). Po končani imobilizaciji smo vsaki čebeli ponudili vodo.



Slika 3: Lonček z biotičnim sredstvom Prestop Mix (Zaplotnik Š., 2012)



Slika 4: Tretiranje čebel s Prestopom Mix (Zaplotnik Š., 2012)



Slika 5: Čebele fiksirane na kovinskih tulcih (Zaplotnik Š., 2012)

3.1.2 Občutljivost na saharozo

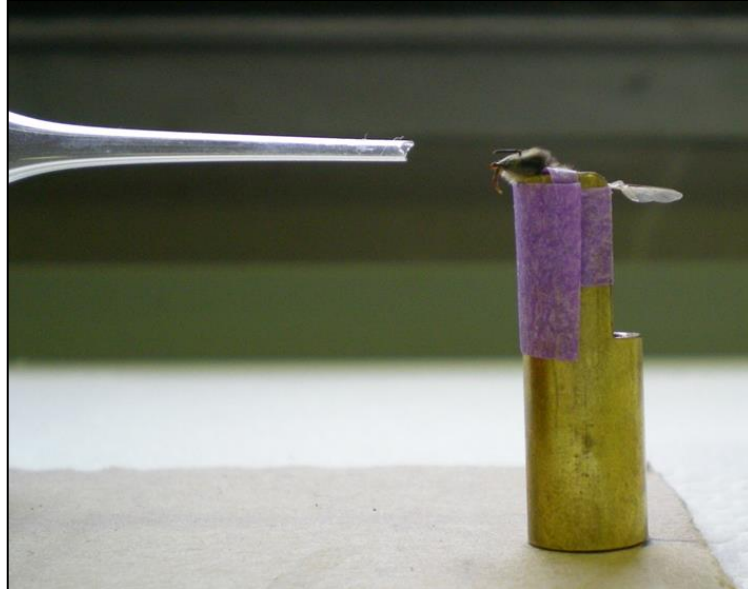
15 minut po imobilizaciji je sledil test občutljivosti na saharozo. Pri tem testu smo preverjali odzivnost čebel na 10 različnih naraščajočih koncentracij raztopin saharoze (0, 1, 1.6, 2.5, 4, 6.3, 10, 16, 25 in 40 %), ki smo jih pripravili pred poskusi učenja. V 3 minutnih intervalih smo se s konico zobotrebca namočenega v posamezno koncentracijo raztopine saharoze dotikali čebeljih anten in preverjali, če je ob tem prišlo do PER refleksa. Začeli smo z najnižjo in končali z najvišjo koncentracijo. Čebele, ki se niso odzvale na nobeno od različnih koncentracij, smo izključili iz nadaljnjih poskusov.

Po vsaki končani seriji smo za posamezno čebelo sešteli število PER odzivov na različne koncentracije raztopin saharoze, kar je predstavljalo merilo občutljivosti na saharozo (Scheiner in sod., 1999). Čebela, ki se je odzvala le na eno koncentracijo, je dobila končno oceno 1, čebela, ki se je odzvala na vseh deset koncentracij pa oceno 10.

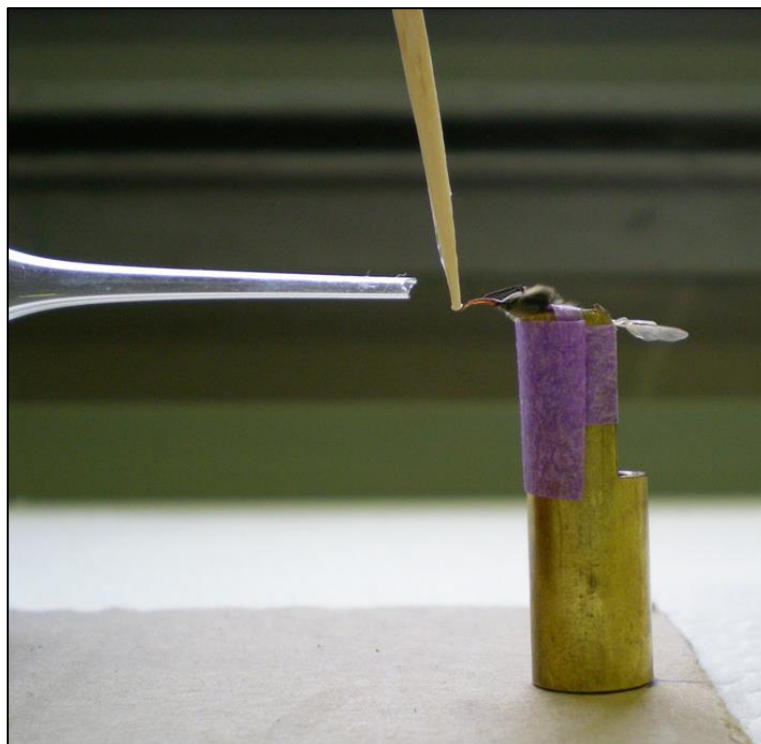
3.1.3 Testiranje odziva po enkratnem draženju s pogojnim dražljajem

Vsako čebelo smo dve uri po imobilizaciji najprej za eno minuto izpostavili zračnemu toku, ki je bil usmerjen v njene tipalnice (Slika 6). V tem času se je privadila mehanskega dražljaja (Kralj in sod., 2006). V tok zraka smo nato za 3 sekunde spustili vonj eteričnega olja limone, 2 sekundi po začetku izpostavitve vonju pa čebelo nagradili z najvišjo, 40 %

sladkorno raztopino (Slika 7). Najprej smo se dotaknili tipalnice, nato pa še jezička. Če čebela ob dotiku tipalnice s sladkorno raztopino jezička ni iztegnila, smo jo izključili iz poskusa.

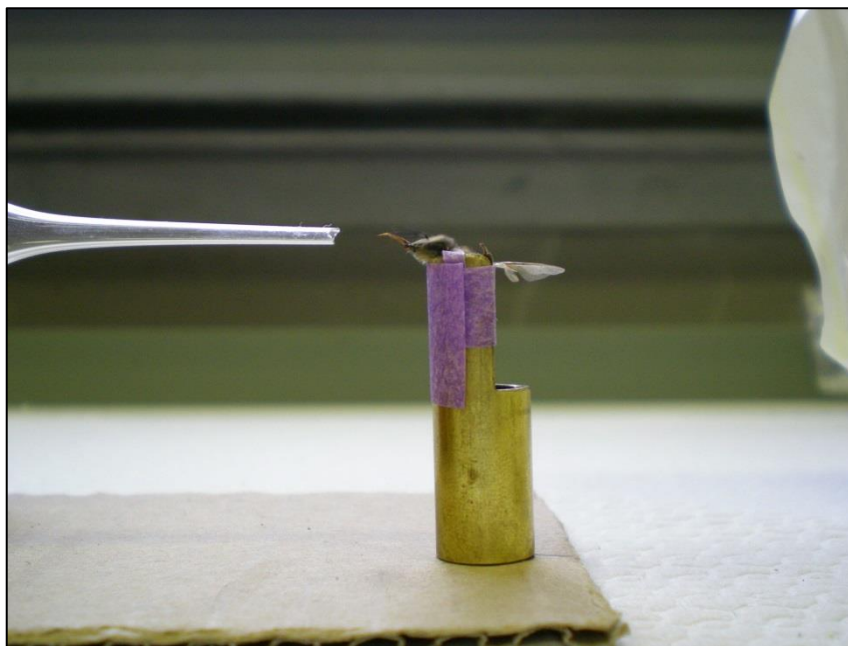


Slika 6: Čebela izpostavljena zračnemu toku, ki je bil usmerjen v njene tipalnice. (Zaplotnik Š., 2012)



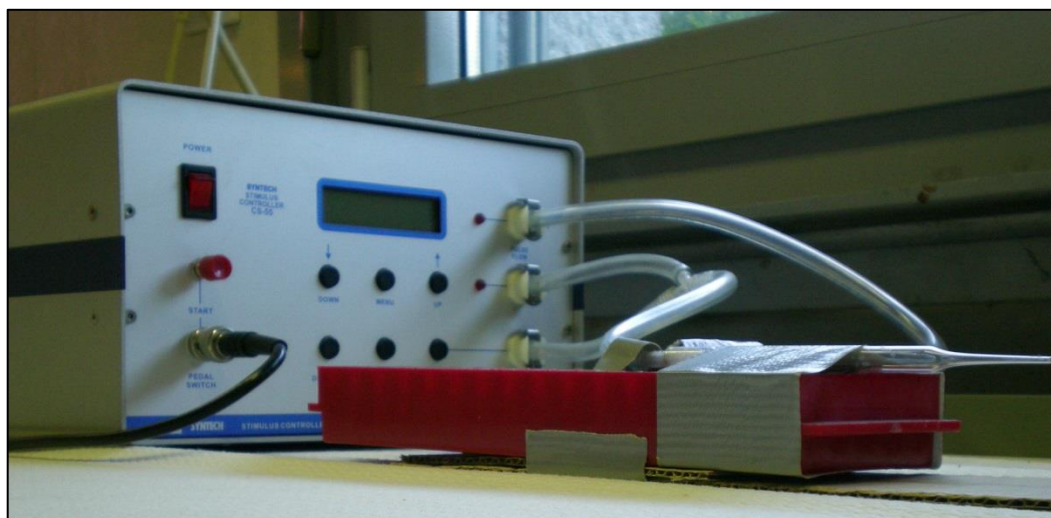
Slika 7: V tok zraka smo za 3 sekunde spustili vonj eteričnega olja, nato pa čebelo nagradili s 40 % sladkorno raztopino. (Zaplotnik Š., 2012)

Nato je sledil test odziva na vonj (Kralj in sod., 2006). Čebelo smo po 1 ali 12 min spet izpostavili vonju in opazovali, če je ob tem prišlo do PER odziva (Slika 8). Pri tistih brez odziva smo se s sladkorno raztopino ponovno dotaknili tipalnic in preverili odziv na saharozo. Če do odziva ni prišlo, smo čebelo izključili iz poskusa. Čebele so bile izključene tudi, če so imele stalno iztegnjen jeziček, če je prišlo do PER odziva na zračni tok ali vonj pred pogojevanjem ali pa na zračni tok po pogojevanju.



Slika 8: PER odziv na vonj po 1 ali 12 min. Čebela, ki je bila po določenem času zopet izpostavljena vonju in je povezala vonj z nagrado (sladkorno raztopino), je ob tem iztegnila jeziček. (Zaplotnik Š., 2012)

Za dovajanje zračnega toka in vonja smo uporabili stimulator Stimulus controller (proizvajalec: Syntech, Nizozemska) (Slika 9).

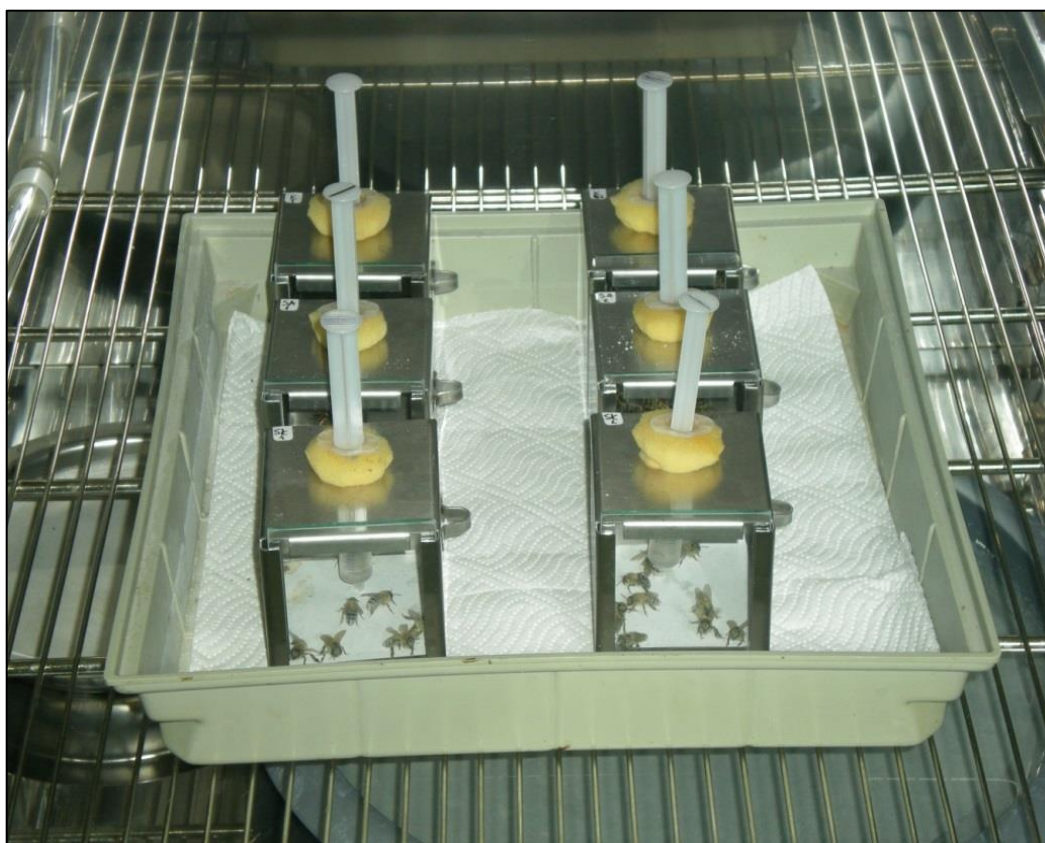


Slika 9: Stimulator Stimulus controller za dovajanje zračnega toka (Zaplotnik Š., 2012)

3.2 SMRTNOST

Namen poskusov je bilo ugotoviti vpliv sredstva Prestop Mix na smrtnost čebel. Poskusi so potekali julija in avgusta 2012, izvajali pa smo jih na pašnih čebelah neznane starosti.

Posamezna serija poskusa za smrtnost je trajala štiri dni. Prvi dan smo na vhodu panja v plastične tulce nalovili tri skupine po deset pašnih čebel neznane starosti. Ena skupina je bila kontrolna (sredstvu ni bila izpostavljena), ena je bila sredstvu izpostavljena samo prvi (akutno), ena vsak dan (kronično). Čebele iz akutne in kronične skupine smo tretirali s Prestopom Mix na enak način kot pri učenju (tulec z desetimi čebelami smo za 15 sekund vstavili v lonček z biotičnim sredstvom). Čebele smo nato zaprli v kovinske kletke (dimenzije 7 x 7 x 7cm) in jih postavili v inkubator na 34 °C. Vsak dan smo pregledali kletke in si zabeležili število mrtvih čebel. V kletkah so čebele imele ves čas na voljo hrano, in sicer 5 ml 30 % sladkorne raztopine. Skupno smo v poskusih smrtnosti za vsako od treh skupin testirali po 200 čebel.



Slika 10: Kovinske kletke s čebelami v inkubatorju za ugotavljanje vpliva sredstva Prestop Mix na smrtnost. (Zaplotnik Š., 2012)

3.3 VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU IN PRED NJIM

Poskuse smo izvajali julija in avgusta 2012. S snemanjem vedenja čebel smo ugotavljali, kako Prestop Mix vpliva na vedenje čebel, preden odletijo na pašo.

Sredstvo smo dodajali v poseben razdelilnik (BeeTreat inoculum dispenser), ki je narejen tako, da loči čebele, ki panj zapuščajo od čebel, ki se vračajo. V stik s sredstvom praviloma pridejo samo čebele, ki panj zapuščajo. Opazovali smo čebele v razdelilniku (v predelu s sredstvom) in zunaj. Za snemanje v razdelilniku smo uporabljali digitalno mikro kamero (DigiMicro 2.0 Scale), za posnetke zunaj panja pa fotoaparata (Canon Powershot G12). Da smo mikro kamero lahko namestili v razdelilnik, smo le-tega nekoliko predelali. Opazovanja smo izvajali na dveh družinah. Razdelilnik smo na panj namestili vsaj teden pred začetkom poskusa, da so se čebele nanj navadile.



Slika 11: Razdelilnik z mikro kamero, nameščen na panj (Bevk D., 2012)

S snemanjem smo začeli, ko so čebele začele intenzivneje izletavati iz panja, na kar je navadno vplivalo vreme. Običajno je bil začetek snemanja med 8.30 in 9.00 uro zjutraj. Prvi dan smo opazovali vedenje brez biotičnega sredstva, naslednje dni pa z biotičnim sredstvom. Ne glede na to, je bila prva ura snemanja vedno brez Prestopa Mix. Biotično sredstvo smo dodajali na del razdelilnika, ki ga morajo čebele prečkati pri izhodu iz panja. V razdelilnik smo naenkrat dodali 5 g biotičnega sredstva, ga zaprli in takoj začeli (nadaljevali) s snemanjem (Slika 12).



Slika 12: Odprt razdelilnik z biotičnim sredstvom. Na del razdelilnika, ki ga morajo čebele prečkati pri izhodu iz panja, smo naenkrat dodali 5 g biotičnega sredstva. (Bevk D., 2012)

Snemanje je potekalo šest ur dnevno. Vsako uro smo posneli najmanj pet enominutnih posnetkov v razdelilniku in po dva petminutna posnetka zunaj panja. Ko smo dodali Prestop Mix, smo po pet enominutnih posnetkov znotraj razdelilnika in po dva petminutna posnetka izven panja posneli tudi 15 in 30 minut po dodatku biotičnega sredstva. V prvi družini smo čebele opazovali tri, v drugi pa pet dni (Preglednica 1 in Preglednica 2). Po vseh končanih poskusih smo posnetke pregledali s pomočjo računalniškega programa BS.Player in analizirali vedenje čebel. Najprej smo pripravili seznam vseh vedenj, nato pa smo v vsakem posnetku prešteli čebele s posameznim vedenjem. Nekatere čebele so opravile po več vedenj. Takšne smo zabeležili večkrat, pri vsakem posameznem vedenju posebej. Čebele pred razdelilnikom je bilo praktično nemogoče prešteti, zato smo na zunanjih posnetkih opazovali le prisotnost vedenj, ki kažejo na spremembo (niso običajna), vedenj, ki vplivajo na prenos sredstva na polje in vedenj zaradi katerih se sredstvo vnaša v panj.

Preglednica 1: Potek snemanja po dnevih z ali brez Prestopa Mix v razdelilniku. Po posameznih dnevih je prikazano tudi, kolikokrat je bila posamezna družina čebel predhodno izpostavljena Prestopu Mix.

Družina	Datum	Tretma (brez Prestopa Mix – 0/ s Prestopom Mix – 1)	Predhodna izpostavljenost družine Prestopu Mix (dnevi)	Snemanje
1	23. 7. 2012	0	0	✓
1	26. 7. 2012	1	0	✓
1	27. 7. 2012	1	1	✓
2	6. 8. 2012	0	0	✓
2	7. 8. 2012	1	0	✓
2	8. 8. 2012	1	1	✗
2	9. 8. 2012	1	2	✗
2	10. 8. 2012	1	3	✗
2	13. 8. 2012	1	4	✓
2	14. 8. 2012	1	5	✓
2	16. 8. 2012	1	6	✗
2	17. 8. 2012	1	7	✓

* V preglednici je vidno, da snemanje večinoma ni potekalo po več dni zapored. Pri prvi družini nam je to preprečilo slabo vreme. V primeru druge družine smo s posnetki 13. in 14. 8. 2012 želeli ugotoviti, če so se od zadnjega snemanja, 7. 8. 2012, čebele že kaj bolj privadile na biotično sredstvo, kateremu so bile izpostavljene tudi v vmesnih dneh, ko snemanja nismo izvajali. S snemanjem dne 17. 8. 2012 smo želeli ugotoviti vpliv biotičnega sredstva na čebele po dolgotrajnejši izpostavitvi le-temu.

Preglednica 2: Izpostavljenost poskusnih družin Prestopu Mix in potek snemanja po urah v posameznem dnevu. V dnevih s Prestopom Mix smo snemanje izvajali tudi 15 in 30 minut po dodatku biotičnega sredstva v razdelilnik.

Družina	Datum	Čas (min)	Tretma (brez Prestopa Mix – 0/ s Prestopom Mix – 1)	Snemanje	
				v razdelilniku	zunaj
1	23. 7. 2012	- 60	0	✓	✓
1	23. 7. 2012	0	0	✓	✓
1	23. 7. 2012	15	0	✗	✗
1	23. 7. 2012	30	0	✗	✗
1	23. 7. 2012	60	0	✓	✓
1	23. 7. 2012	120	0	✓	✓
1	23. 7. 2012	180	0	✓	✓
1	23. 7. 2012	240	0	✓	✓
1	26. 7. 2012	- 60	0	✓	✓
1	26. 7. 2012	0	1	✓	✓
1	26. 7. 2012	15	1	✓	✓
1	26. 7. 2012	30	1	✓	✓
1	26. 7. 2012	60	1	✓	✓
1	26. 7. 2012	120	1	✓	✓
1	26. 7. 2012	180	1	✓	✓
1	26. 7. 2012	240	1	✓	✓
1	27. 7. 2012	- 60	0	✓	✓
1	27. 7. 2012	0	1	✓	✓
1	27. 7. 2012	15	1	✓	✓
1	27. 7. 2012	30	1	✓	✓
1	27. 7. 2012	60	1	✓	✓

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2. Izpostavljenost poskusnih družin Prestopu Mix in potek snemanja po urah v posameznem dnevu. V dnevih s Prestopom Mix smo snemanje izvajali tudi 15 in 30 minut po dodatku biotičnega sredstva v razdelilnik.

Družina	Datum	Čas (min)	Tretma (brez Prestopa Mix – 0/ s Prestopom Mix– 1)	Snemanje	
				v razdelilniku	zunaj
1	27. 7. 2012	120	1	✗	✗
1	27. 7. 2012	180	1	✓	✓
1	27. 7. 2012	240	1	✓	✓
2	6. 8. 2012	- 60	0	✓	✓
2	6. 8. 2012	0	0	✓	✓
2	6. 8. 2012	15	0	✗	✗
2	6. 8. 2012	30	0	✗	✗
2	6. 8. 2012	60	0	✓	✓
2	6. 8. 2012	120	0	✓	✓
2	6. 8. 2012	180	0	✓	✓
2	6. 8. 2012	240	0	✓	✓
2	7. 8. 2012	- 60	0	✓	✓
2	7. 8. 2012	0	1	✓	✓
2	7. 8. 2012	15	1	✓	✓
2	7. 8. 2012	30	1	✓	✗
2	7. 8. 2012	60	1	✓	✓
2	7. 8. 2012	120	1	✓	✓
2	7. 8. 2012	180	1	✓	✓
2	7. 8. 2012	240	1	✓	✓
2	8. 8. 2012	- 60	0	✗	✗
2	8. 8. 2012	0	1	✗	✗

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2. Izpostavljenost poskusnih družin Prestopu Mix in potek snemanja po urah v posameznem dnevu. V dnevih s Prestopom Mix smo snemanje izvajali tudi 15 in 30 minut po dodatku biotičnega sredstva v razdelilnik.

Družina	Datum	Čas (min)	Tretma (brez Prestopa Mix – 0/ s Prestopom Mix– 1)	Snemanje	
				v razdelilniku	zunaj
2	8. 8. 2012	15	1	×	×
2	8. 8. 2012	30	1	×	×
2	8. 8. 2012	60	1	×	×
2	8. 8. 2012	120	1	×	×
2	8. 8. 2012	180	1	×	×
2	8. 8. 2012	240	1	×	×
2	9. 8. 2012	- 60	0	×	×
2	9. 8. 2012	0	1	×	×
2	9. 8. 2012	15	1	×	×
2	9. 8. 2012	30	1	×	×
2	9. 8. 2012	60	1	×	×
2	9. 8. 2012	120	1	×	×
2	9. 8. 2012	180	1	×	×
2	9. 8. 2012	240	1	×	×
2	10. 8. 2012	- 60	0	×	×
2	10. 8. 2012	0	1	×	×
2	10. 8. 2012	15	1	×	×
2	10. 8. 2012	30	1	×	×
2	10. 8. 2012	60	1	×	×
2	10. 8. 2012	120	1	×	×
2	10. 8. 2012	180	1	×	×

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2. Izpostavljenost poskusnih družin Prestopu Mix in potek snemanja po urah v posameznem dnevu. V dnevih s Prestopom Mix smo snemanje izvajali tudi 15 in 30 minut po dodatku biotičnega sredstva v razdelilnik.

Družina	Datum	Čas (min)	Tretma (brez Prestopa Mix – 0/ s Prestopom Mix– 1)	Snemanje	
				v razdelilniku	zunaj
2	10. 8. 2012	240	1	✗	✗
2	13. 8. 2012	- 60	0	✓	✓
2	13. 8. 2012	0	1	✓	✓
2	13. 8. 2012	15	1	✓	✓
2	13. 8. 2012	30	1	✓	✓
2	13. 8. 2012	60	1	✓	✓
2	13. 8. 2012	120	1	✓	✓
2	13. 8. 2012	180	1	✓	✓
2	13. 8. 2012	240	1	✓	✓
2	14. 8. 2012	- 60	0	✓	✓
2	14. 8. 2012	0	1	✓	✓
2	14. 8. 2012	15	1	✓	✓
2	14. 8. 2012	30	1	✓	✓
2	14. 8. 2012	60	1	✓	✓
2	14. 8. 2012	120	1	✓	✓
2	14. 8. 2012	180	1	✓	✓
2	14. 8. 2012	240	1	✓	✓
2	16. 8. 2012	- 60	0	✗	✗
2	16. 8. 2012	0	1	✗	✗
2	16. 8. 2012	15	1	✗	✗
2	16. 8. 2012	30	1	✗	✗

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2. Izpostavljenost poskusnih družin Prestopu Mix in potek snemanja po urah v posameznem dnevu. V dnevih s Prestopom Mix smo snemanje izvajali tudi 15 in 30 minut po dodatku biotičnega sredstva v razdelilnik.

Družina	Datum	Čas (min)	Tretma (brez Prestopa Mix – 0/ s Prestopom Mix– 1)	Snemanje	
				v razdelilniku	zunaj
2	16. 8. 2012	60	1	✗	✗
2	16. 8. 2012	120	1	✗	✗
2	16. 8. 2012	180	1	✗	✗
2	16. 8. 2012	240	1	✗	✗
2	17. 8. 2012	- 60	0	✓	✓
2	17. 8. 2012	0	1	✓	✓
2	17. 8. 2012	15	1	✓	✓
2	17. 8. 2012	30	1	✓	✓
2	17. 8. 2012	60	1	✓	✓
2	17. 8. 2012	120	1	✓	✓
2	17. 8. 2012	180	1	✓	✓
2	17. 8. 2012	240	1	✓	✓

* Minute od -60 do 240 predstavljajo čas snemanja oziroma čas glede na dodajanje Prestopa Mix v razdelilnik. Tako - 60 min pomeni snemanje eno uro pred, 0 min uro ob dodatku sredstva v razdelilnik, vse naslednje minute pa čas po dodatku Prestopa Mix v razdelilnik. Nekateri posnetki manjkajo zaradi tehničnih težav.

3.4 ANALIZA PODATKOV

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program SPSS 14.0 for Windows. Za ugotavljanje statistično značilnih razlik smo uporabili test χ^2 in Mann-Whitneyev U test. V programu SPSS smo izrisali tudi grafa občutljivosti čebel na saharozo. Ostale grafe smo izrisali v programu Microsoft Excel 2010.

4 REZULTATI

4.1 ODZIVNOST NA PREHRANSKE DRAŽLJAJE

V poskusih odzivnosti na prehranske dražljaje smo testirali skupno 809 čebel, od tega jih je test občutljivosti uspešno končalo 585. Kasneje smo jih izločili še 140, ker so bile za poskuse neprimerne (neprimerna odzivnost, smrt). Poskuse je tako uspešno končalo 445 čebel.

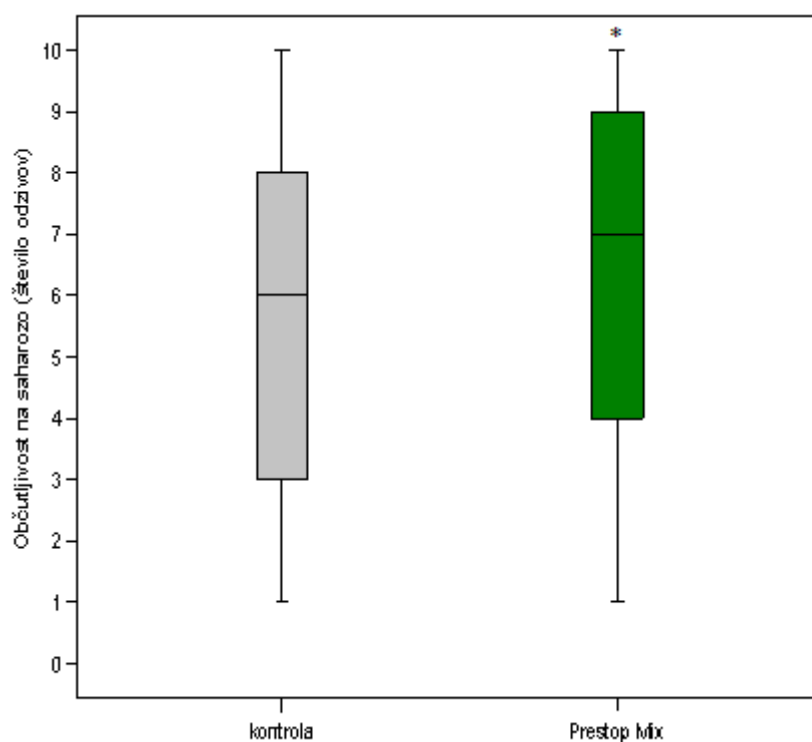
4.1.1 Odzivnost in občutljivost na saharozo

Merilo odzivnosti je bil PER odziv vsaj na 40 % saharozo. Od 809 čebel jih je reagiralo 585 (72.3 %). Pri čebelah, ki so bile kasneje vključene v prvi poskus testiranja odziva po enem pogojnem dražljaju po 1 min, je bil odziv 68.6 %, pri čebelah pri drugem poskusu testiranja po enem pogojnem dražljaju po 12 min pa 76.0 %. V obeh poskusih je bila odzivnost čebel, ki so bile izpostavljene biotičnemu sredstvu nekoliko višja, vendar razlike niso bile statistično značilne (Preglednica 3).

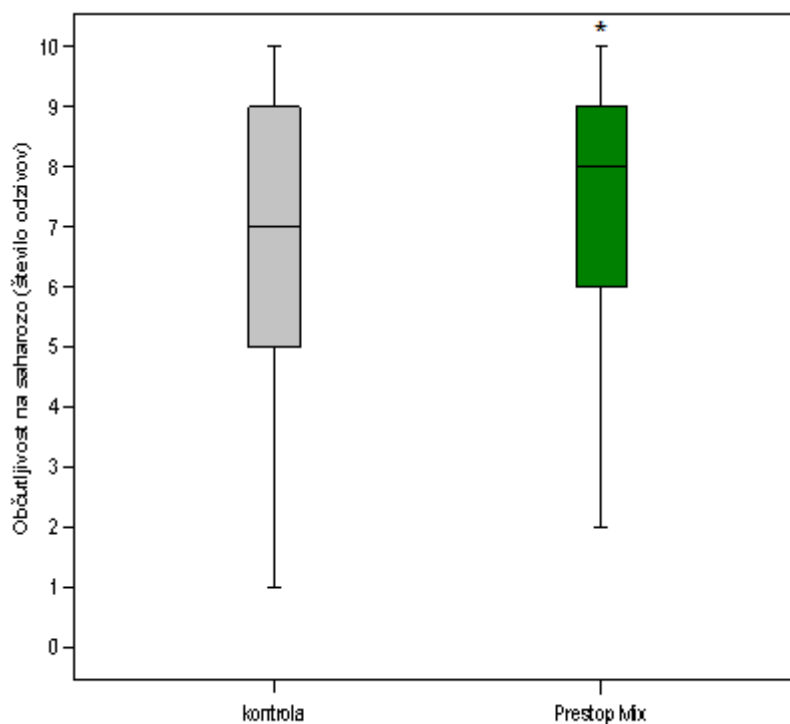
Preglednica 3: Odzivnost na saharozo pri čebelah, ki so bile nato vključene v prvi in drugi poskus testiranja 1 ali 12 min po enem pogojnem dražljaju. Merilo odzivnosti je bil PER odziv na vsaj 40 % raztopino saharoze.

	Prvi poskus		Drugi poskus	
	Število čebel na začetku	Število čebel s PER odzivom	Število čebel na začetku	Število čebel s PER odzivom
Kontrola	195	131 (67.2 %)	208	155 (74.5 %)
Prestop Mix	210	147 (70.0 %)	196	152 (77.6 %)
Skupaj	405	278 (68.6 %)	404	307 (76.0 %)

Merilo občutljivosti na saharozo je bila vsota PER odzivov na naraščajoče koncentracije saharoze. Višja vrednost pomeni večjo občutljivost čebel. Najvišjo vrednost (10) so dobile čebele, ki so reagirale na vse koncentracije. V obeh poskusih so bile bolj občutljive čebele, ki so bile izpostavljene biotičnemu sredstvu. V prvem poskusu je pri čebelah, ki so bile tretirane s Prestopom Mix, mediana števila odzivov znašala 7 pri kontrolni pa 6 ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test; Slika 13). V drugem poskusu je bila mediana v obeh skupinah nekoliko višja (Prestop Mix 8, kontrola 7; $p < 0.01$, Mann-Whitney U test; Slika 14).



Slika 13: Občutljivost na saharozo pri čebelah, ki so bile nato vključene v prvi poskus testiranja po enem pogojnem dražljaju.* = statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$, $N = 216$).

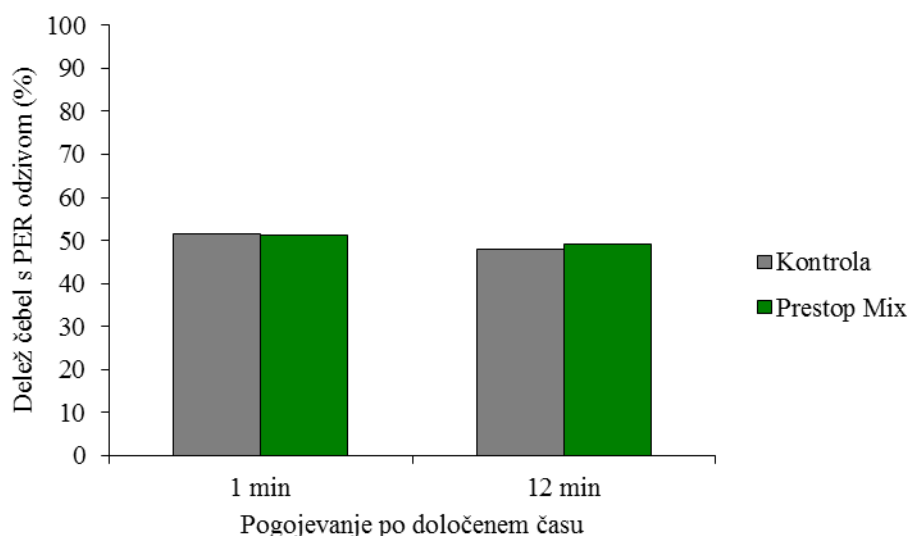


Slika 14: Občutljivost na saharozo pri čebelah, ki so bile nato vključene v drugi poskus testiranja po enem pogojnem dražljaju. * = statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino (Mann-Whitney U test, $p < 0.01$, $N = 229$).

4.1.2 Testiranje odziva po enkratnem draženju s pogojnim dražljajem (1 min in 12 min)

Pri testiranju odziva po enem pogojnem dražljaju po 1 min je od 264 čebel poskus uspešno končalo 105 kontrolnih in 111 čebel tretiranih s Prestopom Mix, skupno torej 216 (81.82 %) čebel. Prestop Mix ni vplival na odziv eno minuto po pogojevanju. Delež čebel s PER odzivom je bil pri obeh skupinah skoraj povsem enak (kontrola 51.43 %, Prestop Mix 51.35 %), tako med skupinama ni bilo statistično značilne razlike.

Pri testiranju odziva po enem pogojnem dražljaju po 12 min je od 288 čebel poskus uspešno zaključilo 229 (79.51 %) čebel, od tega 121 kontrolnih in 108 tretiranih s Prestopom Mix. V tem primeru je bil pri tretirani skupini odziv 12 min po pogojevanju nekoliko večji (kontrola 47.93 %, Prestop Mix 49.07 %), vendar razlike tudi v tem primeru niso bile statistično značilne (Slika 15).



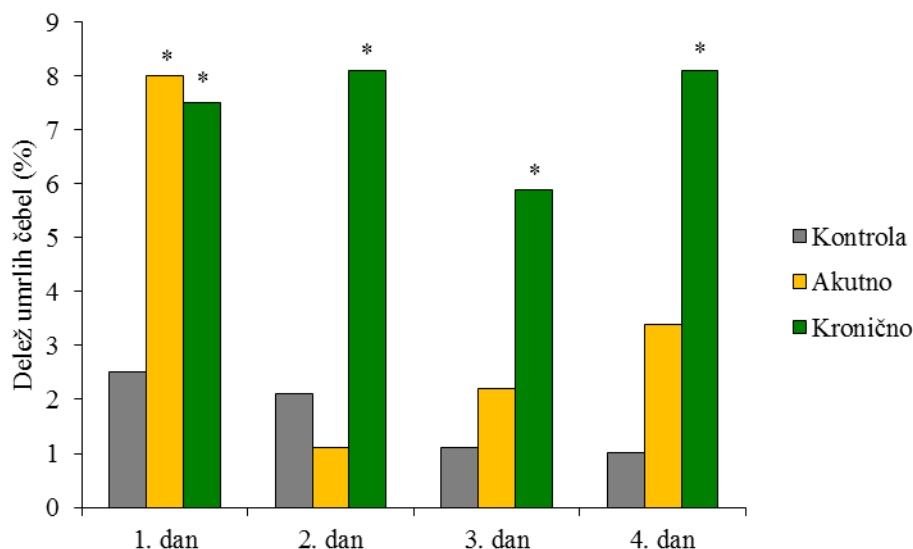
Slika 15: Delež čebel s PER odzivom na pogojni dražljaj 1 in 12 minut po testiranju odziva po enem pogojnem dražljaju ($N_{1 \text{ min}} = 216$, $N_{12 \text{ min}} = 229$), ni statistično značilnih razlik.

4.2 SMRTNOST

Prestop Mix je povečal smrtnost čebel (Slika 16). Prvi dan je v kontrolni skupini umrlo 2.5 %, v preostalih dveh pa 8.0 % oziroma 7.5 %, kar je 3.2-krat oziroma 3-krat več. Razlike so statistično značilne (kontrola:akutno, $\chi^2 = 6.081$, $p < 0.05$; kontrola:kronično, $\chi^2 = 5.263$, $p < 0.05$).

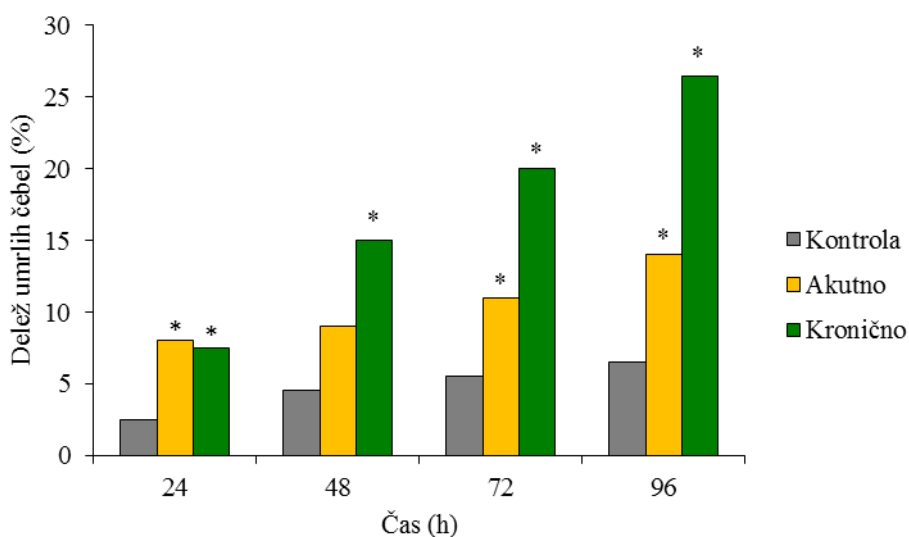
V nadaljevanju poskusa je bila smrtnost vedno najvišja v skupini, ki je bila sredstvu Prestop Mix izpostavljena kronično. V drugem dnevu je v kontrolni skupini umrlo 2.1 %, v akutni pa 1.1 % čebel. Delež umrlih čebel je bil v akutni skupini 1.9-krat nižji, vendar razlike niso bile statistično značilne. V kronični skupini je bila smrtnost 8.1 %, kar je v primerjavi s kontrolo 3.9-krat več in tudi statistično značilno ($\chi^2 = 7.332$, $p < 0.01$).

Tretji in četrti dan je bila smrtnost v kontrolni skupini 1.1 % in 1.0 %. V akutni skupini je bila v primerjavi s kontrolno smrtnost tretji dan 2-krat, četrti dan pa 3.4-krat večja, vendar razlike niso bile statistično značilne. Smrtnost je bila največja v kronični skupini, kjer je bila tretji dan 5.4-krat, četrti dan pa 8.1-krat večja kot v kontrolni skupini (tretji dan, $\chi^2 = 6.544$, $p < 0.05$; četrti dan, $\chi^2 = 10.520$, $p < 0.01$).



Slika 16: Smrtnost po dnevih, * = statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino (χ^2 , p (kontrola:akutno) 1. dan < 0.05, N = 400, p (kontrola:kronično) 1. dan < 0.05, N = 400; χ^2 , p (kontrola:kronično) 2. dan < 0.01, N = 380; χ^2 , p (kontrola:kronično) 3. dan < 0.05, N = 361; χ^2 , p (kontrola:kronično) 4. dan < 0.01, N = 349).

Ob koncu poskusa, torej po 96-ih urah, je delež smrti pri kontrolnih čebelah dosegel 6.5 %, v akutni skupini 14 % (2.2-krat več), v kronični pa 26.5 % (4.1-krat več kot v kontrolni). Delež umrlih čebel se je med kontrolno in akutno skupino statistično značilno razlikoval ($\chi^2 = 6.115$, p < 0.05), prav tako je bila razlika statistično značilna med kontrolno in kronično skupino ($\chi^2 = 29.033$, p < 0.001) (Slika 17).



Slika 17: Kumulativna smrtnost po dnevih, * = statistično značilna razlika v primerjavi s kontrolno skupino (χ^2 , p (kontrola:akutno)_{96 h} < 0.05, p (kontrola:kronično)_{96 h} < 0.05, N = 400 (200 za posamezno skupino čebel)).

4.3 VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU IN PRED NJIM

4.3.1 Vedenje pred razdelilnikom

Zaradi velikega števila čebel pred panjem smo med pregledovanjem posnetkov beležili le prisotnost posameznih vedenj, ne pa tudi točnega števila čebel s posameznim vedenjem. Rezultati so zato le kvalitativni.

Takoj po nanosu sredstva Prestop Mix v predal so iz razdelilnika letale povsem bele čebele, kasneje (po eni uri) povsem belih čebel ni bilo, smo pa posamezne čebele, ki so bile vidno kontaminirane s sredstvom, opazili tudi v naslednjih urah (Slika 18). Zadnjo uro snemanja navadno ni bilo več opaziti belih čebel.



Slika 18: Največ čebel, ki so bile vidno kontaminirane, je bilo takoj po nasutju sredstva v razdelilnik, kasneje pa jih je bilo vedno manj. (Bevk D., 2012)

Takoj po aplikaciji je sredstvo zelo očitno vplivalo na vedenje čebel, tako tistih, ki so panj zapuščale, kot tistih, ki so se vračale. Prve pol ure po dodatku biotičnega sredstva se je pred panjem v zraku nabralo veliko čebel, ki niso pristale. Nekatere bele čebele, ki so zapuščale panj, so padle na tla (Slika 19). Običajno jih je bilo 5 do 10, večina jih je kasneje zletela, nekatere pa so umrle.



Slika 19: Bela čebela, ki je po izletu iz panja padla na tla (Bevk D., 2012)

V nekaterih primerih smo kmalu po dodatku sredstva v razdelilnik na izhodu razdelilnika opazili čebele v pretepu. Zadnji dan snemanja smo pretep na izhodu opazili kasneje (tretjo uro po dodatku Prestopa). Na izhodu smo včasih opazili tudi čebele, ki so iz panja odstranjevale mrtve čebele. Pri izhodu iz razdelilnika so se nekatere čebele čistile tako v dnevih z kot v dnevih brez Prestopa Mix. Prav tako smo v veliki večini opazovanj opazili čebele, ki na izhodu niso vzletele, ampak so se vrnile nazaj v panj.

V vseh dnevih (z in brez Prestopa Mix) in vseh urah snemanja so nekatere čebele vstopale v panj tudi na izhodu razdelilnika. Poleg čebel, ki so se vračale iz paše (čebele, ki so nosile cvetni prah), so vstopale tudi bele čebele. Mnogokrat so čebele pristajale na izhodu, a v panj niso vstopile (so odletele stran).

Predvsem v prvih dneh poskusa so bile čebele po dodatku Prestopa Mix precej agresivne, kasneje pa se je stanje umirilo.

4.3.2 Vedenje čebel v razdelilniku

4.3.2.1 Pogostost posameznih vedenj v dneh brez in s Prestopom Mix

S pomočjo videokamere smo opazovali vedenje čebel v razdelilniku v dneh brez in s Prestopom Mix. Pogostost vedenj smo prikazali grafično.

Dnevi brez Prestopa Mix predstavljajo kontrolo (K). V teh dneh (in v dneh s Prestopom Mix v času pred dodatkom le-tega v razdelilnik) je bilo prevladujoče vedenje čebel direkten prehod razdelilnika. V okviru tega vedenja smo upoštevali vse čebele, ki niso izletele iz razdelilnika ali ga preskočile, ampak so brez ustavljanja, obračanja in hoje po stenah razdelilnika normalno prehodile del razdelilnika, kamor smo v dneh s Prestopom Mix (PM) dodajali biotično sredstvo. Rezultati so v dneh s PM pokazali velik upad deleža čebel z direktnim prehodom predvsem v prvi uri po dodatku sredstva (takoj po dodatku PM v primerjavi s prvo uro snemanja 34-krat manjši, po 15 minutah se začne povečevati). V naslednjih urah se je delež počasi povečeval in se približeval deležu v dneh brez Prestopa Mix (Slika 22).

Po dodatku Prestopa Mix v razdelilnik smo opazili povečanje pogostosti določenih vedenj. Povečal se je delež čebel, ki niso v celoti prehodile polja s Prestopom Mix, ampak so prej izletele. Delež se je v zadnjih urah snemanja počasi zmanjševal. Po dodatku biotičnega sredstva so številne čebele polje z njim preskočile. V dneh brez Prestopa Mix je bilo takšnih čebel zelo malo (manj kot 3 %), v dneh s PM pa se je delež takoj po dodatku sredstva dvignil na 26 %, nato pa se počasi zmanjševal. Nekatere čebele (15 min po dodatku sredstva jih je bilo 18 %) so se pri prehodu polja s Prestopom Mix v razdelilniku obrnile na hrbet (Slika 22).



Slika 20: Čebela, ki se je pri prehodu polja s Prestopom Mix obrnila na hrbet (Zaplotnik Š., 2012)

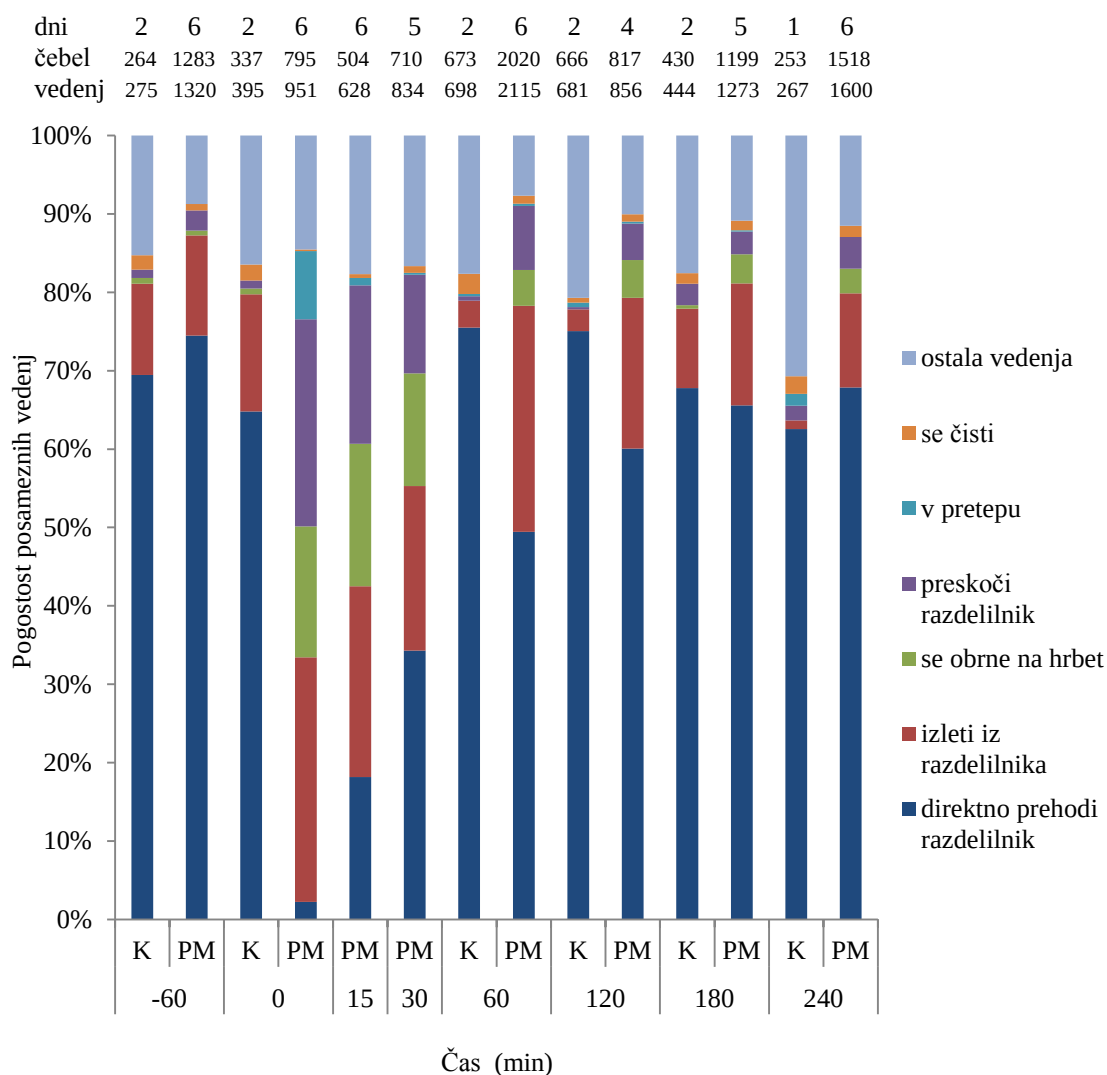
Opazovali smo tudi, ali se čebele čistijo. Tako v dneh brez kot tudi v dneh s PM je bilo takih čebel malo (manj kot 3 %). Takoj po dodatku sredstva je bil delež takšnih čebel najnižji. Tudi sicer smo več čebel, ki so se pred izhodom iz panja čistile, običajno opazili v dneh brez Prestopa Mix (Slika 22).

Prestop Mix je vplival tudi na agresivnost čebel. Največ pretepov delavk smo opazili takoj po dodatku sredstva (8 %). Kasneje in v dneh brez sredstva so bili pretepi zelo redki (Slika 22).



Slika 21: Tri čebele v pretepu (Zaplotnik Š., 2012)

Poleg opisanih vedenj smo opazili tudi nekatera vedenja, ki so se pojavljala redkeje. Skupni deleži teh vedenj so prikazani na Sliki 22. Čebele so dlje časa hodile po razdelilniku, kot da se ne bi mogle odločiti ali naj panj zapustijo ali ne. Nekatere so se obračale nazaj proti panju. S hojo po stenah razdelilnika do izhoda so se izogibale stiku z biotičnim sredstvom. Včasih so čebele odstranjevale mrtve čebele, ki so ležale v razdelilniku. Pri množici čebel, ki so poskušale čim hitreje priti iz panja, je bilo tudi nekaj takih, ki so lezle čez druge čebele. Nekatere čebele so se dotikale z antenami. Ob čelnem srečanju dveh čebel je takšno otipavanje pogosto in lahko vodi v medsebojno izmenjavo hrane (Božič, 2008), kar smo v nekaterih primerih tudi opazili. Opazili smo tudi čebele, ki so ventilirale s krili (teh nismo šteli). Na ta način so zračile panj.

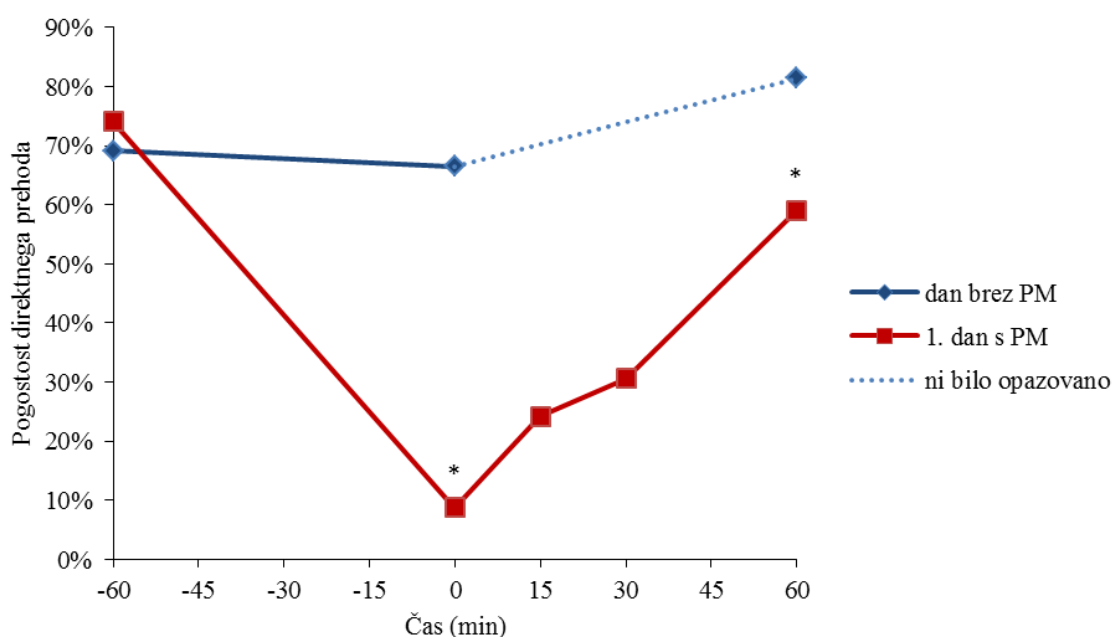


Slika 22: Pogostost posameznih vedenj v dnevih brez (K) in s Prestopom Mix (PM) v posameznem času snemanja. Pogostost posameznega vedenja je izračunana glede na število vseh vedenjskih dogodkov. Združeni so podatki iz obeh družin. V vsakem snemalnem času smo poskušali pridobiti po pet enominutnih posnetkov. Iz različnih razlogov (tehnične težave, nepregledni posnetki zaradi zaprte kamere) smo jih v nekaterih primerih analizirali tudi manj. V prvi vrstici nad vsakim stolpcem je prikazano število testnih dni, v drugi število vseh čebel in v tretji število vseh vedenj. Ker smo snemanje v času 15 in 30 minut izvajali le v dnevih s Prestopom Mix, v dnevih brez za ta čas ni podatkov. Podrobnosti poteka poskusa so opisane v podpoglavju 3.3 in Preglednici 2.

4.3.2.2 Pogostost posameznih vedenj v dnevu brez in prvem dnevu s Prestopom Mix

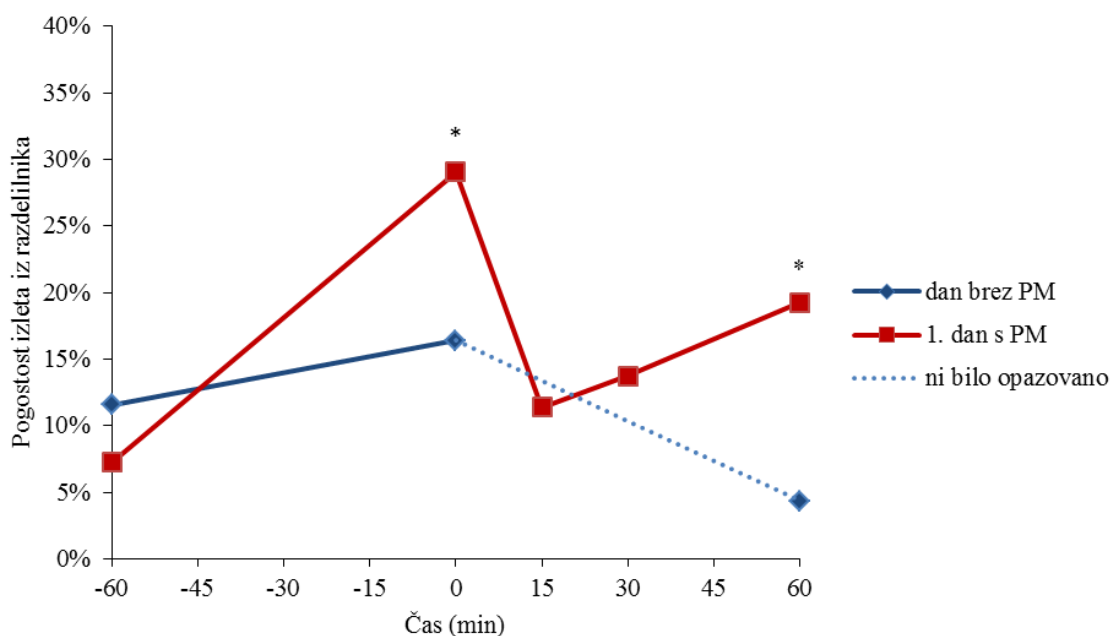
Opazovali smo pogostost posameznih vedenj v dnevu brez in prvem dnevu s Prestopom Mix v času od ene ure pred do ene ure po dodatku le-tega v razdelilnik.

V prvem dnevu s PM je takoj po dodatku sredstva v razdelilnik prišlo do velikega upada deleža čebel z direktnim prehodom (8-krat manjši kot eno uro pred dodatkom PM), kar je v primerjavi z dnevom brez PM statistično značilno ($\chi^2 = 31.479$, $p < 0.001$). Že po petnajstih minutah se je pogostost tega vedenja začela povečevati, vendar je bila eno uro po dodatku PM razlika med dnevoma še vedno statistično značilna ($\chi^2 = 4.452$, $p < 0.05$) (Slika 23).



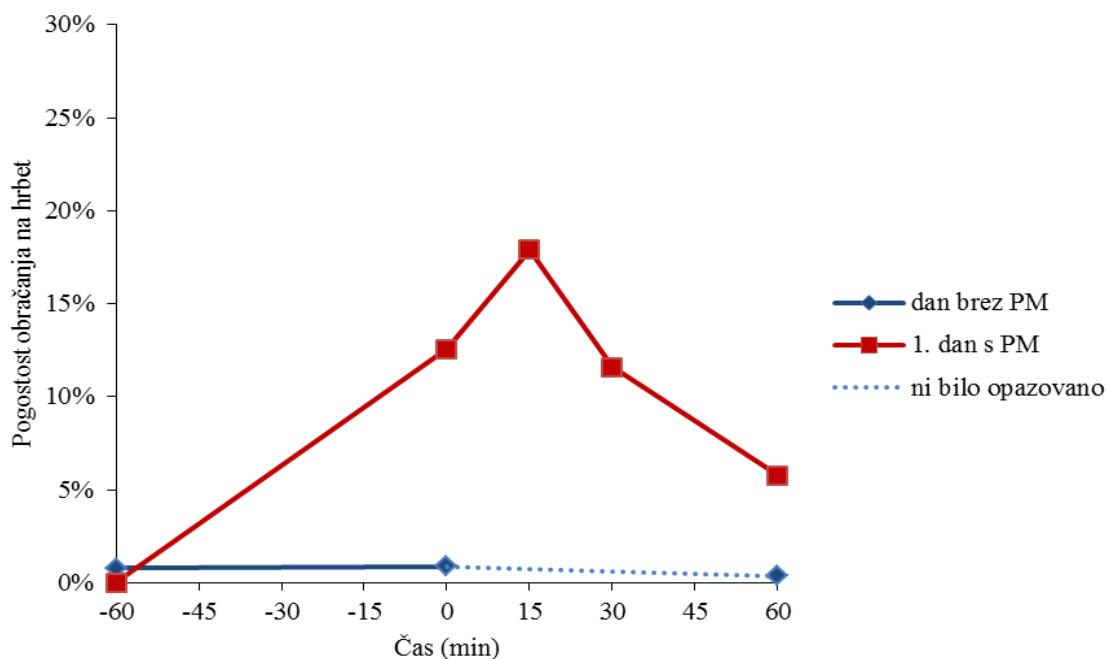
Slika 23: Pogostost direktnega prehoda v posameznem času snemanja. Združeni so podatki za prvo in drugo družino za dan brez in prvi dan s sredstvom v času od ene ure pred (- 60 min) do ene ure po (60 min) dodatku sredstva v razdelilnik. Ker v dnevu brez PM v času 15 in 30 minut snemanja nismo izvajali, smo za ta čas zaradi lažjega grafičnega prikaza dodali niz "ni bilo opazovano". * = statistično značilna razlika v primerjavi z dnevom brez PM (χ^2 , $p < 0.05$, $N_{-60 \text{ min}} = 77$, $N_{0 \text{ min}} = 87$, $N_{60 \text{ min}} = 157$).

Največ izletov iz razdelilnika je bilo v prvem dnevu s PM prisotnih takoj ob dodatku PM, ko je pogostost tega vedenja dosegla 30 % in se od kontrolnega dneva, v katerem je bila v tem času tudi najvišja, statistično značilno razlikovala ($\chi^2 = 4.566$, $p < 0.05$). Petnajst minut po dodatku Prestopa Mix je v dnevu s PM precej upadla, nato pa se začela povečevati in se tudi uro po dodatku sredstva v primerjavi s pogostostjo izleta v dnevu brez PM statistično značilno razlikovala ($\chi^2 = 8.292$, $p < 0.01$) (Slika 24).



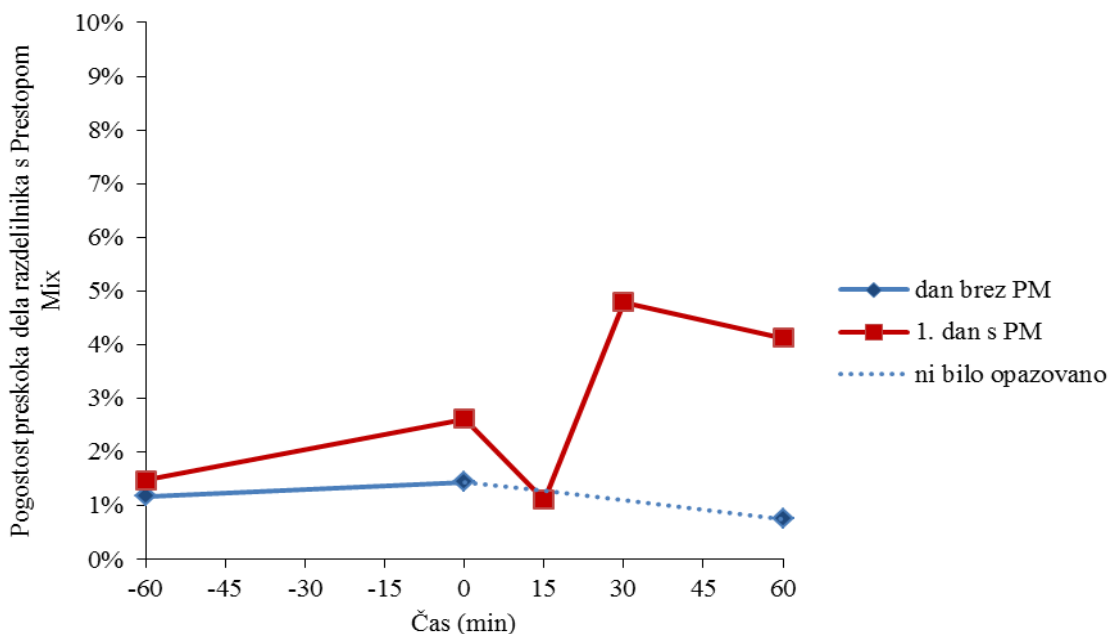
Slika 24: Pogostost izleta iz razdelilnika v posameznem času snemanja. Združeni so podatki za prvo in drugo družino za dan brez in prvi dan s sredstvom v času od ene ure pred (- 60 min) do ene ure po (60 min) dodatku sredstva v razdelilnik. Ker v dnevu brez PM v času 15 in 30 minut snemanja nismo izvajali, smo za ta čas zaradi lažjega grafičnega prikaza dodali niz "ni bilo opazovano". * = statistično značilna razlika v primerjavi z dnevom brez PM (χ^2 , $p < 0.05$, $N_{-60 \text{ min}} = 77$, $N_{0 \text{ min}} = 87$, $N_{60 \text{ min}} = 157$).

Obračanja na hrbet v dnevu brez PM skoraj ni bilo opaziti. V prvem dnevu s PM se je 15 minut po dodatku sredstva pogostost dvignila na 18 %, nato pa počasi upadala. V nobenem času snemanja med dnevoma ni bilo statistično značilnih razlik (Slika 25).



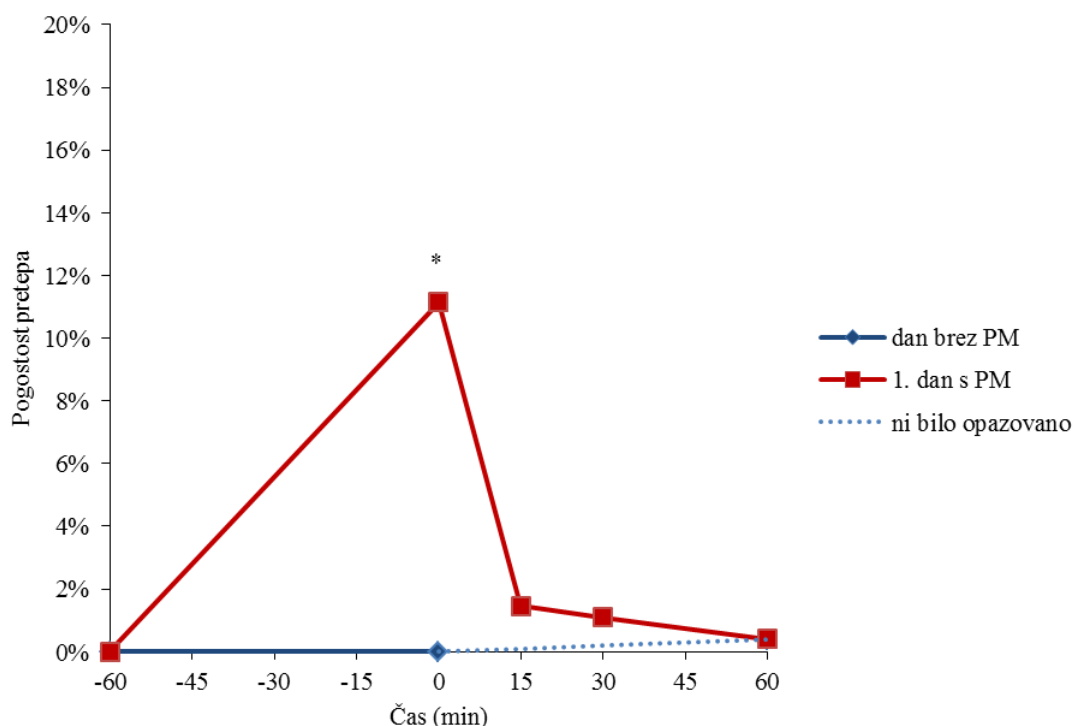
Slika 25: Pogostost obračanja na hrbet v posameznem času snemanja. Združeni so podatki za prvo in drugo družino za dan brez in prvi dan s sredstvom v času od ene ure pred (- 60 min) do ene ure po (60 min) dodatku sredstva v razdelilnik. Ker v dnevu brez PM v času 15 in 30 minut snemanja nismo izvajali, smo za ta čas zaradi lažjega grafičnega prikaza dodali niz "ni bilo opazovano". Ni statistično značilnih razlik ($N_{-60 \text{ min}} = 77$, $N_{0 \text{ min}} = 87$, $N_{60 \text{ min}} = 157$).

Delež čebel s preskokom dela razdelilnika s Prestopom Mix je bil tako v dnevu brez kot tudi v dnevu s PM precej nizek (v dnevu s PM ni presegel 5 %). V dnevu s PM je bilo tega vedenja nekoliko več, vendar razlike niso bile statistično značilne (Slika 26).



Slika 26: Pogostost preskoka dela razdelilnika s Prestopom Mix v posameznem času snemanja. Združeni so podatki za prvo in drugo družino za dan brez in prvi dan s sredstvom v času od ene ure pred (- 60 min) do ene ure po (60 min) dodatku sredstva v razdelilnik. Ker v dnevu brez PM v času 15 in 30 minut snemanja nismo izvajali, smo za ta čas zaradi lažjega grafičnega prikaza dodali niz "ni bilo opazovano". Ni statistično značilnih razlik ($N_{-60 \text{ min}} = 77$, $N_{0 \text{ min}} = 87$, $N_{60 \text{ min}} = 157$).

V dnevju brez PM smo pretep delavk opazili le v času 60 minut, pa še takrat v zelo nizkem deležu. V dnevju s PM se je v času 0 minut, torej takoj po dodatku Prestopa Mix v razdelilnik, pogostost tega vedenja povečala na 11 % in se v tem času tudi statistično značilno razlikovala v primerjavi s kontrolnim dnevom ($\chi^2 = 8.028$, $p < 0.01$). Po petnajstih minutah je bilo čebel s tem vedenjem že precej manj, eno uro po dodatku Prestopa Mix pa razlik ni bilo več.



Slika 27: Pogostost pretepa v posameznem času snemanja. Združeni so podatki za prvo in drugo družino za dan brez in prvi dan s sredstvom v času od ene ure pred (- 60 min) do ene ure po (60 min) dodatku sredstva v razdelilnik. Ker v dnevju brez PM v času 15 in 30 minut snemanja nismo izvajali, smo za ta čas zaradi lažjega grafičnega prikaza dodali niz "ni bilo opazovano". * = statistično značilna razlika v primerjavi z dnevom brez PM (χ^2 , $p < 0.01$, $N_{-60 \text{ min}} = 77$, $N_{0 \text{ min}} = 87$, $N_{60 \text{ min}} = 157$).

Med kontrolnim dnevom (dnevom brez PM) in dnevom s PM smo primerjali tudi pogostost čistilnega vedenja. Vedenje je bilo v obeh dneh zelo redko (do 2 %) in ga nismo grafično prikazali. V nobenem času snemanja med dnevoma ni bilo statistično značilnih razlik.

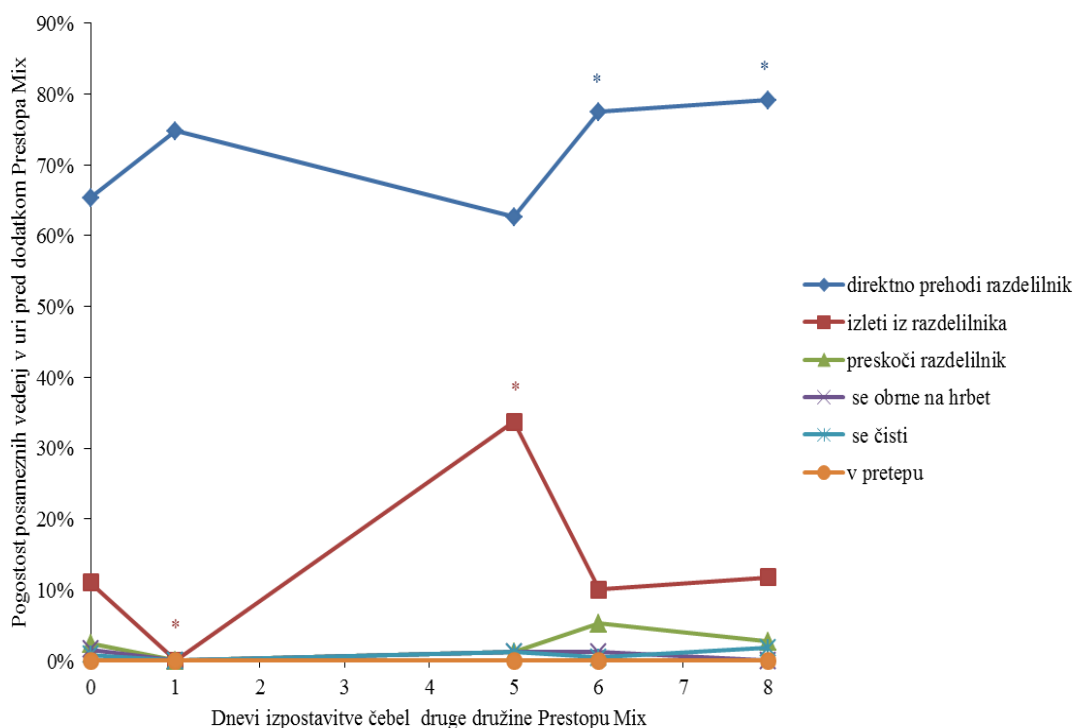
4.3.2.3 Dolgotrajnejša izpostavitve čebel Prestopu Mix

Druga družina je bila PM izpostavljena dalj časa, zato smo lahko opazovali, ali se vpliv sredstva po daljšem času uporabe spreminja. Primerjali smo pogostost vedenj v posameznih dneh izpostavitve v primerjavi s kontrolnim (prvim) dnem v uri pred in takoj po dodatku biotičnega sredstva v razdelilnik.

Preglednica 4: Število vseh čebel in vseh vedenjskih dogodkov v posameznih dneh izpostavitve čebel druge družine Prestopu Mix v uri pred dodatkom in takoj po dodatku sredstva v razdelilnik.

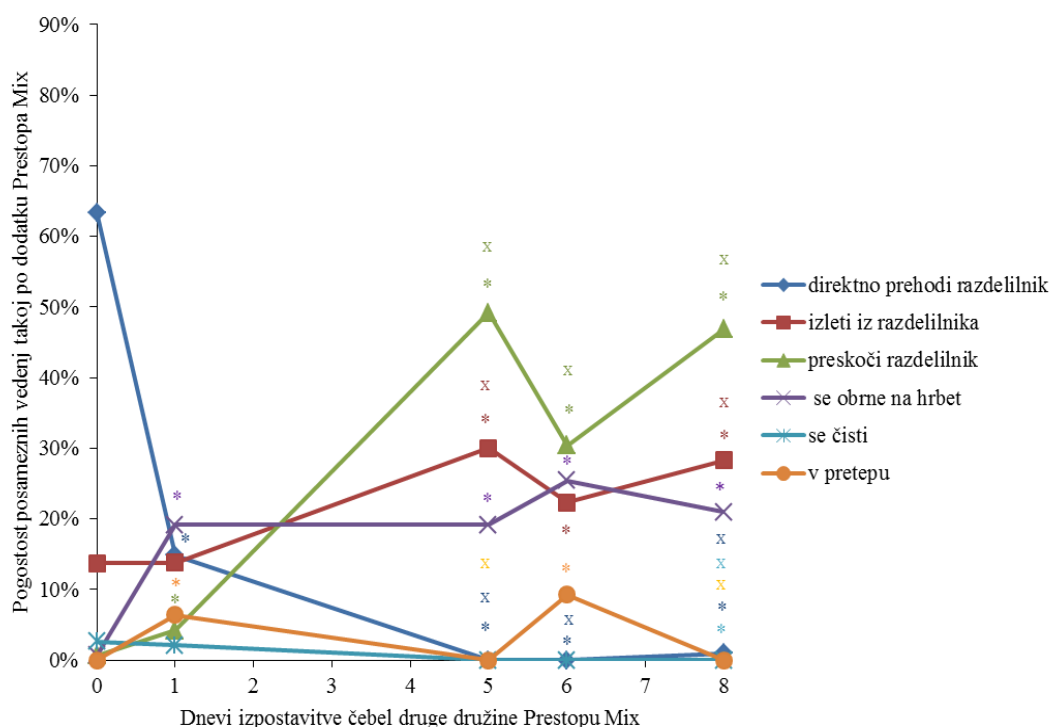
Dnevi izpostavitve čebel 2. družine Prestopu Mix	Pred dodatkom Prestopa Mix		Po dodatku Prestopa Mix	
	Število vseh čebel	Število vseh vedenjskih dogodkov	Število vseh čebel	Število vseh vedenjskih dogodkov
0	119	127	289	306
1	118	127	71	94
5	83	83	104	120
6	242	249	132	161
8	213	221	177	205

Spremembe smo opazili že v uri pred dodatkom Prestopa Mix. Pogostost direktnega prehoda se je nekoliko povečala, pogostost izleta iz razdelilnika pa se je spreminjala, a težko govorimo o nekem trendu. Pri ostalih vedenjih sprememb nismo opazili (Slika 28).



Slika 28: Pogostost posameznih vedenj v uri pred dodatkom Prestopa Mix v razdelilnik v posameznih dneh izpostavitve sredstvu. Prikazani so podatki za dni, v katerih smo izvajali snemanje (dan pred izpostavitvijo, prvi, peti, šesti in osmi dan izpostavitve čebel Prestopu Mix). Delež je izračunan glede na skupno število vseh vedenjskih dogodkov v petih enominutnih posnetkih v posameznem času opazovanja. Podrobnosti poteka poskusa so opisane v podpoglavju 3.3 in Preglednici 2, število čebel in vedenjskih dogodkov pa je navedeno v Preglednici 4. * = statistično značilna razlika v primerjavi z dnevom brez PM (χ^2 , $p < 0.05$).

V času takoj po dodatku Prestopa Mix so bile spremembe še večje. Pogostost direktnega prehoda se je ob dodatku Prestopa Mix zmanjšala. Peti in šesti dan tega vedenja sploh nismo zasledili, osmi dan pa, vendar je bil delež čebel z direktnim prehodom še vedno zelo nizek ($\chi^2 = 24.649$, $p < 0.01$). Nasprotno se je povečal delež čebel, ki so se obrnile na hrbet ali preskočile razdelilnik, vedenji, ki smo jih v kontrolnem dnevu komajda zasledili. V primerjavi s prvim dnevom izpostavitve se pogostost obračanja na hrbet v naslednjih dneh ni razlikovala, pogostost preskoka razdelilnika pa je bila statistično značilno višja kot prvi dan (χ^2 (8.dan) = 52.479, $p < 0.01$). Povečal se je tudi delež čebel, ki so izletele iz razdelilnika (χ^2 (8.dan) = 7.445, $p < 0.01$). Čiščenje smo opazili redko, do statistične razlike v primerjavi s kontrolnim in prvim dnevom s PM je prišlo le osmi dan izpostavitve Prestopu Mix (primerjava s kontrolnim dnevom: $\chi^2 = 5.445$, $p < 0.05$, primerjava s prvim dnevom: $\chi^2 = 4.391$, $p < 0.05$). V dnevu brez sredstva tudi nismo opazili pretepa čebel, medtem ko je bil ob dodatku Prestopa Mix prisoten prvi in šesti dan (Slika 29).



Slika 29: Pogostost posameznih vedenj takoj po dodatku Prestopa Mix v razdelilnik v posameznih dneh izpostavitve sredstvu. Prikazani so podatki za dni, v katerih smo izvajali snemanje (dan pred izpostavitvijo, prvi, peti, šesti in osmi dan izpostavitve čebel Prestopu Mix). Delež je izračunan glede na skupno število vseh vedenjskih dogodkov v petih enominutnih posnetkih v posameznem času opazovanja. Podrobnosti poteka poskusa so opisane v podpoglavju 3.3 in Preglednici 2, število čebel in vedenjskih dogodkov pa je navedeno v Preglednici 4. * = statistično značilna razlika v primerjavi z dnevom brez PM (χ^2 , $p < 0.05$), x = statistično značilna razlika v primerjavi s prvim dnevom s PM (χ^2 , $p < 0.05$).

5 RAZPRAVA

5.1 VPLIV PRESTOPA MIX NA ODZIVNOST NA PREHRANSKE DRAŽLJAJE

Rezultati so pokazali, da Prestop Mix ne vpliva na odzivnost čebel po enkratnem draženju s pogojnim dražljajem in na odzivnost na saharozo, vpliva pa na njihovo občutljivost, saj so tretirane čebele iztegnile jeziček že pri nižjih koncentracijah saharoze. Odziv eno minuto po pogojevanju je sicer v večji meri posledica senzitivizacije. Predvidevamo, da je Prestop Mix čebele senzitiviziral, kar pomeni večjo kratkotrajno odzivnost na številne dražljaje, vključno s pogojnim. Pri odzivu 12 minut po pogojevanju pa že lahko govorimo o asociativnem učenju. (Menzel, 1999). V našem primeru, kjer smo izpeljali samo eno testiranje pri pogojevanju, odziv 12 minut po pogojevanju verjetno lahko pripišemo začetni fazi asociativnega učenja.

5.2 VPLIV PRESTOPA MIX NA SMRTNOST

Biotično sredstvo je povečalo smrtnost čebel tako ob akutni kot kronični izpostavljenosti. Pri akutni izpostavljenosti je bil učinek opazen samo prvi dan, pri kronični pa vse štiri dni. To pomeni, da sredstvo na smrtnost vpliva predvsem znotraj 24 ur po izpostavitvi, potem pa učinek upade.

V kontrolni skupini je bila smrtnost 6.5 %. Pri upoštevanju dejstva, da pašne čebele običajno živijo še do tri tedne, poskusne čebele pa so bile pašne čebele neznane starosti, torej so bile med njimi tudi stare pašne čebele, je taka smrtnost povsem v mejah pričakovanega oziroma celo nižja. Gledano teoretično bi namreč pri poskusu, ki bi trajal tri tedne, morale umreti vse čebele (če bi bila življenjska doba tri tedne). Pri desetdnevnom poskusu bi tako umrla približno polovica čebel, pri petdnevnom pa četrtnina. V našem primeru, torej v štiridnevnom poskusu, bi lahko pričakovali smrtnost kar slabe četrtnine čebel. Očitno so razmere v kletki (vsaj za kratko obdobje) za življenje čebel dokaj ugodne in je bila zato smrtnost razmeroma nizka.

Pomembno vprašanje je, kaj je povzročilo smrt čebel, gliva *Gliocladium catenulatum* ali fizikalne lastnosti sredstva. Domnevamo, da gliva kot taka ne vpliva na smrtnost čebel, ampak večji problem verjetno predstavlja oblika sredstva Prestop Mix. Prašek se namreč zelo dobro oprime telesa čebel, mogoče zahaja tudi v traheje, ob izpostavljenosti večjim količinam pa se čebele ne morejo zadostno očistiti in se verjetno na ta način lahko tudi zadušijo. Z zamašitvijo dihalnih poti se lahko namreč posledično zmanjša sposobnost dela telesa, ki ga dihalni sistem oskrbuje s kisikom ali pa pride celo do smrti čebele (Gregorc, 2008).

Ob interpretaciji rezultatov je potrebno upoštevati, da so bili odmerki biotičnega sredstva v poskusu zelo veliki. Takšnim količinam so izpostavljene samo prve čebele, ki prečkajo razdelilnik. Takrat tudi opazimo nekaj čebel, ki ob izletu padejo na tla in nekatere med

njimi tudi umrejo, vendar pa smrt manjšega števila čebel za samo čebeljo družino ne predstavlja večje škode. Obe poskusni družini sta se med uporabo sredstva in tudi kasneje normalno razvijali in sta tudi uspešno prezimili. Uporaba sredstva je torej z vidika preživetja čebele družine, kljub izgubi manjšega števila delavk, po naših opazovanjih varna.

5.3 VEDENJE ČEBEL V RAZDELILNIKU IN PRED NJIM

Ugotovili smo, da ima biotično sredstvo Prestop Mix na vedenje čebel precej večji vpliv od pričakovanega in da se mu čebele poskušajo izogibati.

5.3.1 Vedenje pred razdelilnikom

Dodatek Prestopa Mix je sprožil zelo buren vedenjski odziv čebel, ki je bil izrazit zlasti prvo uro in prve dni uporabe sredstva. Čebele so hitro letale iz panja, ker so se najverjetneje sredstvu želele izogniti, pri tem pa so ga veliko razpihale iz razdelilnika. Nekatere čebele z veliko sredstva na sebi so popadale na tla, mogoče zato, ker so bile z njim preveč obtežene ali pa so se dušile oziroma zaradi zaprašenih oči niti niso videle, kam morajo leteti. Znano je, da čebele ob občutenju nevarnosti postanejo agresivne, kar se je izkazalo tudi v našem primeru. Prašek v razdelilniku je za čebele predstavljal nekaj neobičajnega in čebele so na to reagirale obrambno. Obrambno vedenje se je pokazalo tudi do vrstnic v panju, saj je prišlo do pretepov. Pogosto se čebele v panj niso vračale ali pa na izhodu niso zletele in so se vrnile nazaj v panj.

Nekatere izletele čebele, ki so imele na sebi nekaj sredstva, so se takoj vrnile na vhod. Celo, ko pri izletavanju ni bilo več belih čebel, je včasih na vhodu pristala kaka bela čebela. Takšna se je verjetno vrnila iz paše, možno pa je tudi, da je po izhodu iz panja padla na tla, po določenem času pa si je opomogla in se vrnila nazaj na vhod.

Smiselno bi bilo tudi snemanje na samem vhodnem delu razdelilnika, za kar pa bi potrebovali še tretjo kamero. Tako bi videli, kako pogosto se bele čebele s sredstvom vračajo v panj in ga s tem vanj vnašajo. Vnašajo ga tudi čebele, ki vstopajo na izhodu razdelilnika in tako prečkajo polje s sredstvom. Prenašanje biotičnega sredstva v panj je nezaželeno, saj spore glive *Gliocladium catenulatum* tako lahko zaidejo v med.

5.3.2 Vedenje čebel v razdelilniku

5.3.2.1 Pogostost posameznih vedenj v dneh brez in s Prestopom Mix

Prestop Mix je zelo vplival na vedenje čebel v razdelilniku. V dneh brez Prestopa Mix v razdelilniku je večina čebel razdelilnik direktno prehodila do izhoda. V dneh s Prestopom Mix pa je bilo videti, kot da se mu čebele želijo izogniti. Številne so ob stiku z njim izletele ali pa so ga že prej preskočile. Glede na to, da se je veliko čebel obračalo na hrbet, jim je verjetno na samem sredstvu drselo. Takoj po dodatku Prestopa Mix v razdelilnik smo

opazili nekaj čebel v pretepu. Sprememba vedenja je bila največja v prvi uri po dodatku Prestopa Mix v razdelilnik, nato pa se je počasi zmanjševala, verjetno zato, ker bilo v razdelilniku vedno manj sredstva. Le pogostost izleta iz razdelilnika je ostala povečana še več ur po dodatku pripravka.

Pričakovali bi, da se čebele, ki imajo na sebi več sredstva, tudi pogosteje čistijo. Rezultati tega niso potrdili, saj smo v skoraj vseh časih opazovanja (razen pri 120 min) večji delež čebel, ki se čistijo, opazili v dneh brez Prestopa Mix. Nižji delež čebel s čistilnim vedenjem v dneh s Prestopom Mix si razlagamo s tem, da so bile čebele na izhodu zaradi stika s sredstvom preveč vznemirjene, da bi se čistile.

5.3.2.2 Pogostost posameznih vedenj v dnevu brez in prvem dnevu s Prestopom Mix

Takoj ob dodatku Prestopa Mix v razdelilnik se je pogostost direktnega prehoda občutno zmanjšala, pogostost ostalih opazovanih vedenj pa povečala. Že po eni uri se je pogostost direktnega prehoda precej povečala. Pogostost obračanja na hrbet se je do 15 minut po dodatku sredstva povečevala, nato pa začela upadati. Pogostost pretepa je bila povečana samo takoj po dodatku pripravka, po eni uri pa razlik v primerjavi s kontrolnim dnem ni bilo več. Pri izletu iz razdelilnika in preskoku razdelilnika je bil trend drugačen. Pogostost teh dveh vedenj se je ob dodatku Prestopa Mix najprej povečala, nato zmanjšala, nato pa znova povečala. Obe vedenji kažeta na to, da se čebele sredstvu skušajo izogniti.

5.3.2.3 Dolgotrajnejša izpostavljenost čebel Prestopu Mix

Rezultati so pokazali, da je vpliv sredstva Prestop Mix na vedenje velik tudi ob večdnevni uporabi, kar kaže na to, da se čebele nanj ne navadijo in se mu skušajo izogniti. Pogostost nekaterih vedenj, kot sta preskok ali izlet iz območja s sredstvom, se je po daljši izpostavljenosti celo povečala, kar si razlagamo kot prilagoditev, ki omogoča izogibanje sredstvu.

Ker na vedenje vplivajo tudi drugi dejavniki, kot so dostopnost paše in vreme, vseh sprememb ne moremo pripisati samo vplivu Prestopa Mix. Vpliv vremena smo skušali zmanjšati s tem, da smo opazovali v čim bolj stabilnih in primerljivih vremenskih razmerah. Da so razlike vendarle bile, kažejo že razlike v vedenjih pred dodatkom sredstva v razdelilnik. Izstopa predvsem povečano izletavanje čebel iz razdelilnika 5. dan, čeprav sredstvo še ni bilo prisotno. Zakaj je do tega prišlo, ne znamo razložiti. Kljub temu menimo, da je večina ugotovljenih razlik posledica vpliva pripravka.

Pri interpretaciji in vrednotenju rezultatov vedenja je potrebno upoštevati, da poskusi niso potekali v času (vremenu), ko bi čebele običajno uporabili za zaščito jagod. Čeprav ločimo enkrat rodne jagode, ki cvetijo zgodaj spomladi in večkrat rodne jagode, pri katerih se cvetenje ponavlja preko poletja in jeseni, tako v Sloveniji kot v svetu še vedno prevladuje pridelovanje spomladanskih ali jesenskih jagod (Koron, 2005). Ker na dogajanje v

razdelilniku in pred njim verjetno vpliva tudi temperatura, je možno, da bi bil odziv čebel pomladi ob nižjih temperaturah nekoliko drugačen. Vpliv temperature na aktivnost čebel se je pokazal že v posameznih dneh opazovanja.

5.4 PRIPRAVA ČEBEL NA TRETIRANJE S PRESTOPOM MIX

Pred izvajanjem poskusov smo imeli kar nekaj težav s tretiranjem čebel z biotičnim sredstvom Prestop Mix. Prvotno smo imeli namen dodajati sredstvo v razdelilnik na panju in čebele med zapuščanjem panja naložiti v plastične tulce. Zaradi burne reakcije čebel na sredstvo smo se odločili, da bomo čebele tretirali v laboratoriju.

Po skušanju različnih metod (prehod skozi majhen razdelilnik, nanos s čopičem) smo se odločili za skupinsko tretiranje v tulcu. Tulce s čebelami smo vstavili v lonček s Prestopom (čebele so v stik z njim prišle preko mreže na dnu tulca) in ugotovili, da je ta metoda še najbolj podobna naravnim razmeram. Vse čebele so prišle v stik s sredstvom, kasneje pa so imele tudi čas, da so se očistile (kot se lahko očistijo preden odletijo iz panja, nekaj spor pa izgubijo tudi med letom). Na tak način so bile čebele izpostavljene razmeroma veliki količini sredstva, količini, ki je primerljiva s količino, ki jo dobijo prve čebele, ki prečkajo razdelilnik.

5.5 PREDLOGI IN MOŽNE IZBOLJŠAVE RAZDELILNIKA IN BIOTIČNEGA SREDSTVA

Med analizo zunanjih in notranjih posnetkov se je izkazalo, da razdelilnik na panju ni najbolj učinkovit. Čebele so namreč vstopale in izstopale tako na vhodu in izhodu in tako ni prišlo do popolne ločitve čebel, ki prenašajo biotično sredstvo na pašo in tistimi, ki se vračajo v panj, kar je ena od njegovih funkcij. Posledično je prihajalo do vnosa biotičnega sredstva v panj. Za izognitev takšnim problemom bi razdelilnik morali predelati tako, da bi uspešno ločeval čebele. Moral bi torej omogočati vstop v panj samo na vhodu razdelilnika in ne tudi na izhodu.

Opazili smo, da se je Prestop Mix v obliki praška preveč oprijemal čebel in da se je sredstvo, ki smo ga naenkrat dodali v razdelilnik, zelo hitro porabilo. Morda bi se situacija izboljšala že, če bi v razdelilnik vstavili podlago (»predpražnik«), v kateri bi se sredstvo bolje obdržalo. To bi lahko dosegli tudi, če bi sredstvo pokrili z drobno mrežico. Tako bi čebele pobrale manj sredstva in bi imele nemoten prehod do izhoda. Problem bi lahko rešili tudi z bolj kompaktno obliko samega praška. Prestop Mix bi bil lahko pripravljen v obliki tablic, ki bi se vstavljale v razdelilnik. Tako se sredstvo ne bi tako prašilo, posledično bi bilo tudi obstojnejše ter bi se manj in bolj enakomerno oprijemalo čebel.

6 SKLEPI

Na osnovi naših rezultatov sklepamo naslednje:

Biotično sredstvo Prestop Mix ne vpliva na odzivnost na pogojni dražljaj po enkratnem pogojevanju, poveča pa občutljivost čebel na saharozo;

Veliki odmerki Prestopa Mix povečajo smrtnost čebel tako ob kronični kot akutni izpostavljenosti;

Prestop Mix vpliva na vedenje čebel v razdelilniku in pred njim tudi po večdnevni izpostavljenosti. Čebele se mu skušajo izogibati;

S poskusi smo ugotavljali vpliv biotičnega sredstva kot celote in ne samo njegove aktivne sestavine glive *Gliocladium catenulatum*. Prestop Mix na smrtnost in vedenje najverjetneje vpliva zaradi neustrezne oblike samega pripravka, saj se preveč praši in oprijema čebel in ne zaradi delovanja glive same;

Potrebne so izboljšave razdelilnika in oblike biotičnega sredstva. Razdelilnik bi moral v večji meri ločiti čebele, sredstvo pa bi se moralo manj oprijemati čebel.

7 POVZETEK

V Evropi, ki velja za največjo pridelovalko jagod, je vse bolj razširjena ekološka pridelava, ki pa omejuje rabo fitofarmaceutskih sredstev. Med drugim jih uporabljajo za zatiranje sive plesni (*Botrytis cinerea*), ki predstavlja vzrok za velike izgube pridelka. Kot alternativa pesticidom se uporabljajo biotična sredstva, med katerimi prevladujejo glive. Takšno sredstvo je tudi Prestop Mix, ki vsebuje spore glive *Gliocladium catenulatum*.

Načini aplikacij biotičnih sredstev so različni. Pogosta je uporaba škropiv, kot prenašalce biotičnih sredstev na jagode pa lahko uporabimo tudi čebele. Sredstvo dodamo v razdelilnik nameščen na panj, čebele pa ga pri izhodu iz panja poberejo ter prenašajo na pašo. Kadar se odločimo za tak način aplikacije sredstev, je poleg varnosti za ljudi in okolje nujno zagotoviti tudi varnost za prenašalca. V tem magistrskem delu smo zato ugotavljali, če je biotično sredstvo Prestop Mix varno za prenašalko kranjsko čebelo (*Apis mellifera carnica*). Zanimal nas je vpliv na odzivnost na prehranske dražljaje, smrtnost in vedenje čebel. Poleg tega smo želeli ugotoviti, kakšna je učinkovitost razdelilnika, ob morebitnih pomanjkljivostih le-tega pa je bila naša naloga tudi predlagati izboljšave.

Vpliv na odzivnost na prehranske dražljaje smo preizkušali s klasičnim pogojevanjem refleksa iztegovanja jezička. Izpeljali smo samo prvo testiranje pri pogojevanju. Čebele smo imobilizirali in testirali njihovo občutljivost na saharozo. Kasneje smo jih izpostavili vonju eteričnega olja limone in jih nato nagradili s sladkorno raztopino. Po 1 in 12 min smo čebele zopet izpostavili vonju in preverili, če so se nanj odzvale. Čeprav so bile na saharozo bolj občutljive čebele s Prestopom Mix, pa pri odzivnosti na pogojni dražljaj po enkratnem pogojevanju razlik med kontrolno in tretirano skupino ni bilo.

Vpliv biotičnega sredstva na smrtnost smo testirali v kovinskih kletkah, ki smo jih postavili v inkubator na 34 °C. Posamezna serija je trajala štiri dni. Poleg kontrolne, smo imeli še akutno (sredstvu izpostavljena samo prvi dan) in kronično (sredstvu izpostavljena vsak dan) skupino. Prestop Mix je povečal smrtnost čebel. Prvi dan jih je v kontrolni skupini umrlo 2.5 %, v preostalih dveh pa približno 3-krat več. V nadaljevanju poskusa je bila smrtnost vedno najvišja v skupini, ki je bila sredstvu Prestop Mix izpostavljena kronično (do osemkrat večja kot pri kontroli), medtem ko razlike med akutno in kontrolno skupino niso bile več statistično značilne. Ob koncu poskusa je v kontrolni skupini skupno umrlo 6.5 %, v akutni 14 %, v kronični pa 26.5 % čebel. Čebele so bile izpostavljene velikim količinam sredstva, podobnim, kot jih prejmejo prve čebele, ki prečkajo razdelilnik.

Vpliv Prestopa Mix na vedenje čebel v razdelilniku in pred njim smo spremljali s pomočjo dveh kamer. Primerjali smo dneve brez in s Prestopom Mix. Opazovali smo šest ur dnevno, prva ura je bila vedno brez biotičnega sredstva. Vsako uro smo posneli vsaj pet enominutnih posnetkov v razdelilniku in dva petminutna posnetka pred njim. V dneh s Prestopom Mix smo enako število zunanjih in notranjih posnetkov naredili tudi 15 in 30 min po dodatku sredstva v razdelilnik. Prestop Mix je najbolj vplival na vedenje čebel

takoj po dodatku le-tega v razdelilnik. Panj so zapuščale povsem bele čebele, nekatere so popadale na tla. Prve pol ure se je pred panjem v zraku nabralo veliko čebel, ki v panj niso vstopale. Opazili smo nekaj čebel v pretepu. Pogosto so čebele (ki so se vračale iz paše in tudi tiste, ki so pravkar zapustile panj) pristajale na izhodu, nekatere so v panj vstopile, druge so odletele stran. V začetnih dneh poskusa so bile čebele tudi precej agresivne.

V razdelilniku so se čebele na različne načine izogibale prečkanju sredstva. Nekatere so po stiku s sredstvom iz razdelilnika izletele, druge so ga preskočile. Po dolgotrajnejši izpostavitvi sredstvu so se čebele na ti dve vedenji navadile in razdelilnika niso več zapuščale z direktnim prehodom. Mnogo čebel se je pri prehodu polja s sredstvom obrnilo na hrbet, opazili smo tudi nekaj pretepov. Vsa neobičajna vedenja so bila v največjih deležih prisotna predvsem v prvi uri po dodatku Prestopa Mix. V dneh s Prestopom Mix smo opazili manj čebel s čistilnim vedenjem kot v dneh brez Prestopa. Opazili smo še nekaj drugih, a manj pogostih vedenj. Čebele so hodile po stenah razdelilnika, odstranjevale mrtve čebele, dalj časa hodile po razdelilniku, se obračale nazaj proti panju, lezle čez druge čebele. Med nekaterimi čebelami je ob čelnem srečanju prišlo tudi do stika z antenami, ki se je včasih končal z medsebojno izmenjavo hrane.

Ugotovili smo, da razdelilnik čebel, ki zapuščajo panj in tistih, ki se vanj vračajo, ne loči povsem. Nekatere čebele so vstopale na izhodu in posledično biotično sredstvo vnašale v panj. Za nadaljnjo uporabo priporočamo predelavo razdelilnika tako, da bo čebelam vstop na izhodu onemogočen. S tem bi zagotovili boljši izkoristek sredstva, saj ga čebele ne bi mogle vnašati nazaj v panj, v stik s sredstvom pa bi prišle le tiste, ki panj zapuščajo, čemur je razdelilnik tudi namenjen.

Poleg izboljšav razdelilnika predlagamo tudi spremembe fizikalnih lastnosti biotičnega sredstva ali njegove aplikacije. Prestop Mix v obliki praška se je namreč zelo oprijemal čebel, se prašil, čebele pa so ga iz razdelilnika tudi zelo hitro razpihale. Za daljšo obstojnost sredstva v razdelilniku bi vanj lahko vstavili podlago, v kateri bi se sredstvo dlje obdržalo. Lahko bi uporabili tudi mrežico, pod katero bi dodajali biotično sredstvo. V obeh primerih bi verjetno zmanjšali tudi prašenje. Pretirano prašenje in daljšo obstojnost sredstva bi lahko dosegli tudi z uporabo kompaktnejše oblike samega sredstva.

Domnevamo, da je pokazan vpliv Prestopa Mix na smrtnost in vedenje čebel predvsem posledica fizikalnih lastnosti pripravka Prestop Mix, zaradi česar se zelo oprijema čebel in ne posledica vpliva glive *Gliocladium catenulatum*. Menimo, da kljub vplivu na vedenje in smrti nekaj osebkov po aplikaciji sredstva v razdelilnik, uporaba Prestopa Mix ne vpliva na preživetje čebelje družine. Z izboljšanjem lastnosti pripravka in razdelilnika vpliv lahko še zmanjšamo.

8 VIRI

- Abramson C.I., Aquino I.S., Silva M.C., Price J.M. 1997. Learning in the Africanized Honey Bee: *Apis mellifera* L. *Physiology & Behavior*, 62, 3: 657-674
- Albano S., Chagnon M., de Oliveira D., Houle E., Thibodeau P.O., Mexia A. 2009. Effectiveness of *Apis mellifera* and *Bombus impatiens* as dispersers 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., Kevan P.G., Shipp L. 2007. Development of *Beauveria bassiana* dry formulation for vectoring by honey bees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) to the flowers of crops for pest control. *Biocontrol Science and Technology*, 17, 7: 711-741
- Ament S.A., Wang Y., Robinson G.E. 2010. Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *WIREs systems Biology and Medicine*, 2, 5: 566-576
- Auguštin V. 2008. Zastrupitev čebel. V: Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje 1. Zdešar P. (ur.). Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 226-236
- Auguštin V. 2010. Vplivi podnebnih sprememb na čebelarstvo. *Slovenski čebelar*, 112, 3: 78-79
- Bevk D. 2012. Vpliv akaricida kumafosa na pašno dejavnost, socialno vedenje in učenje medonosne čebele *Apis mellifera* L. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 83 str.
- 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, 6: 607-617
- Bitterman M.E., Menzel R., Fietz A., Schäfer S. 1983. Classical Conditioning of Proboscis Extension in Honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, 97, 2: 107-119
- Blanco C., de los Santos B., Romero F. 2006. Relationship between concentrations of *Botrytis cinerea* conidia in air, environmental conditions, and the incidence of grey mould in strawberry flowers and fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 415-425
- Bortolotti L., Montanari R., Marcelino J., Medrzycki P., Maini S., Porrini C. 2003. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*, 56, 1: 63-67
- Božič J. 2008. Življenje čebel. V: Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje 1. Zdešar P. (ur.). Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 112-136

- Brvar J. 2008. Vzreja matic za lastno uporabo. V: Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje 1. Zdešar P. (ur.). Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 301-308
- Butler C.G., Free J.B. 1952. The Behaviour of Worker Honeybees at the Hive Entrance. Behaviour, 4, 4: 262-292
- Campbell J., Mummert L., Sukthanar R. 2008. Video Monitoring of Honey Bee Colonies at the Hive Entrance. Pittsburgh, ICPR Workshop on Visual Observation and Analysis of Animal and Insect Behavior: 4 str.
http://homepages.inf.ed.ac.uk/rbf/VAIB08PAPERS/vaib9_mummert.pdf (9. jan. 2013)
- Card S.D., Pearson M.N., Clover G.R.G. 2007. Plant pathogens transmitted by pollen. Australasian Plant Pathology, 36, 5: 455-461
- Cluzeau S. 2002. Risk assessment of plant protection products on honey bees: regulatory aspects. V: Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. Devillers J., Pham-Delègue M.H. (eds.). London, Taylor & Francis: 42-55
- Corbet S.A. 2003. Nectar sugar content: estimating standing crop and secretion rate in the field. Apidologie, 34: 1-10
- CORE organic II Call 2010. 2010. International Centre for Research in Organic Food Systems: 15 str.
- Cornish D.A., Voyle M.D., Haine H.M., Goodwin R.M., Vanneste J.L. 1998. Distribution of beneficial bacteria on nashi and apple flowers using honey bees. Proceedings 51st New Zealand Plant Protection Conference: 5 str.
http://www.nzpps.org/journal/51/nzpp_511070.pdf (4. feb. 2013)
- Cota L.V., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G., Macedo P.E.F., Antunes R.F. 2008. Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions. Biological Control, 46: 515-522
- 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
- Čebelarski terminološki slovar. 2008. Bokál L. (ur.). Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije; Ljubljana, Založba ZRC, ZRC SAZU: 261 str.
- Dainat B., Evans J.D., Chen Y.P., Gauthier L., Neumann P. 2012. Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. PLoS ONE, 7, 2: 1-9
- Decourtye A., Pham-Delègue M.H. 2002. The proboscis extension response: assessing the sublethal effects of pesticides on the honey bee. V: Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. Devillers J., Pham-Delègue M.H. (eds.). London, Taylor & Francis: 67-84

- Decourtye A., Devillers J., Cluzeau S., Charreton M., Pham-Delègue M.H. 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 410-419
- Decourtye A., Devillers J., Genecque E., Le Menach K., Budzinski H., Cluzeau S., Pham-Delègue M.H. 2005. Comparative Sublethal Toxicity of Nine Pesticides on Olfactory Learning Performances of the Honeybee *Apis mellifera*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 242-250
- 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
- Desneux N., Decourtye A., Delpuech J.M. 2007. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52: 81-106
- Devillers J. 2002. The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. V: Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. Devillers J., Pham-Delègue M.H. (eds.). London, Taylor & Francis: 1-11
- Devillers J., Doré J.C., Tisseur M., Cluzeau S., Maurin G. 2004. Modelling the flight activity of *Apis mellifera* at the hive entrance. *Computers and Electronics in Agriculture*, 42: 87-109
- Dommez M.F., Esitken A., Yildiz H., Ercisli S. 2011. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 12, 4: 758-763
- Ellis J.D., Evans J.D., Pettis J. 2010. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *Journal of Apicultural Research*, 49, 1: 134-136
- Essghaier B., Fardeau M.L., Cayol J.L., Hajlaoui M.R., Boudabous A., Jijakli H., Sadfi-Zouaoui N. 2009. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 833-846
- Evans J.D., Schwarz R.S. 2011. Bees brought to their knees: microbes affecting honey bee health. *Trends in Microbiology*, 19, 12: 614-620
- Farooqui T. 2013. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: A unique hypothesis. *Neurochemistry International*, 62: 122-136

- FITO-INFO: Slovenski informacijski sistem za varstvo rastlin. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo in okolje, Biotehniška fakulteta in Fitosanitarna uprava RS.
<http://www.fito-info.si/index.asp?ID=FFS/index.asp> (15. dec. 2012)
- Genersch E., von der Ohe W., Kaatz H., Schroeder A., Otten C., Büchler R., Berg S., Ritter W., Mühlen W., Gisder S., Meixner M., Liebig G., Rosenkranz P. 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie*, 41: 332-352
- Gilliam M., Taber S., Richardson G.V. 1983. Hygienic behavior of honey bees in relation to chalkbrood disease. *Apidologie*, 14, 1: 29-39
- Girolami V., Mazzon L., Squartini A., Mori N., Marzaro M., Di Bernardo A., Greatti M., Giorio C., Tapparo A. 2009. Translocation of Neonicotinoid Insecticides From Coated Seeds to Seedling Guttation Drops: A Novel Way of Intoxication for Bees. *Journal of Economic Entomology*, 102, 5: 1808-1815
- Gregorc A. 2002. Medonosna čebela in osnove čebelarjenja: učbenik za veterinarje. Ljubljana, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani: 125 str.
- Gregorc A. 2008. Bolezni čebel. V: Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje 1. Zdešar P. (ur.). Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 143-225
- Gregorc A. 2008. Anatomija in fiziologija čebele. V: Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje 1. Zdešar P. (ur.). Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 37-101
- Gregori J., Poklukar J., Mihelič J. 2003. Kranjska čebela v Sloveniji. Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 47 str.
- Gregori J. 2008. Sistematska uvrstitev čebel. V: Slovensko čebelarstvo v tretje tisočletje 1. Zdešar P. (ur.). Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije: 14-23
- Guez D., Suchail S., Gauthier M., Maleszka R., Belzunces L.P. 2001. Contrasting Effects of Imidacloprid on Habituation in 7- and 8-Day-Old Honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 76: 183-191
- Guez D., Belzunces L.P., Maleszka R. 2003. Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 75: 217-222
- Guzmán-Novoa E., Eccles L., Calvete Y., McGovan J., Kelly P.G., Correa-Benítez A. 2010. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidologie*, 41: 443-450

- Henry M., Béguin M., Requier F., Rollin O., Odoux J.F., Aupinel P., Aptel J., Tchamitchian S., Decourtye A. 2012. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science*, 336: 348-350
- Hokannen H.M.T., Menzler-Hokkanen I. 2007. Use of honeybees in the biological control of plant diseases. *Entomological Research*, 37: A62-A63
- Hopwood J., Vaughan M., Shepherd M., Biddinger D., Mader E., Hoffman Black S., Mazzacano C. 2012. Are neonicotinoids killing bees? A Review of Research into the Effects of Neonicotinoid Insecticides on Bees, with Recommendations for Action. The Xcerses Society for Invertebrate Conservation: 32 str.
<http://ento.psu.edu/publications/are-neonicotinoids-killing-bees> (25. jan 2013)
- Huang Z.Y., Robinson G.E. 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 39: 147-158
- Jensen B., Knudsen I.M.B., Andersen B., Nielsen K.F., Thrane U., Jensen D.F., Larsen J. 2013. Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. *Interanatioinal Journal of Food Microbiology*, 160: 313-322
- Johnson K.B., Stockwell V.O., McLaughlin R.J., Sugar D., Loper J.E., Roberts R.G. 1993. Effect of Antagonistic Bacteria on Establishment of Honey Bee-Dispersed *Erwinia amylovora* in Pear Blossoms and on Fire Blight Control. *Phytopathology*, 83, 9: 995-1002
- Johnson R.M., Ellis M.D., Mullin C.A., Frazier M. 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, 41: 312-331
- 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., Sutton J.C. 2008. Co-vectoring of *Bauveria bassiana* and *Clonostachys rosea* by bumble bees (*Bombus impatiens*) for control of insect pests and supression of grey mould in greenhouse tomato and sweet pepper. *Biological Control*, 46: 508-514
- Koron D. 2005. Sadne vrste in sorte. Jagoda. V: Sadjarstvo. Slekovec A. (ur.). Ljubljana, ČŽD Kmečki glas: 288-293
- Kovach J., Petzoldt R., Harman G.E. 2000. Use of Honey Bees and Bumble Bees to Disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to Strawberries for *Botrytis* Control. *Biological Control*, 18: 235-242

- Kralj J., Brockmann A., Fuchs S., Tautz J. 2006. The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L. *Journal of Comparative Physiology A*, 193: 363-370
- Krupke C.H., Hunt G.J., Eitzer B.D., Andino G., Given K. 2012. Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. *PLoS ONE*: 7, 1: 1-8
- Kubik M., Nowacki J., Pidek A., Warakomska Z., Michalczyk L., Goszczyński W. 1999. Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. *Apidologie*, 30: 521-532
- Laloi D., Bailez O., Blight M.M., Roger B., Pham-Delègue M.H., Wadhams L.J. 2000. Recognition of complex odors by restrained and free-flying honeybees, *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 10: 2307-2319
- Laurino D., Porporato M., Patetta A., Manino A. 2011. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 64, 1: 107-113
- Legard D.E., Xiao C.L., Mertely J.C., Chandler C.K. 2001. Management of Botrytis Fruit Rot in Annual Winter Strawberry Using Captam, Thiram, and Iprodione. *Plant Disease*, 85: 31-39
- Legard D.E., MacKenzie S.J., Mertely J.C., Chandler C.K., Peres N.A. 2005. Development of a Reduced Use Fungicide Program for Control of Botrytis Fruit Rot on Annual Winter Strawberry. *Plant Disease*, 89: 1353-1358
- Lešnik M. 2005. Varstvo sadnih rastlin pred boleznimi in škodljivci. Varstvo jagod. V: Sadjarstvo. Slekovc A. (ur.). Ljubljana, ČŽD Kmečki glas: 383-388
- Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*, 10: 169-178
- MacKenzie K.E., Winston M.L. 1989. The effects of sublethal exposure to diazinon, carbaryl and resmethrin on longevity and foraging in *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 20: 29-40
- Maček J., Kač M. 1990. Kemična sredstva za varstvo rastlin. 2. izd. Ljubljana, Kmečki glas: 500 str.
- Mauelshagen J., Greggers U. 1993. Experimental access to associative learning in honeybees. *Apidologie*, 24: 249-266
- Menzel R. 1993. Associative learning in honey bees. *Apidologie*, 24: 157-168

- Menzel R., Müller U. 1996. Learning and memory in honeybees: From Behavior to Neural Substrates. *Annual Review of Neuroscience*, 19: 379-404
- Menzel R. 1999. Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 185: 323-340
- Menzel R., Giurfa M. 2001. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends in Cognitive Sciences*, 5, 2: 62-71
- Mommaerts V., Smagghe G. 2011. Entomovectoring in plant protection. *Athropod-Plant Interactions*, 5: 81-95
- Naug D. 2009. Nutritional stress due to habitat loss may explain recent honeybee colony collapses. *Biological Conservation*, 142: 2369-2372
- Neumann P., Carreck N.L. 2010. Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49, 1: 1-6
- Orr D. 2009. Biological Control and Integrated Pest Management. V: Integrated Pest Management: Volume 1: Innovation-Development Process. Peshin R., Dhavan A.K. (eds.). Springer Science+Business Media: 207-239
- Paavanen-Huhtala S., Avikainen H., Yli-Matilla T. 2000. Development of strain-specific primers for a strain of *Gliocladium catenulatum* used in biological control. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 187-198
- Page R.E., Erber J., Fondrk M.K. 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 182: 489-500
- Page R.E., Fondrk M.K., Hunt G.J., Guzmán-Novoa E., Humphries M.A., Nguyen K., Greene A.S. 2000. Genetic Dissection of Honeybee (*Apis mellifera* L.) Foraging Behavior. *The American Genetic Association*, 91: 474-479
- Peng G., Sutton J.C., Kevan P.G. 1992. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 14, 2: 117-188
- Pesticide Safety Fact Sheet. Toxicity of pesticides. 2006. Pennsylvania, The Pennsylvania State University: 15 str.
<http://pubs.cas.psu.edu/freepubs/pdfs/uo222.pdf> (28. jan. 2013)
- Pham-Delègue M.H., Decourtye A., Kaiser L., Devillers J. 2002. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. *Apidologie*, 33: 425-432
- Poročilo o rezultatih laboratorijskih analiz pomorov čebel. 2008. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano RS: 13 str.

- 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
- Rademacher E., Harz M. 2006. Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies - a review. *Apidologie*, 37: 98-120
- Ramirez-Romero R., Chaufaux J., Pham-Delègue M.H. 2005. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. *Apidologie*, 36: 601-611
- Rejski program za kranjsko čebelo (2011-2015) (*Apis mellifera carnica*, Pollman 1879). 2010. Lukovica, Čebelarska zveza Slovenije, Kmetijski inštitut Slovenije: 48 str.
- Robinson-Boyer L., Jeger M.J., Xu X.M., Jeffries P. 2009. Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action. *Biocontrol Science and Technology*, 19, 10: 1051-1065
- Rortais A., Arnold G., Halm M.P., Touffet-Briens F. 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36: 71-83
- Scheiner R., Erber J., Page Jr R.E. 1999. Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, 185: 1-10
- Scheiner R., Page Jr. R.E., Erber J. 2001. Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains. *Behavioural Brain Research*, 120: 67-73
- Scheiner R., Barnett M., Erber J. 2003. Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bees. *Apidologie*, 34: 67-72
- Scheiner R., Page R.E., Erber J. 2004. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 35: 133-142
- Schulz D.J., Huang Z.Y., Robinson G.E. 1998. Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42: 295-303
- Schulz D.J., Sullivan J.P., Robinson G.E. 2002. Juvenile Hormone and Octopamine in the Regulation of Division of Labor in Honey Bee Colonies. *Hormones and Behavior*, 42: 222-231

- Shafir S., Dag A., Bilu A., Abu-Toamy M., Blad Y. 2006. Honey bee dispersal of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* T39: effectiveness in suppressing *Botrytis cinerea* on strawberry under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 119-128
- Spivak M. 1996. Honey bee hygienic behavior and defense against *Varroa jacobsoni*. *Apidologie*, 27: 245-260
- Stabentheiner A., Kovac H., Schmaranzer S. 2002. Honeybee nestmate recognition: the thermal behaviour of guards and their examinees. *The Journal of Experimental Biology*, 205: 2637-2642
- Struye M.H., Mortier H.J., Arnold G., Miniggio C., Borneck R. 1994. Microprocessor-controlled monitoring of honeybee flight activity at the hive entrance. *Apidologie*, 25: 384-395
- Sullivan J.P., Jassim O., Fahrbach S.E., Robinson G.E. 2000. Juvenile Hormone Paces Behavioral Development in the Adult Worker Honey Bee. *Hormones and Behavior*, 37: 1-14
- Sundh I., Goettel M.S. 2012. Regulating biocontrol agents: a historical perspective and a critical examination comparing microbial and macrobial agents. *BioControl*: 1-19
- Sutton J.C., Peng G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry Leaves. *Phytopathology*, 83, 6: 615-621
- Štampar F., Lešnik M., Veberič R., Solar A., Koron D., Usenik V., Hudina M., Osterc G. 2005. *Sadjarstvo*. Ljubljana, Kmečki glas: 416 str.
- Tautz J. 2010. *Čudežni svet čebel*. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 287 str.
- Thomas M.B., Willis A.J. 1998. Biocontrol – risky but necessary? *Trends in Ecology and Evolution*, 13, 8: 325-328
- Thompson H.M., Maus C. 2007. The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. *Pest Management Science*, 63, 11: 1058-1061
- 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

- Vandenberg J.D., Shimanuki H., 1990. Effect of amitraz treatments on honey bees and on the honey bee tracheal mite. *Apidologie*, 21: 243-247
- von Frisch K. 1973. Decoding the language of the bee. Munich, Nobel Lecture: 12 str.
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1973/frisch-lecture.pdf (31. jan 2013)
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8, 5: 561-580
- Yang E.C., Chuang Y.C., Chen Y.L., Chang L.H. 2008. Abnormal Foraging Behavior Induced by Sublethal Dosage of Imidacloprid in the Honey Bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 101, 6: 1734-1748
- Yang E.C., Wu P.S., Chang H.C., Chen Y.W. 2010. Effect of sub-lethal dosages of insecticides on honeybee behavior and physiology. Taiwan, National Taiwan University, National I-Lan University: 12 str.
http://www.niaes.affrc.go.jp/sinfo/sympo/h22/1109/paper_06.pdf (22. jan. 2013)
- Yi W., Law S.E., Wetzstein H.Y. 2003. Fungicide Sprays Can Injure the Stigmatic Surface During Receptivity in Almond Flowers. *Annals of Botany*, 91: 335-341
- 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
- Zhang H., Wang L., Dong Y., Jiang S., Cao J., Meng R. 2007. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biological Control*, 40: 287-292
- Zhang H., Yang Q., Lin H., Ren X., Zhao L., Hou J. 2012. Phytic acid enhances efficacy of *Rhodotorula mucilaginosa* against postharvet gray mold spoilage and natural spoilage of strawberries. *LWT – Food Science and Technology*, 52, 2: 110-115

ZAHVALA

Hvala dr. Jasni Kralj, ki me je bila pripravljena sprejeti pod svoje mentorstvo...

Hvala prof. dr. Andreju Čoklu, ki je prevzel njeno vlogo. Hvala tudi za hiter pregled magistrske naloge.

Iskrena hvala somentorju dr. Danilu Bevku, ki me je vpeljal v raziskovalno delo s čebelami. Hvala za vso pomoč, nasvete, odgovore na nešteta vprašanja, popravke in preglede... Takega somentorja si lahko vsak samo želi!

Hvala sodelavcem oddelka za entomologijo, ki so me v času opravljanja praktičnega dela magistrske naloge prijazno sprejeli medse.

Recenzentu prof. dr. Janku Božiču se zahvaljujem za pregled magistrske naloge, nasvete in popravke. Za hiter pregled hvala tudi predsedniku komisije doc. dr. Rudiju Verovniku.

Hvala dr. Mimi Urbanc, ki je poskrbela za pregled izvlečkov.

Hvala fantu in vsem domačim za podporo in spodbudo v celotnem času študija ter razumevanje tudi v trenutkih, ko ni šlo vse po planih. Hvala vam, ker verjamete vame!

Na koncu se za vso pomoč tekom študija in popestritev številnih ur v predavalnicah, vajalnicah in na terenu zahvaljujem tudi kolegom ekologom. Hvala vam za nepozabna študentska leta!