

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Karmen BENCIK

**IZBIRA SLADKOSTI PAŠE  
PRI KRANJSKI ČEBELI (*Apis mellifera carnica* Poll.)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE CHOICE OF FOOD SWEETNESS  
IN THE CARNIOLAN HONEYBEE (*Apis mellifera carnica* Poll.)**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za nevroetologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani na poskusnih čebelah iz panjev v bližini Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Analize raztopin saharoze so bile opravljene v laboratoriju Čebelarske zveze Slovenije.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Janka Božiča.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rudi Verovnik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Janko Božič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tine Valentinčič  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Karmen BENCIK

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 591.5: 595.799 (043.2) = 863
KG	medonosna čebela/pašno vedenje/mana/umetno krmišče/HPLC
AV	BENCIK, Karmen
SA	BOŽIČ, Janko (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2007
IN	IZBIRA SLADKOSTI PAŠE PRI KRANJSKI ČEBELI ( <i>Apis mellifera carnica</i> Poll.)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 58 str., 6 pregl., 17 sl., 3 pril., 42 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Pašne čebele v naravi izbirajo sladkost tekočine, ki jo zaužijejo. Na manini paši pijejo kapljice, ki vsebujejo različne koncentracije saharoze in drugih sladkorjev. Raziskovali smo vpliv sladkosti saharoznih kapljic na pašno vedenje čebel. Čebele smo hranili na umetnem krmišču v komori velikosti 40x30x30 cm. Nadzorovali smo čas trajanja poskusa, temperaturo in relativno zračno vlago. Pašno aktivnost čebel smo snemali z video kamero Sharp C670 in programom FDS Imaging Software (FDS Research, Slovenija). Čebelam smo ponudili 4 µL kapljice dveh različnih koncentracij raztopine saharoze, ki so bile naključno razporejene na stekleni plošči. Čebele so raje pile kapljice z višjo koncentracijo saharoze, izbirale so kapljice 1 M saharoze pred kapljicami 0,5 M saharoze (n=34) oziroma kapljice 1,5 M saharoze pred kapljicami 0,5 M saharoze (n=33). Če je bila absolutna razlika med obema koncentracijama saharoze v poskusu večja, je bila preferenca bolj izrazita. HPLC analiza vzorcev kapljic na poskusnih ploščah je pokazala naraščanje koncentracije saharoze zaradi izhlapevanja vode med poskusom. Hitrost naraščanja koncentracije saharoze je bila odvisna od temperature in relativne zračne vlage v komori med poskusom. Koncentracija saharoze v kapljicah z višjo vsebnostjo saharoze je naraščala hitreje kot koncentracija saharoze v kapljicah z nižjo vsebnostjo saharoze.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 591.5: 595.799 (043.2) = 863
- CX honeybee/foraging behaviour/honeydew/artificial feeding place/HPLC
- AU BENCIK, Karmen
- AA BOŽIČ, Janko (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2007
- TI THE CHOICE OF FOOD SWEETNESS IN THE CARNIOLAN HONEYBEE  
(*Apis mellifera carnica* Poll.)
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO IX, 58 p., 6 tab., 17 fig., 3 ann., 42 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In nature honeybee foragers select the sweetness of liquid food they consume. Honeybees forage on honeydew droplets which contain different concentrations of sucrose and other sugars. We investigated the effect of sweetness of sucrose droplets on the foraging behaviour of honeybees. Experiments were conducted using an artificial feeding place in a 40x30x30 cm chamber with controlled temperature and relative air humidity. The feeding activity of honeybees was video recorded with Sharp C670 and FDS Imaging Software (FDS Research, Slovenija). The bees were offered 4 µL sucrose water solution droplets of two concentrations, randomly positioned on a glass plate. Honeybees were preferentially choosing droplets containing 1 M sucrose rather than 0.5 M sucrose (n=34) and 1.5 M sucrose rather than 0.5 M sucrose (n=33). The preference was greater if the difference between sugar solution sweetness was larger. HPLC analysis of samples from droplets revealed a significant increase in sucrose concentrations as a consequence of evaporation of water from the droplets during the experiments. The rate of concentration increase was temperature and relative air humidity dependent. The concentration of solutions with higher contents of sucrose increased at a higher velocity than concentration of solutions with lower contents of sucrose.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV TEME	1
1.2 PREGLED OBJAV	2
<b>1.2.1 Manina paša</b>	<b>2</b>
<b>1.2.2 Pašna aktivnost čebel</b>	<b>3</b>
<b>1.2.3 Zaznavanje sladkih raztopin pri čebelah</b>	<b>4</b>
<b>1.2.4 Razlikovanje med sladkimi raztopinami različnih koncentracij v poskusih z izbiro</b>	<b>5</b>
<b>2 NAMEN RAZISKAVE IN HIPOTEZA</b>	<b>8</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>9</b>
3.1 OPIS POSKUSA	9
3.2 PRIPRAVA POSKUSA	10
<b>3.2.1 Krmilnik za čebele</b>	<b>10</b>
<b>3.2.2 Privajanje čebel na umetno krmišče</b>	<b>10</b>
<b>3.2.3 Priprava raztopin</b>	<b>11</b>
<b>3.2.4 Postavitev komore za izvedbo poskusov</b>	<b>12</b>
<b>3.2.5 Privajanje čebel na hranjenje v poskusni komori</b>	<b>14</b>
<b>3.2.6 Priprava steklenih plošč s kapljicami raztopine saharoze</b>	<b>15</b>
3.3 IZVEDBA POSKUSA	16
3.4 HPLC ANALIZA	18
3.5 PAŠNI IN VREMENSKI POGOJI V ČASU IZVEDBE POSKUSA	20
3.6 ZBIRANJE IN OBDELAVA PODATKOV	22

<b>3.6.1</b>	<b>Zbiranje podatkov</b>	22
<b>3.6.2</b>	<b>Obdelava podatkov</b>	22
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	24
4.1	POSKUSI S KAPLJICAMI RAZTOPINE SAHAROZE DVEH RAZLIČNIH MOLARNOSTI	24
<b>4.1.1</b>	<b>Poskusi s kapljicami 0,5 M in 1 M raztopine saharoze</b>	25
<b>4.1.2</b>	<b>Poskusi s kapljicami 1 M in 1,5 M raztopine saharoze</b>	28
<b>4.1.3</b>	<b>Poskusi s kapljicami 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze</b>	31
<b>4.1.4</b>	<b>Primerjava popitih kapljic med poskusnimi skupinami</b>	34
4.2	KONTROLNI POSKUSI	36
<b>4.2.1</b>	<b>Kontrolni poskus s kapljicami vode in 0,5 M raztopine saharoze</b>	36
<b>4.2.2</b>	<b>Kontrolni poskusi s kapljicami raztopine saharoze enake molarnosti</b>	38
4.3	HPLC ANALIZA VZORCEV RAZTOPIN SAHAROZE	40
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	45
5.1	RAZPRAVA	45
5.2	UPORABNOST METODE ZA NADALJNE RAZISKAVE	51
5.3	SKLEPI	52
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	53
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b>	55
7.1	CITIRANI VIRI	55
7.2	DRUGI VIRI	58
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Pogoji HPLC analize.	19
Preglednica 2: Rezultati Fisherjevega testa za čebele, ki so izbirale med kapljicami 0,5 M in 1 M raztopine saharoze.	25
Preglednica 3: Rezultati Fisherjevega testa za čebele, ki so izbirale med kapljicami 1 M in 1,5 M raztopine saharoze.	29
Preglednica 4: Rezultati Fisherjevega testa za čebele, ki so izbirale med kapljicami 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze.	33
Preglednica 5: Rezultati Fisherjevega testa za čebele, ki so izbirale med kapljicami vode in kapljicami 0,5 M raztopine saharoze.	36
Preglednica 6: Mediana, prvi in tretji kvartil popitih in zavrženih kapljic čebel, ki so izbirale med kapljicami vode in kapljicami 0,5 M raztopine saharoze.	37

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Shematski prikaz postavitve komore z osvetlitvijo in video kamero; pogled iz bočne strani.	13
Slika 2: Shematski prikaz postavitve komore z osvetlitvijo in video kamero; pogled iz zadnje strani.	13
Slika 3: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 28.	26
Slika 4: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 27.	27
Slika 5: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 18.	28
Slika 6: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 36.	30
Slika 7: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 47.	31
Slika 8: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 78.	32
Slika 9: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 74.	32
Slika 10: Vretenast diagram števila popitih kapljic raztopine saharoze nižje in višje molarosti v vseh treh poskusnih skupinah.	34
Slika 11: Stolpični graf mediane in interkvartilnega razmika vseh popitih kapljic v treh poskusnih skupinah čebel.	35
Slika 12: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 106.	37
Slika 13: Stolpični graf mediane in interkvartilnega razmika vseh popitih kapljic v treh kontrolnih skupinah čebel.	38
Slika 14: Masa saharoze v HPLC vzorcih iz kontrolnih poskusov.	41
Slika 15: Masa saharoze v HPLC vzorcih iz poskusa s čebelo 8 (t=2:36, T=29°C, RZV=57%) in čebelo 29 (t=4:46, T=29°C, RZV=58%).	42
Slika 16: Masa saharoze v HPLC vzorcih iz poskusa s čebelo 60 (t=2:29, T=28°C, RZV=49%) in čebelo 38 (t=5:21, T=29°C, RZV=37%).	43
Slika 17: Masa saharoze v HPLC vzorcih iz poskusa s čebelo 71 (t=3:59, T=26°C, RZV=61%) in čebelo 76 (t=6:10, T=27°C, RZV=63%).	44



## KAZALO PRILOG

Priloga A: Zbrani podatki iz poskusov s čebelami

Priloga B: Zaporedja popitih in zavrnjenih kapljic raztopin saharoze v poskusih s  
posameznimi čebelami

Priloga C: Rezultati HPLC analize raztopin saharoze

## 1 UVOD

### 1.1 OPREDELITEV TEME

Kranjska čebela (*Apis mellifera carnica* Poll.) je ena izmed štiriindvajsetih pasem medonosne čebele (*Apis mellifera* L.) (Stark, 1998). Medonosne čebele so socialne žuželke, ki živijo v skupnosti imenovani čebelja družina. Čebele delavke v začetnih fazah življenja opravljajo razna dela v panju, v zadnji fazi življenja pa preidejo na pašno vedenje (Winston, 1987).

Pašne čebele nabirajo sladke tekočine, cvetni prah in vodo ter s tem zadovoljujejo potrebe celotne družine po hrani. Glavna vira sladkih tekočin sta medičina ali nektar (nektarna paša) in manine kapljice (manina paša). Nektar čebele nabirajo iz medovnikov cvetnic, ki opraševalce privabljajo tudi z različnimi barvami in oblikami cvetov ter z vonji. Manine kapljice pa so izločki žuželk, ki se prehranjujejo z rastlinskimi sokovi dreves. Izločke teh žuželk čebele nabirajo na iglicah in listih dreves ter na podrasti pod drevesi.

Na manini paši čebele nabirajo kapljice sladkih raztopin, ki so precej različnih koncentracij. Koncentracija sladkorjev v maninih kapljicah je eden od možnih vzrokov za spremembe v pašni aktivnosti čebel. Ugotovljeno je bilo, da so v vsebini mednih želodčkov pašnih čebel višje koncentracije sladkorjev kot v kapljicah mane iz iste paše, kar lahko v največji meri pripišemo nabiranju bolj izsušenih kapljic (Poklukar in sod., 1997). Podobno kot na manini paši so čebele v poskusih pile posamezne kapljice, razporejene na plošči. Za boljše razumevanje dogajanja na manini paši smo v diplomskem delu raziskovali vpliv prisotnosti sladkornih raztopin dveh različnih koncentracij na vedenje pašnih čebel. Zanimalo nas je, kakšne so preference čebel za različne koncentracije raztopin sladkorjev in na kakšen način se kažejo te preference. Zanimalo nas je tudi vedenje čebel, ki se prvič srečajo z dvema različnima koncentracijama sladkih raztopin na paši. Različne koncentracije sladkorjev v maninih kapljicah so posledica različno koncentriranih izločkov proizvajalcev mane, kot tudi izhlapevanja vode iz kapljic. Zanimalo nas je, v kakšni meri se je v naših poskusih spreminjala koncentracija kapljic zaradi izhlapevanja in kako to vpliva na čebeljo izbiro.

## 1.2 PREGLED OBJAV

### 1.2.1 Manina paša

Mana so sladki izločki listnih uši, kaparjev in škržatov, ki spadajo med kljunate žuželke (*Hemipteroidea*, *Rhynchota*). Proizvajalci mane imajo grajen ustni aparat za sesanje. S kljuncem prodrejo do sitastih cev, po katerih se pretakajo rastlinski sokovi, ki jih pri iglavcih najdemo tik pod lubjem. Pri listavcih so te cevke na spodnji strani listov, kjer ponavadi najdemo ušice (Rihar, 2003).

Zaradi velikega pritiska turgorja, ki potiska rastlinske sokove v prebavilo prisesane žuželke, se pretaka skozi znatno več snovi, kot jih potrebuje za svoje preživetje (Rihar, 2003). Rastlinski sok, ki se pretaka po sitastih ceveh, vsebuje 10 do 30% suhe snovi. Prevladujejo ogljikovi hidrati, preostanek pa sestavljajo minerali, beljakovine, organske kisline in vitamini. Sesajoče žuželke izkoristijo le nekaj odstotkov sladkorjev, ki jih najdemo v drevesnem soku, ostale izločijo bolj ali manj predelane skozi zadnjično odprtino v obliki drobnih kapljic. Poleg saharoze vsebuje mana še fruktozo, glukozo ter nekatere trisaharide in oligosaharide. V mani prav tako ostane velika večina rastlinskih beljakovin in se včasih pojavijo tudi višji alkoholi (Šivic, 1998). Sveža mana je bistra in ima povprečno vrednost suhe snovi 5 do 18%. Zaradi sprememb v zračni vlagi se pri izparevanju ob zelo suhem vremenu količina suhe snovi lahko zveča na 30 do 50%. Količina ogljikovih hidratov v mani znaša 90 do 95% suhe snovi (Božnar in Senegačnik, 1998).

Manine paše se pojavljajo neredno, vendar so ob pojavu lahko zelo obilne. Neredno pojavljanje mane je posledica mnogih dejavnikov, najpomembnejši je življenjski cikel žuželk, ki mano posredujejo. Na razvojni cikel teh žuželk vplivajo predvsem rastline gostiteljice s spremembami sestave rastlinskih sokov, škodljivci in bolezni, nadmorska višina ter klima (Rihar, 2003).

Privlačnost maninih kapljic za čebele je odvisna od sladkorne sestave kapljic (Poklukar in sod., 1997). Čebele imajo dobre paše na različnih manah, npr. hrastovi, javorovi in leskovi,

še izdatnejši pa sta v naših krajih hojeva in smrekova mana (Božnar in Senegačnik, 1998). Čebele so le ene izmed porabnikov mane, porabijo jo le malo, morda okrog 5%. Vemo tudi, da mana predstavlja mravljam kar 90% hrane in da se z njo prehranjuje še stotine vrst žuželk (Rihar, 2003).

### 1.2.2 Pašna aktivnost čebel

Razvoj strupnih žlez in izločanje juvenilnega hormona nakazujeta začetek pašnega obdobja posamezne čebele (Winston, 1987). Za izraženost pašnega vedenja morajo obstajati zunanji motivirajoči dejavniki, kot so prisotna zalega, prazno satje in feromoni matice, ter notranji motivirajoči dejavniki za pašno aktivnost, kot sta lakota po paši in juvenilni hormon. Dražljaji, ki vzbujajo čebele k pašni aktivnosti, so novi nektar in cvetni prah v panju, stiki s pašnimi čebelami, vzorci nektarja, dobljeni pri medsebojni izmenjavi hrane, pobrenčavanje pašnih čebel in drugih pašno vznemirjenih čebel, brenčanje plesalk in zibajoč ples in morda še kaj (Božič, 1998).

Za pašne čebele je značilna specializacija za različna opravila. Delitev dela se spreminja s spremembo zunanjih okoljskih dejavnikov kot tudi s spremembami v panju (Kolmes, 1985a). Tako se posamezne pašne čebele specializirajo kot stražarke, zbiralke vode, izvidničarke ter zbiralke nektarja, peloda ali obojega (Kolmes, 1985b). Čebele, ki se vračajo z ugodnih paš, ostalim čebelam v panju posredujejo informacije o prisotnosti, razpoložljivosti, kvaliteti, vonju ter oddaljenosti in smeri izvora hrane s plesom in z izmenjavo hrane (von Frisch, 1965).

Pašne čebele se v prostoru orientirajo predvsem s pomočjo vida. Pri nabiranju nektarja in peloda na cvetnicah čebele prepoznavajo barve in oblike cvetov. Poleg barv in oblik so pri nektarnih pašah pomembne še vonjave in vsebnost sladkorjev v medičini (von Frisch, 1965).

Čebele odkrijejo manino pašo najverjetneje po naključju, saj za razliko od nektarnih paš gozdna paša ni vezana na posebne vonjave, barve in oblike. Ob ponovnih obiskih manine paše se tako čebele orientirajo predvsem s prepoznavanjem znamenj v okolju, do določene

mere pa tudi s pomočjo barv in vonjav, vendar te niso tako specifično vezane na vir sladke raztopine, kot pri nektarnih pašah.

### 1.2.3 Zaznavanje sladkih raztopin pri čebelah

Pašne čebele se odzivajo na spremembe v kakovosti virov nektarja. Povišanje vsebnosti saharoze povzroči povečanje števila pašnih poletov ene čebele v določenem času, povečanje volumna nabrane količine sladke tekočine in zmanjšanje verjetnosti, da bo pašna čebela opustila vir hrane. Zvišane koncentracije povečajo verjetnost, da bodo pašne čebele v panju plesale, in podaljšajo čas trajanja teh plesov. Na podlagi tega lahko sklepamo, da čebele zaznavajo spremembe v koncentraciji sladkorjev nektarja in primerno temu prilagodijo svoje pašno vedenje in vedenje v panju (von Frisch, 1965).

Čebele zbirajo informacije o prisotnosti in koncentraciji sladkorjev v hranljivih tekočinah s pomočjo okusa. Čutilo za okus pri čebelah najdemo na obustnem predelu, sprednjih nogah in antenah, ki pogostokrat predstavljajo prvi stik čebel s sladko raztopino. Antene so čutilni organi z različnimi tipi kemo- in mehanoreceptorskih senzil, med katerimi sta Whitehead in Larsen (1976a) prepoznala tudi okušalne dlačice. Intaktne okušalne dlačice anten imajo odzivni prag večinoma pri 3 mM raztopini saharoze (Haupt, 2004). Občutljivost okušalnih dlačic na antenah je tako veliko večja kot pri okušalnih dlačicah na proboscisu, ki se odzivajo pri 10 mM raztopini (Whitehead 1978, Whitehead in Larsen 1976b).

Mejne koncentracije sladkorjev, ki sprožijo odziv pri posamezni čebeli, se določajo z dotikom anten s sladkorno raztopino. Če je koncentracija primerna, se čebela refleksno odzove z izproženjem rilčka (ang. proboscis). Ta odziv opisujemo kot PER (ang. proboscis extension reflex). Koncentracija, pri kateri se posamezna čebela odzove s PER, je mejna koncentracija, pri kateri čebela zazna sladko tekočino kot primerno hrano. PER odzivnost posamezne čebele na raztopine sladkorja je povezana z delom, ki ga pašna čebela opravlja. Nabiralke vode so najbolj odzivne čebele, kar pomeni, da se s PER odzovejo na najnižje koncentracije sladkornih raztopin. Nabiralke peloda se odzivajo na nižje koncentracije kot nabiralke nektarja. Čebele, ki nabirajo oboje, se odzivajo pri vmesnih koncentracijah (Pankiw in Page 1999, 2000, Page in sod. 1998). Tudi med posameznimi čebelami, ki

nabirajo nektar, so razlike v PER odzivnosti. Tiste z višjo odzivnostjo nabirajo nektar z manjšimi koncentracijami od čebel, ki so manj odzivne (Pankiw in Page 2000, Pankiw 2003). Lačne čebele se s PER odzovejo pri nižjih koncentracijah kot site čebele (Page in sod., 1998). Odzivnost na saharozo se tako spreminja s hranjenjem in tudi s pašnimi izkušnjami (Pankiw in sod., 2001). Kaže se že zelo zgodaj v razvoju in vpliva na pašno vedenje čebele v kasnejšem obdobju življenja. Dve genetski liniji čebel, ki se razlikujeta v pašnem vedenju, kažeta tudi značilne razlike v odzivnosti na saharozo (Pankiw in Page, 1999).

PER odzivnost čebel se spreminja tudi med pašnim obdobjem. Nabiralke peloda kažejo v mesecu maju najvišjo odzivnost (PER pri nižjih koncentracijah saharoze), nabiralke nektarja pa imajo v mesecu juniju in juliju najnižjo odzivnost (PER pri višjih koncentracijah). V mesecu septembru sta odzivnosti nabiralk peloda in nabiralk nektarja čebel na določene koncentracije precej podobni (Scheiner in sod., 2003).

#### **1.2.4 Razlikovanje med sladkimi raztopinami različnih koncentracij v poskusih z izbiro**

Primernost različnih koncentracij sladkih raztopin za hranjenje čebel je raziskoval že Von Frisch (1965) s krmilniki, ki so vsebovali različne koncentracije saharoze. Najnižjo koncentracijo sladke raztopine, na kateri se je paslo vsaj nekaj čebel, je določil za mejno koncentracijo, ki je za čebele še primerna. Najnižje koncentracije sladkih raztopin, ki so jih čebele pile na umetnih krmiščih, so bile med 125 mM in 1 M. Če so bile sestradane, so pile tudi 63 mM raztopine (von Frisch, 1965).

Pri ugotavljanju preferenc živali se pogosto uporabljajo testi z izbiro. Žival ima preferenco za eno od dveh ali več možnosti, kadar ji nameni več časa, jo večkrat izbere ali ima krajšo latenco pri pristopu. Vendar preference, ki jih živali kažejo v določenem trenutku, niso stalne. Pri posamezni živali se lahko spreminjajo s starostjo, letnimi časi, tekom dneva ali zaradi predhodnih izkušenj. Živali prav tako spreminjajo svoje preference glede na razpoložljiv čas in energijo (Bateson, 2004).

Na čebelah je bilo narejenih veliko poskusov, s katerimi lahko do določene mere razložimo vedenje čebel na nektarni paši. Pri večini teh poskusov so raziskovalci uporabljali umetne rože, ki so vsebovale raztopine saharoze enakih koncentracij, a so se razlikovale po obliki, obarvanosti, volumnu vsebovane raztopine ali po dostopnosti raztopine. Shafir (1994) je v poskusih uporabljal cvetove, ki so se razlikovali po obliki in volumnu razpoložljive sladkorne raztopine. Ugotovil je, da čebele raje obiskujejo cvetove, ki nudijo več sladkorne raztopine. Če so v poskus dodali še tretjo možnost izbire, so se preference nekoliko spremenile, ne glede na to, da je bila ta tretja možnost relativno nezanimiva za čebele (Shafir in sod., 2002).

Na podoben način so preference pri čmrljih raziskovali Keasar in sod. (2002). Čmrlji so se hranili na dveh tipih umetnih rož, ki sta se razlikovala po obarvanosti in tudi po verjetnosti, da se bodo po hranjenju ponovno napolnile s sladko raztopino. Na začetku vsakega obiska so vse rože vsebovale sladko raztopino enake koncentracije. Tekom zaporednih obiskov so se čmrlji vedno pogosteje hranili na rožah, ki so jim večkrat ponudile sladko raztopino v predhodnih obiskih. Če sta bili verjetnosti ponovne napolnitve obeh tipov rož enaki, čmrlji v zaporednih obiskih niso kazali preferenc za enega od obeh tipov umetnih rož.

Cnanni in sod. (2006) so opazovali preference čmrljev za enega od dveh tipov umetnih rož, ki sta se razlikovala v koncentraciji sladkorne raztopine, volumnu raztopine ali v koncentraciji in volumnu raztopine. Čmrlji so se v zaporednih obiskih vedno pogosteje hranili na rožah z višjimi koncentracijami sladkorne raztopine tako v primerih, ko so vse rože vsebovale enake volumnne raztopin, kot tudi v poskusih, ko so vsebovale manjši volumen raztopine kot rože z nižjo koncentracijo raztopine saharoze.

Naug in Arathi (2007) sta raziskovala vpliv različnih koncentracij raztopine saharoze na vedenje čebel v poskusni komori. V komoro sta postavila dva krmilnika, ki sta vsebovala različni koncentraciji raztopine saharoze. Opazovala sta, kolikokrat čebela tekom enega obiska vzorči oziroma poskusi alternativno možnost (raztopino v krmilniku, na katerem ni pristala pri prihodu v komoro). Čebele so z vsakim zaporednim obiskom manjkrat vzorčile in močno povečale obisk krmilnika z višjo koncentracijo. Če sta spremenila koncentraciji raztopin v krmilnikih, so se čebele odzvale s povečanim številom vzorčenj, ki pa se je z

zaporednimi obiski nato spet hitro zmanjšal. Poskuse sta ponovila tudi s tremi različnimi koncentracijami saharoze, kar se je izkazalo za nekoliko kompleksnejšo situacijo.

Žaberl (2000) je v diplomskem delu ugotavljala preference čebel za različne koncentracije sladkorne raztopine. Poskusne čebele so večkrat zaporedno obiskale poskusno komoro, kjer so se hranile s kapljicami sladkorne raztopine dveh različnih koncentracij. Če je bila razlika med koncentracijama zadosti velika, je posamezna čebela v vsakem zaporednem obisku popila več kapljic višje koncentracije. Kadar sta bili razliki med koncentracijama obeh raztopin zelo majhni (npr. 180 g/L in 200 g/L), čebele tudi v več zaporednih obiskih niso izbirale kapljic z višjo koncentracijo sladkorja.



## 2 NAMEN RAZISKAVE IN HIPOTEZA

Namen raziskave je opisati vedenje čebele na umetnem krmišču s kapljicami različnih koncentracij saharozne raztopine. Zanimalo nas je, na kakšen način se čebele odzovejo na prisotnost dveh različnih koncentracij raztopine saharoze na krmišču in kako se kaže morebitna preferenca posameznih čebel za eno od obeh koncentracij.

Zanimalo nas je, ali čebele izbirajo med dvema koncentracijama raztopine saharoze in kako se spremenijo preference čebel, če povečamo razliko med obema koncentracijama. Zanimalo nas je tudi, ali se izbiranje med dvema koncentracijama raztopin z nižjima vsebnostima saharoze razlikuje od izbiranja med dvema koncentracijama z višjima vsebnostima saharoze.

Predvidevali smo, da se je tekom naših poskusov koncentracija raztopine saharoze v kapljicah spremenila zaradi izhlapevanja vode. Zanimalo nas je, v kakšni meri se je v naših poskusih spreminjala koncentracija kapljic zaradi izhlapevanja in kako to vpliva na čebeljo izbiro.

Z raziskavo smo želeli vsaj delno pojasniti pašno aktivnost čebel na gozdni paši, kjer se čebele srečujejo z zelo različnimi koncentracijami maninih kapljic.

Naši ničelni hipotezi sta bili, da se čebelje izbiranje med dvema različnima koncentracijama sladkornih raztopin pri nižjih vsebnostih sladkorjev ne razlikuje od izbiranja med dvema koncentracijama pri višjih vsebnostih sladkorjev in da povišanje razlike med koncentracijama ne vpliva na čebelje izbiranje.

### 3 MATERIALI IN METODE

Poskuse smo izvajali na Katedri za nevrotologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete. Panji s poskusnimi čebelami so bili od mesta poskusa oddaljeni približno 100m.

Poskuse s čebelami smo izvedli med 27. julijem in 18. avgustom 2006. V tem času v naravi primanjkuje naravnih virov hrane za čebel, saj cvetnice zaradi previsoke temperature in izsušenosti zemlje ne izločajo večjih količin nektarja. Pomanjkanje hrane v poletnih mesecih imenujemo brezpašno obdobje čebel. Umetno pripravljeno krmišče lahko v teh mesecih predstavlja glavno pašo čebel.

#### 3.1 OPIS POSKUSA

Čebele smo privadili na pašo na umetnem krmišču, ki smo ga postavili na okensko polico laboratorija za nevrotologijo in je bilo sestavljeno iz krmilnika in raztopine jedilnega sladkorja.

Poskuse smo izvajali v poskusni komori na posameznih čebelah. Pred začetkom poskusov smo čebele privadili na hranjenje v komori z raztopino saharoze, ki je imela nekoliko višjo koncentracijo kot raztopina na umetnem krmišču pred komoro. Čebele so med privajanjem lahko prosto letale v komoro in iz komore. S tem smo čebelam omogočili čimbolj nemoteno hranjenje.

Na stekleno ploščo smo pred začetkom poskusa nanесли 30 kapljic raztopine saharoze, 15 kapljic z višjo in 15 kapljic z nižjo molarnostjo. Uporabljali smo 0,5 M, 1 M in 1,5 M raztopino saharoze. Opazovali smo tudi hranjenje čebel na plošči s kapljicami enake molarnosti, kar nam je služilo kot kontrola. Poskuse smo snemali z video kamero Sharp C670 in programom FDS Imaging Software (FDS Research, Slovenija) ter spremljali temperaturo in relativno zračno vlago v komori tekom poskusa.

Spremembe koncentracij raztopin saharoze v posameznih kapljicah ob koncu poskusa smo preverili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

## 3.2 PRIPRAVA POSKUSA

### 3.2.1 Krmilnik za čebele

Krmilnik za čebele smo pripravili iz petrijevke in steklenega kozarca. V dno petrijevke smo naredili zareze in vanjo postavili kozarec s sladkorno raztopino. Zareze v petrijevki so omogočale počasno iztekanje sladkorne raztopine iz kozarca in vstop zraka v kozarec. Rob petrijevke je čebelam omogočal oprijem med hranjenjem s sladkorno raztopino.

### 3.2.2 Privajanje čebel na umetno krmišče

S privajanjem čebel na umetno krmišče smo začeli 19. julija 2006. Krmilnik za čebele smo postavili v oddaljenost treh metrov od panjev na pokončno postavljen okvir naklade. Čebele smo prenašali od panjskih žrel do krmilnika na petrijevki, premazani s sladkorno raztopino. Tako smo poskrbeli, da so čebele hitro našle ugodno pašo na umetnem krmišču. Na krmilnik smo prenašali čebele iz treh različnih panjev in s tem vsaj delno zmanjšali možne vplive razmer v panjih na hranjenje poskusnih čebel. Ko se je na krmišču paslo dovolj čebel, smo ga začeli postopno prestavljati v smeri mesta izvedbe poskusov. Do konca dneva smo umetno krmišče prenesli do mesta izvedbe poskusov. Krmilnik smo nato predstavili na okensko polico laboratorija Katedre za nevroetologijo, kjer so potekali poskusi.

Zaradi množičnega obiska čebel smo dodali še en krmilnik in v naslednjih dneh postopno zmanjševali vsebnost sladkorja v raztopini. Na okensko polico smo postavili še krmilnik z vodo, da so lahko čebele nadomestile morebitno pomanjkanje vode. Sladkorno raztopino v krmilnikih in vodo smo vsako jutro zamenjali s svežima. Dva krmilnika napolnjena z 0,5 L sladkorne raztopine sta zadostovala za celodnevno pašo čebel na umetnem krmišču.

Ob deževnih dnevih čebele niso obiskovale krmišča. Takoj, ko je dež ponehal, smo na krmišču lahko opazili prve čebele. Množičnost obiska krmišča na okenski polici se je po končanih padavinah hitro obnovila. Nekajkrat smo v zgodnjih jutranjih urah celo opazili čebele, ki so na krmišču prenočile.

### 3.2.3 Priprava raztopin

Raztopine smo pripravljali v laboratoriju Katedre za nevrotologijo na dan poskusa. Med poskusi smo jih hranili v hladilniku. Pripravljene raztopine smo uporabljali največ dva zaporedna dneva.

Za pripravo sladkornih raztopin smo uporabili:

- laboratorijsko saharozo (Kemika, Zagreb)
- jedilni sladkor
- med
- vodovodno vodo
- steklovino
- tehtnico

Na umetnem krmišču smo vedno uporabljali raztopino jedilnega sladkorja. Pripravljali smo jo v steklenih kozarcih z označenim volumnom 0,5 L. Čebele smo začeli privabljeti na umetno krmišče s sladkorno raztopino koncentracije 700 g/L. Začetni raztopini smo dodali še nekaj medu, da smo jo naredili zanimivejšo za čebele. V naslednjih petih dneh smo koncentracijo sladkorne raztopine na umetnem krmišču postopno zmanjševali, a kljub temu nismo opazili upada obiska čebel. Pred začetkom poskusov je bila koncentracija sladkorne raztopine na krmišču 110 g/L in tako ni bila konkurenčna raztopinam, ki smo jih uporabljali v poskusni komori.

Raztopine za privajanje čebel na hranjenje v poskusni komori in poskusne raztopine smo pripravljali iz saharoze. Uporaba laboratorijske saharoze se nam je zdela primernejša, saj vsebuje manjšo količino primesi in za razliko od jedilnega sladkorja nima tako izrazitega vonja. Za privajanje čebel na hranjenje v komori smo uporabljali raztopino saharoze s koncentracijo 130 g/L. Ta je bila torej višja kot koncentracija raztopine na krmišču in nižja od koncentracij vseh treh poskusnih raztopin.

V poskusih smo uporabljali 0,5 M (171 g/L), 1 M (342 g/L) in 1,5 M (513 g/L) raztopino laboratorijske saharoze. Raztopine smo pripravljali po naslednjem postopku:

- 0,5 M raztopina: odtehtali smo 1,71 g saharoze
- 1 M raztopina: odtehtali smo 3,42 g saharoze
- 1,5 M raztopina: odtehtali smo 5,13 g saharoze

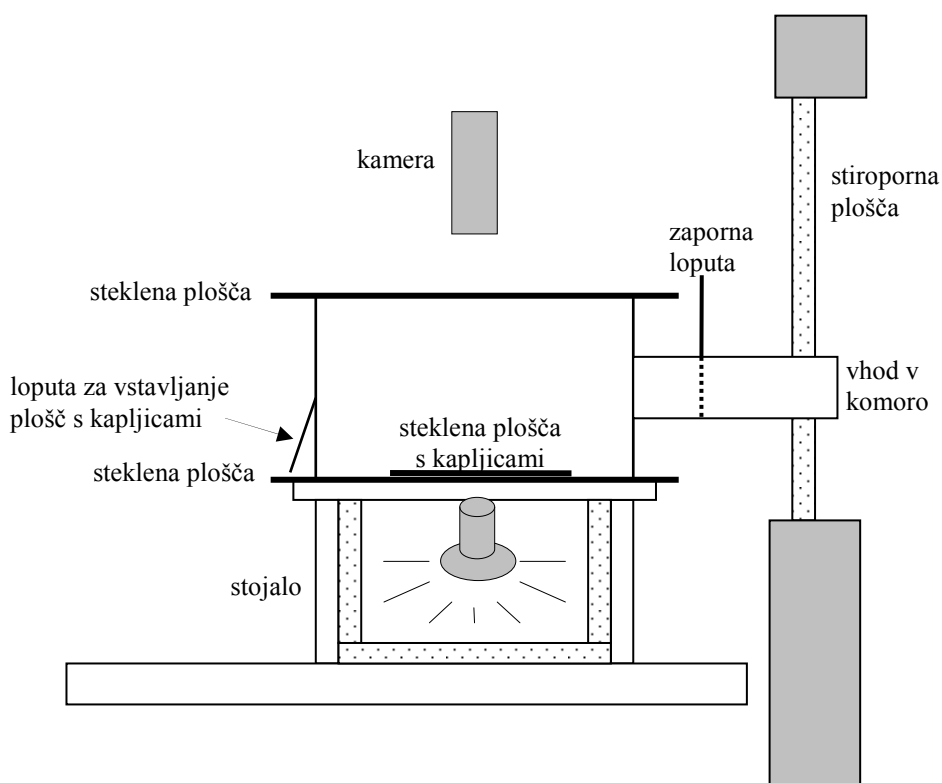
Odtehtano saharozo smo raztopili v manjšem volumnu vode in nato dopolnili do končnega volumna 10 mL.

### **3.2.4 Postavitev komore za izvedbo poskusov**

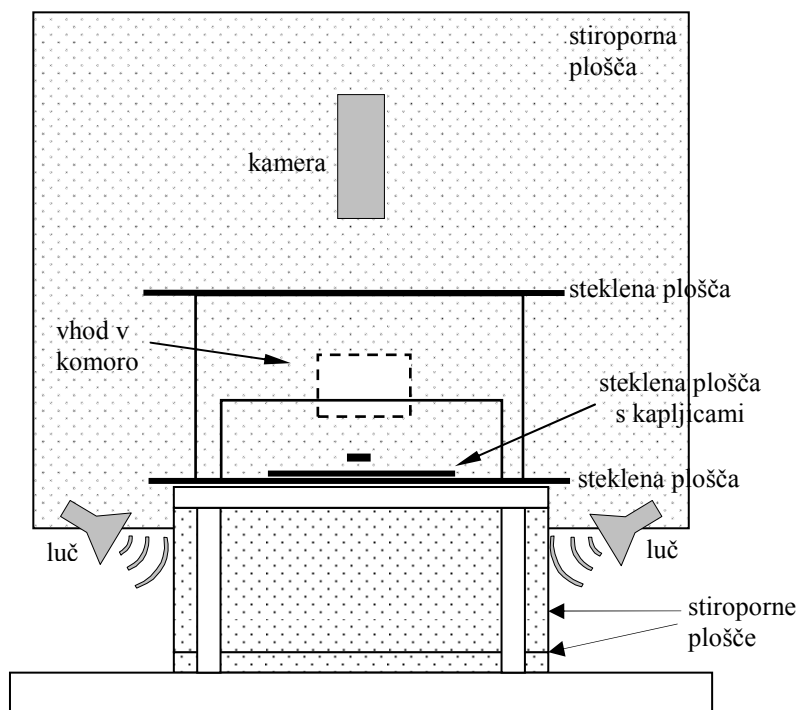
Izdelali smo poskusno komoro v velikosti 40x30x30 cm. Vhod v komoro je predstavljal tunel z zaporno loputo. Odprtina tunela je bila velikosti 15x15 cm, dolžina tunela pa 33 cm. Na zadnji strani komore je bila odprtina z loputo, namenjena vstavljanju poskusnih plošč s kapljicami raztopine. Bočne strani komore in tunel za vstop v komoro smo izdelali iz prozornih polikarbonatnih plošč. Za dno in vrh komore smo uporabili premični stekleni plošči, ki sta bili primernejši za snemanje z vrha komore. Komoro smo zatemnili z zunanjih strani, razen na vhodu v komoro, na dnu in vrhu komore za snemanje in osvetlitev ter na zadnji strani komore za opazovanje iz laboratorija.

Poskusno komoro smo postavili na stojalo, nameščeno na mizi pred odprtim oknom laboratorija. Okensko odprtino smo zastrli s stiropornimi ploščami in v višini komore izrezali odprtino za vhod v tunel komore. Čebele so tako lahko letele v notranjost laboratorija samo skozi vhodni tunel komore.

Nad komoro smo postavili video kamero, pritrjeno na stojalu. Komoro smo za namen snemanja iz spodnje strani osvetlili z dvema žarnicama in pod njo namestili plošče iz stiropora, ki so enakomerno razpršile svetlobo iz žarnic. Postavitev poskusne komore z osvetlitvijo in kamero je shematsko prikazana na slikah 1 in 2.



Slika 1: Shematski prikaz postavitve komore z osvetlitvijo in video kamero; pogled iz bočne strani.



Slika 2: Shematski prikaz postavitve komore z osvetlitvijo in video kamero; pogled iz zadnje strani.

### 3.2.5 Privajanje čebel na hranjenje v poskusni komori

Na dan pred začetkom poskusov smo čebele začeli privajati na hranjenje v poskusni komori. Na dno komore smo postavili stekleno ploščo in nanjo petrijevko z raztopino saharoze, ki je imela koncentracijo 130 g/L. V komoro so kmalu priletele prve čebele, saj je bil vhod v neposredni bližini umetnega krmišča na okenski polici. Posamezne čebele so poletavale po vhodnem tunelu in notranjosti komore, vendar niso našle sladkorne raztopine. Zato smo manjšo petrijevko s sladkorno raztopino namestili še v tunelu komore, kjer se je kmalu začelo pasti nekaj čebel. Te čebele smo prenesli na petrijevko v notranjost komore in jih pustili, da se nemoteno najedo. Čebele, ki so za tem priletele v komoro, so se pridružile ostalim čebelam ob petrijevki. Tekom dneva se je obisk komore številčno povečeval. Hkrati se je na sladkorni raztopini v petrijevki paslo tudi več kot deset čebel. Ko se je v popoldanskih urah gneča povečala, smo vhod v komoro zaprli. Čebele so posedale na zaporni loputi in tunelu ter iskale vhod v komoro. Po določenem času so čebele opustile vir hrane v komori. Ob ponovnem odprtju vhoda v komoro je prva čebela priletela šele po nekaj minutah. Obisk komore se je številčno obnovil po dvajsetih do tridesetih minutah.

Čebele so se lahko hranile v komori vsako jutro pred začetkom poskusov. Ko je bil obisk komore številčen, smo vhod zaprli. Stekleno ploščo z raztopino saharoze v petrijevki smo odstranili iz komore in začeli s poskusi. V eni uri smo naredili poskuse s štirimi do največ šestimi čebelami in nato ponovno odprli vhod v komoro za pašo. S poskusi smo nadaljevali, ko se je obisk komore številčno obnovil. Komoro smo morali odpreti za pašo dvakrat do štirikrat dnevno, odvisno od števila poskusov, ki smo jih tisti dan izvedli.

Kadar več dni nismo izvajali poskusov v komori, npr. zaradi dežja, smo morali čebele znova privajati na hranjenje v komori. Postopek privajanja smo izvedli na prvi sončni dan, na podoben način kot pred prvim dnevom izvajanja poskusov v komori. Vendar je privajanje potekalo krajši čas in smo lahko po nekaj urah začeli s poskusi.

### 3.2.6 Priprava steklenih plošč s kapljicami raztopine saharoze

Za poskuse smo na stekleno ploščo velikosti 21x18 cm nanegli kapljice raztopine saharoze dveh različnih koncentracij oziroma molarnosti. Kapljice so bile razporejene v mrežo petih vrst s šestimi kapljicami. Razmik med posameznimi kapljicami je bil vedno enak in je znašal 3 cm, po diagonali 4,2 cm. Kapljice so bile razporejene naključno in so imele pri vsaki poskusni čebeli drugačno razporeditev. S tem smo skušali preprečiti vpliv razporeditve kapljic na hranjenje čebel. Naključne razporeditve kapljic smo izdelali z računalniškim programom Microsoft Office Excel 2003.

Na steklenih ploščah se kapljice tekočine pogostokrat razlezejo, zato smo uporabili plošče z rahlimi ugreznitvami na mestu nanosa kapljice. Na ploščo nanešena kapljica je tako imela bolj okroglo obliko in s tem najmanjšo možno izpostavljeno površino za izhlapevanje.

Pri poskusih smo na ploščo nanegli 30 kapljic raztopine saharoze, 15 kapljic višje in 15 kapljic nižje molarnosti. Pred začetkom poskusov smo preverili najprimernejši volumen kapljic za hranjenje čebel. Če smo uporabili kapljice z volumnom 3  $\mu\text{L}$ , so čebele popile vse kapljice višje koncentracije. Z uporabo 3  $\mu\text{L}$  kapljic bi tako umetno vplivali na potek in konec poskusa. Pri hranjenju s 5  $\mu\text{L}$  kapljicami, so čebele popile majhno število kapljic, kar pa ni bilo primerno za statistično obdelavo podatkov. Kapljice s takšnim volumnom je v poskusih uporabljala že Žaberl (2000), vendar so poskusne čebele v povprečju popile le 10 kapljic sladkorne raztopine. Tako smo se odločili za uporabo kapljic z volumnom 4  $\mu\text{L}$ . V tem primeru so čebele popile zadostno število kapljic za statistično analizo, a so na plošči še vedno ostale kapljice tako nižje kot tudi višje molarnosti. Kapljice sladkornih raztopin smo na stekleno ploščo nanašali s pipeto. Po nanosu kapljic na ploščo smo takoj začeli s poskusom.

Pri prijemanju in prenašanju steklenih plošč smo vedno uporabljali polietilenske rokavice. Po poskusu smo uporabljene plošče nekaj časa spirali pod tekočo vodo in nato še z destilirano vodo. Plošče smo nato pustili, da so se posušile. Uporabljali smo set desetih steklenih plošč.



### 3.3 IZVEDBA POSKUSA

Poskuse smo razdelili v štiri sklope:

1. 15 kapljic 0,5 M in 15 kapljic 1 M raztopine saharoze na plošči
2. 15 kapljic 1 M in 15 kapljic 1,5 M raztopine saharoze na plošči
3. 15 kapljic 0,5 M in 15 kapljic 1,5 M raztopine saharoze na plošči
4. kontrolni poskusi:
  - 15 kapljic vode in 15 kapljic 0,5 M raztopine saharoze na plošči
  - 30 kapljic 0,5 M raztopine saharoze na plošči
  - 30 kapljic 1 M raztopine saharoze na plošči
  - 30 kapljic 1,5 M raztopine saharoze na plošči

Prvi sklop poskusov smo izvedli 27., 28. in 29. julija 2006. V poskuse je bilo vključenih 34 čebel. Drugi sklop poskusov smo opravili 31. julija ter 8. in 9. avgusta na 34 čebelah, z vmesno prekinitvijo zaradi dežja. Med 16. in 18. avgustom 2006 smo opravili še tretji sklop poskusov z izbiro na 33 čebelah.

Pri prvem sklopu kontrolnih poskusov smo na ploščo nanegli 15 kapljic vode in 15 kapljic 0,5 M raztopine saharoze. S tem smo želeli pokazati, da čebele pri hranjenju med poskusom ne zanima voda ampak le hrana (sladkor). Te kontrolne poskuse smo izvedli 10. avgusta 2006 na enajstih čebelah. Pri ostalih treh kontrolah smo na plošče nanegli 30 kapljic raztopine saharoze enake molarnosti. S tem smo želeli pokazati, da čebele pijejo kapljice raztopine saharoze določene molarnosti, čeprav jih v poskusih z izbiro zaradi prisotnosti kapljic z večjo molarnostjo zavračajo. Kontrolne poskuse z 0,5 M kapljicami raztopine saharoze smo izvedli na enajstih čebelah 10. in 14. avgusta 2006. Kontrolne poskuse z 1 M raztopino saharoze smo opravili 15. avgusta na dvanajstih čebelah. V sklop kontrolnih poskusov z 1,5 M kapljicami je bilo vključenih 10 čebel, s katerimi smo poskuse izvedli 15. in 16. avgusta 2006.

Tik pred začetkom posameznega poskusa smo pripravili stekleno ploščo s kapljicami raztopine saharoze in jo postavili v poskusno komoro. Komoro smo osvetlili in odprli zunanjo loputo na vhodu. V komoro smo spustili eno poskusno čebelo, nato smo vhod

zaprli in začeli s snemanjem poskusa. Spremljali smo pitje kapljic in si beležili popite kapljice in kapljice, ki jih je čebela smo poskusila in zavrnila.

Ko je čebela prenehala s pitjem, vzletela s steklene plošče in se usmerila proti izhodu iz komore, smo jo ujeli v plastičen lonček in jo obdržali v laboratoriju. Vsak poskus je bil torej izveden na čebeli, ki se je prvič srečala s koncentracijami raztopine saharoze, ki so višje kot na umetnem krmišču in pri navajanju na komoro, in s prisotnostjo kapljic dveh različnih koncentracij, med katerimi lahko izbira. S tem smo preprečili, da bi bili nadaljni poskusi izvedeni na čebelah, ki so že seznanjene z možnostmi izbire v poskusu, kar bi vplivalo na njihove preference (Žaberl, 2000). Čebele, ki smo jih zadržali v laboratoriju, prav tako niso mogle posredovati informacij o kakovosti hrane ostalim pašnim čebelam v panju.

Nekaj čebel ob prihodu v komoro ni pristalo na stekleni plošči in ni pilo kapljic, zato smo jih spustili iz komore. Najbrž niso bile lačne ali pa se predhodno še niso hranile v komori. Pripravljene plošče s kapljicami nismo več uporabili, saj se je koncentracija saharoze v kapljicah najbrž že značilno spremenila zaradi izhlapevanja.

Po končanem poskusu s posamezno čebelo smo prenehali s snemanjem in ugasnili žarnici. Z merilnika v komori smo odčitali temperaturo in relativno zračno vlago. S pipeto smo vzeli 1  $\mu\text{L}$  vzorce za HPLC analizo iz treh kapljic nižje molarnosti in treh kapljic višje molarnosti.

Uporabljene steklene plošče smo po vsakem poskusu očistili in s tem odstranili ostanke raztopin. Poleg tega smo s čiščenjem steklenih plošč ter komore skušali vsaj delno preprečiti vpliv vonjav in markacij, ki jih čebele pustijo za seboj na površinah, kjer se hranijo (Giurfa, 1993). Čeprav se je vsaka poskusna čebela hranila na čisti stekleni plošči s kapljicami, nismo imeli nobene kontrole nad tem, kako se je čebela orientirala na plošči glede na lastne markacije.

### 3.4 HPLC ANALIZA

Predvidevali smo, da tekom poskusa iz kapljic saharozne raztopine na stekleni plošči izhlapeva voda, kar lahko značilno spremeni koncentracijo raztopine saharoze oziroma razmerje med obema koncentracijama raztopin, s katerima se čebela hrani med poskusom.

Izhlapovanje smo poskušali zmanjšati s primerno obliko kapljic. V ta namen smo uporabili steklene plošče z rahlimi ugreznitvami na mestu nanosa kapljice. Kapljice so tako imele bolj okroglo obliko ter posledično najmanjšo možno površino za izhlapevanje. Komora je bila tekom poskusa zaprta. Stalen pretok zraka skozi komoro bi povečal izhlapevanje kapljic. Predvidevamo, da so na izhlapevanje kapljic tekom poskusa najbolj vplivali čas trajanja poskusa, temperatura ter relativna zračna vlaga v komori.

Po pripravi raztopin za poskuse smo iz njih vzeli pet vzorcev z volumnom 1  $\mu\text{L}$  za HPLC (ang. high-performance liquid chromatography) analizo. Iz vsake ponovno pripravljene poskusne raztopine smo vzeli novo serijo kontrolnih (začetnih) vzorcev. Po končanem poskusu s posamezno čebelo smo iz kapljic, ki so ostale na plošči, vzeli 1  $\mu\text{L}$  vzorce. Vzorčili smo le kapljice, ki so tekom poskusa ostale nedotaknjene, kar pomeni, da čebela ni prišla v stik z njimi in jih ni poskušala. Vzorce treh kapljic višje in treh kapljic nižje molarnosti smo odpipetirali v 99  $\mu\text{L}$  bidestilirane vode in jih zamrznili do začetka HPLC analize.

HPLC analizo smo izvedli v laboratoriju Čebelarske Zveze Slovenije 28. septembra in 12. oktobra 2006. Podatke analize smo beležili s programom Eurochrom HPLC Software Version 3.05.

100  $\mu\text{L}$  vzorce za analizo smo odtalili in centrifugirali 5 min s 4000 obrati na minuto. Pred začetkom analize vzorcev smo injicirali različne volumne raztopine saharoze znane koncentracije (eksterni standard), ki nam je služila za izris umeritvene krivulje. Iz umeritvene krivulje smo lahko nato odčitali maso saharoze v vzorcih začetnih raztopin in kapljic iz poskusov, saj je površina signala na kromatogramu sorazmerna vsebnosti topljenca v mobilni fazi.

Zaradi velikega števila vzorcev smo analizirali le izbrane poskusne vzorce in pripadajoče kontrolne vzorce. Vzorce kapljic za HPLC analizo smo izbrali glede na čas trajanja poskusa. V HPLC analizo smo tako vključili vzorce kapljic iz poskusov z najdaljšim in približno povprečnim časom trajanja v posameznem poskusnem sklopu. Pogoji HPLC analize so zbrani v preglednici 1.

Preglednica 1: Pogoji HPLC analize.

<b>Kolona: EC 250/4 NUCLEOSIL</b>	<b>Pogoji:</b>	<b>Vzorci:</b>
kataloška št.: 720905.40 Carbohydrate	mobilna faza: voda:acetonitril (25:75, v:v)	inj. volumen:
dimenzije: 250 X 4 mm	pretok: 2 mL/min	40 µL
velikost delcev: 10 µm	temperatura: sobna	topilo: voda
	detektor: RI	

---

### 3.5 PAŠNI IN VREMENSKI POGOJI V ČASU IZVEDBE POSKUSA

Poskuse na čebelah smo izvajali v zadnjih dneh meseca julija in prvi polovici meseca avgusta. V tem času je v naravi brezpašno obdobje za čebele. V bližnji okolici ni bilo dovolj cvetočih in medečih rastlin, ki bi zadostile potrebam čebeljih družin. Zaradi zmanjšane količine nektarja v naravi smo brez težav privabili čebele na umetno krmišče in kasneje vzdrževali pašo na umetnem krmišču tudi z nizkimi koncentracijami sladkornih raztopin. V mesecu juniju in prvi polovici julija bi imeli s privabljanjem čebel na umetno krmišče več težav. Takrat so čebelam pomembnejši naravni viri nektarja in cvetnega prahu, ki ga lahko najdejo v bližnji okolici na mnogih cvetočih zeliščih in lesnih rastlinah.

S poskusi smo začeli po deveti uri zjutraj in zaključili najkasneje do 18. ure popoldan. V prvih štirih dneh izvajanja poskusov je bilo vreme sončno in precej toplo. Pred začetkom s poskusi se je temperatura že dvignila nad 20°C, najvišja dnevna temperatura pa je dosegla 31 do največ 33°C. Vročina v popoldanskih urah je povzročila nemirnost čebel na krmišču. Čebele so sicer prihajale v komoro, ampak so popile le nekaj kapljic ali pa se sploh niso hranile. Zato smo v vročih, zadnjih dneh meseca julija s poskusi zaključili pred tretjo uro popoldan.

V deževnih dnevih čebele niso prihajale na umetno krmišče, zato ni bilo možno izvajati poskusov. Zaradi dežja smo poskuse prekinili med 1. in 7. avgustom 2006. Prve štiri dni v avgustu je močno deževalo, temperatura je precej padla. 4. avgusta se najvišja dnevna temperatura ni dvignila nad 16°C. 5., 6. in 7. avgusta je dež delno ponehal in dnevna temperatura se je dvignila na 24 do 25°C, vendar so bila jutra še vedno precej hladna (12 do 15°C). S poskusi smo nadaljevali na prvi sončen dan (8. avgusta) šele po 14. uri popoldan, ko se je ozračje dovolj segrelo in je bilo na krmišču precej čebel. Nekaj kratkotrajnih padavin je bilo tudi naslednji dan (9. avgusta), vendar šele po 18. uri, ko smo s poskusi že zaključili. Zaradi dežja smo poskuse prekinili tudi med 11. in 13. avgustom. Po 14. avgustu 2006 ni bilo več padavin, zato smo lahko poskuse izvajali nemoteno.

Kljub temu, da je bilo kar nekaj dni deževnih in neprimernih za opazovanje pašnega vedenja čebel, so bili ostali dnevi sončni ali vsaj delno jasni in precej topli. Najvišja

dnevna temperatura se po 1. avgustu ni več povzpela nad 30°C in smo tako lahko nemoteno izvajali poskuse brez prekinitev zaradi vročine in nemirnosti čebel. Rahlo znižanje temperature v mesecu avgustu je vplivalo na začetek prvih jutranjih poletov čebel, zato smo s poskusi začeli nekoliko kasneje, okrog 11. ali 12. ure.

Podrobnejše podatke o temperaturi, relativni zračni vlagi in količini padavin smo pridobili iz arhiva avtomatske vremenske postaje Ljubljana Koseze.

## 3.6 ZBIRANJE IN OBDELAVA PODATKOV

### 3.6.1 Zbiranje podatkov

Med poskusom na posamezni čebeli smo si beležili zaporedje kapljic raztopine saharoze višje in nižje molarnosti, ki jih je čebela popila ali le poskusila in zavrnila. Hranjenje čebele smo snemali z video kamero Sharp C670 in programom FDS Imaging Software (FDS Research, Slovenija), ki je posnel 5 sličic na sekundo. Program nam je beležil tudi čas trajanja poskusa. Posnetke smo primerjali z zabeleženimi podatki in zaporedje popitih in zavrnutih kapljic uredili v preglednico (priloga B). Prešteli smo skupno število popitih kapljic višje in nižje molarnosti, število vseh popitih kapljic ter število zavrnutih kapljic. Z merilnikom temperature in relativne zračne vlage smo spremljali pogoje v komori tekom poskusa.

### 3.6.2 Obdelava podatkov

S Fisherjevim testom (ang. Fisher's exact test) smo izračunali verjetnosti preferenc posameznih čebel za eno od obeh raztopin saharoze. Primerjali smo opazovane frekvence popitih in nepopitih kapljic (kapljice, ki so ostale na poskusni plošči po koncu poskusa) ali pa opazovane frekvence popitih in zavrnutih kapljic obeh raztopin saharoze. Rezultate Fisherjevega testa smo zbrali v preglednicah.

Za posamezno poskusno skupino čebel smo izračunali mediano ter prvi in tretji kvartil popitih kapljic nižje molarnosti, popitih kapljic višje molarnosti ter vseh popitih kapljic. Z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov za dvojice meritev (ang. Wilcoxon's matched pairs signed rank test) smo izračunali verjetnosti preference čebel v posamezni poskusni skupini za eno od obeh raztopin. En par meritev za Wilcoxonov test sta predstavljala število popitih kapljic raztopine saharoze višje molarnosti in število popitih kapljic nižje molarnosti pri posamezni čebeli.

Skupna števila popitih kapljic čebel med posameznimi poskusnimi sklopi smo primerjali s Kruskal-Wallisovim testom in Mann-Whitneyevim testom.

Po HPLC analizi standardne raztopine saharoze smo izrisali umeritveno krivuljo in iz nje odčitali vsebnosti saharoze v vzorcih kapljic iz poskusov in vzorcih začetnih raztopin. S F-testom smo primerjali variance vsebnosti saharoze v kontrolnih vzorcih. Povprečne vrednosti vsebnosti saharoze v kontrolnih vzorcih smo primerjali s Studentovim t-testom za enake variance ali s Studentovim t-testom za statistično značilno različne variance. Predhodno smo morebitne odstopajoče vrednosti po HPLC analizi kontrolnih vzorcev odstranili iz nadaljne statistične analize. Statistično značilne odstopajoče vrednosti (osamelce) smo prepoznali z Grubssovim testom.

Vsebnosti saharoze v vzorcih kapljic iz poskusov glede na čas trajanja poskusa in njihovih pripadajočih kontrolnih vzorcev smo izrisali na korelacijskih grafikonih z regresijsko premico in izračunali korelacijski koeficient R.

Pri zbiranju, urejanju in statistični analizi podatkov smo uporabljali programa Microsoft Office Excel 2003 in SigmaStat 3.5. Grafične prikaze rezultatov smo izrisali v programu Sigmaplot 8.02.



## 4 REZULTATI

### 4.1 POSKUSI S KAPLJICAMI RAZTOPINE SAHAROZE DVEH RAZLIČNIH MOLARNOSTI

Čebele so v poskusni komori lahko izbirale med kapljicami raztopine saharoze dveh različnih molarnosti. Preferenco posamezne čebele za kapljice višje molarnosti smo lahko opazovali z zavračanjem kapljic nižje molarnosti. Zavrnjene kapljice je čebela poskusila in jih ni popila. Zaradi zavračanja kapljic nižje molarnosti je število popitih kapljic višje molarnosti v veliki večini primerov večje od števila popitih kapljic nižje molarnosti. Zato smo za statistično analizo uporabili števila popitih in nepopitih kapljic raztopine saharoze nižje in višje molarnosti. Kadar test ni pokazal statistično značilnih razlik, čebela pa je tekom poskusa zavračala kapljice raztopine z nižjo molarnostjo, smo za dodatno analizo uporabili še števili popitih in zavrjenih kapljic obeh raztopin.

Za analizo števila popitih in nepopitih kapljic obeh raztopin pri posameznih čebelah bi lahko uporabili  $\chi^2$  test, vendar ta ni primeren, kadar so opazovane frekvence, ki jih želimo testirati, prenizke. Nekatere poskusne čebele so med hranjenjem popile manj kot 10 kapljic, kar je prenizka opazovana frekvenca za uporabo  $\chi^2$  testa. Te čebele smo označili drugače (npr. 16a, 17a, 19a in 19b v prvi poskusni skupini), rezultate iz poskusov pa smo testirali s Fisherjevim testom, ki je bolj natančen pri manjših opazovanih frekvencah.

Nekatere čebele so ob koncu poskusa zavračale kapljice raztopin obeh molarnosti. Predvidevamo, da čebele niso več pile kapljic, ker so bile že site. Za konec poskusa smo tako določili zadnjo še popito kapljico, ne glede na njeno molarnost. Hranjenje brez zavračanja kapljic nam nakazuje, da čebela ni imela preferenc za eno od obeh raztopin saharoze.

Čas trajanja posameznega poskusa, pogoji v poskusni komori ter frekvence popitih in zavrjenih kapljic so prikazani v prilogi A. Zaporedja popitih in zavrjenih kapljic vseh poskusnih čebel so prikazana v prilogi B.

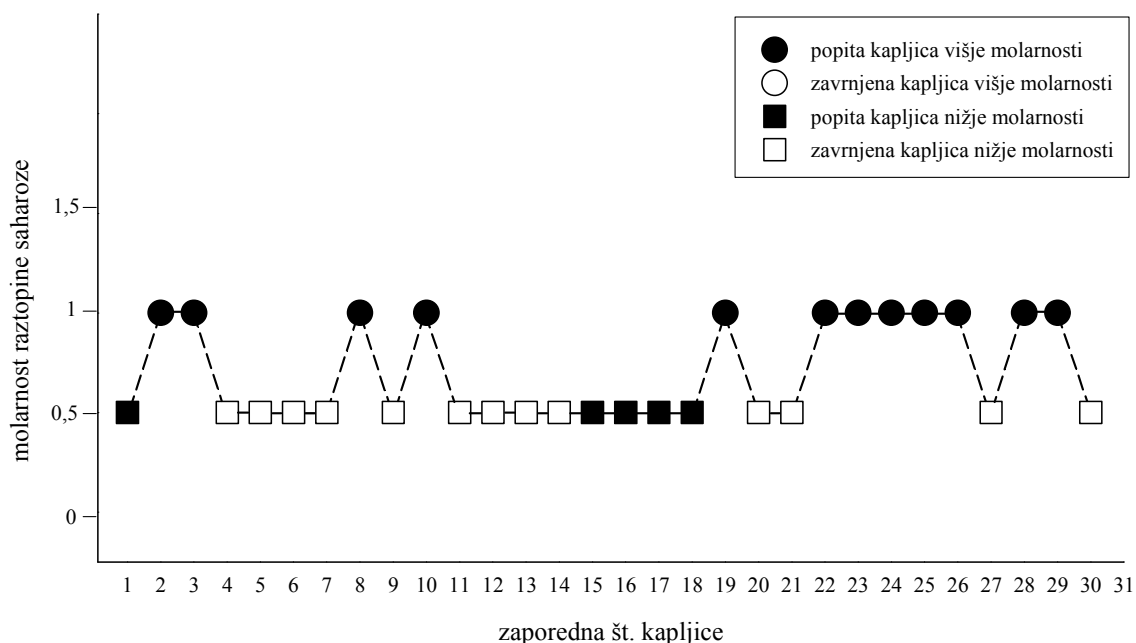
#### 4.1.1 Poskusi s kapljicami 0,5 M in 1 M raztopine saharoze

S kapljicami 0,5 M in 1 M raztopine saharoze na plošči se je hranilo 34 poskusnih čebel. Rezultati Fisherjevega testa za posamezne poskusne čebele so zbrani v preglednici 2.

Preglednica 2: Rezultati Fisherjevega testa za čebele, ki so izbirale med kapljicami 0,5 M in 1 M raztopine saharoze. Verjetnosti manjše od 0,05 so statistično značilne in so zapisane odebeljeno.

oznaka čebele	verjetnosti (p)	verjetnosti (p)
	(rezultati testa za popite in nepopite kapljice 0,5 M in 1 M raztopine saharoze)	(rezultati testa za popite in zavrnjene kapljice 0,5 M in 1 M raztopine saharoze)
1	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,005</b>
2	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
3	0,449	0,214
4	0,066	<b>&lt;0,001</b>
5	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
6	0,494	0,471
7	0,060	<b>0,019</b>
8	0,128	0,078
9	0,128	0,128
10	<b>0,003</b>	<b>0,018</b>
11	1	0,462
12	<b>0,008</b>	<b>0,008</b>
13	0,066	
14	<b>0,025</b>	<b>0,003</b>
15	<b>0,009</b>	<b>0,003</b>
16	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
16a	0,651	
17	0,710	0,462
17a	0,215	0,333
18	0,462	0,090
19	<b>0,002</b>	<b>&lt;0,001</b>
19a	0,598	
19b	0,999	
20	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>
21	<b>0,008</b>	<b>0,002</b>
22	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
23	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>
24	1	0,101
25	0,050	<b>&lt;0,001</b>
26	<b>0,009</b>	<b>&lt;0,001</b>
27	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
28	<b>0,025</b>	<b>&lt;0,001</b>
29	0,494	0,092
30	<b>0,021</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>skupaj p&lt;0,05/p≥0,05</b>	<b>17/17</b>	<b>20/10</b>

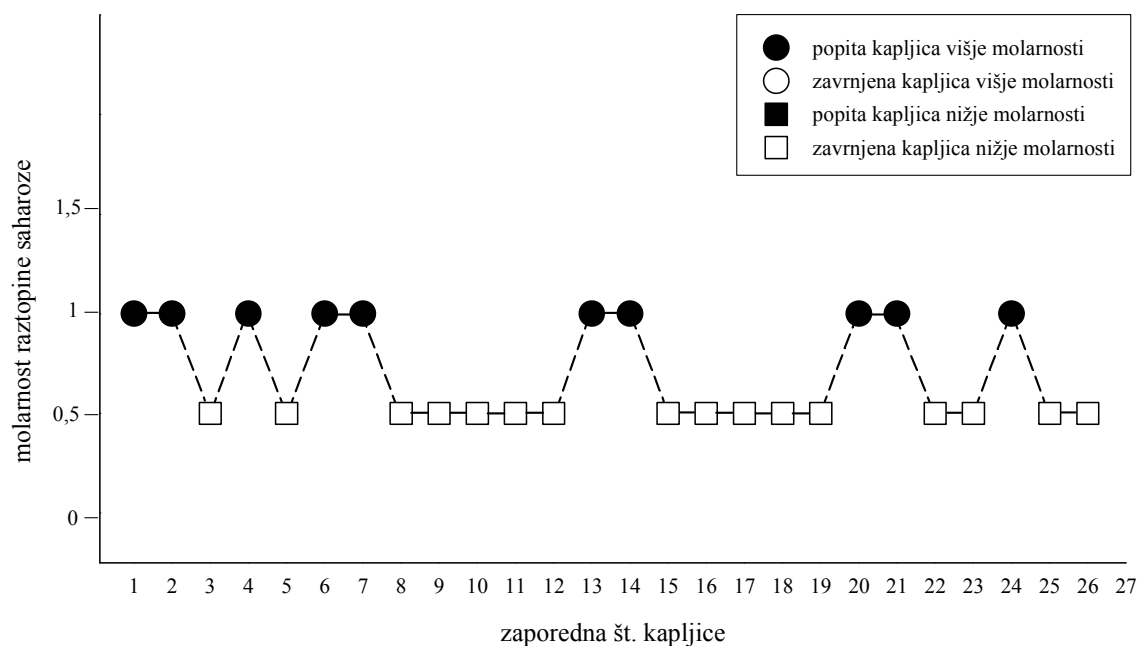
Za 20 od skupaj 34 čebel smo ugotovili statistično značilno preferenco za kapljice 1 M raztopine saharoze. 12 od teh jih je začelo zavračati kapljice raztopine z nižjo molarnostjo takoj za tem, ko so popile prvo kapljico ali serijo kapljic višje molarnosti. Zaporedje popitih in zavrženih kapljic ene od teh čebel je prikazano na sliki 3. Ostale čebele so začele zavračati kapljice nižje molarnosti šele kasneje.



Slika 3: Zaporedje popitih in zavrženih kapljic čebela 28.

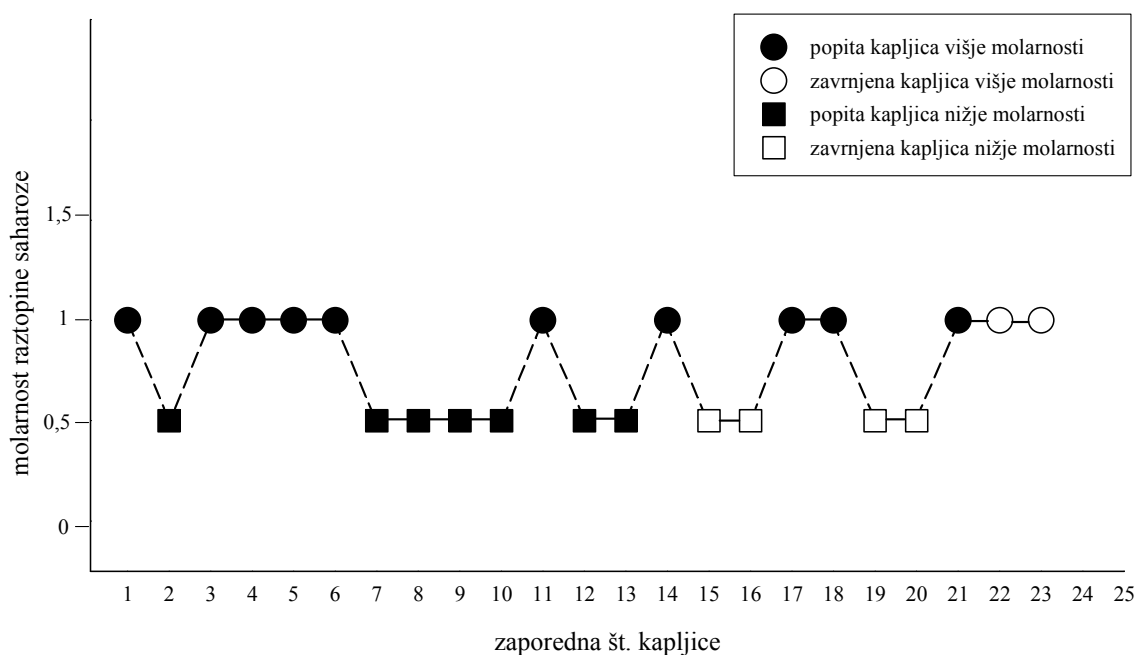
Iz slike je razvidno, katere kapljice je čebela 28 popila in katere poskusila in jih nato zavrnila. Čebela je že po prvih dveh popitih kapljicah 1 M raztopine saharoze začela zavračati kapljice z 0,5 M raztopino saharoze. Med poskusom je ponovno začela piti kapljice z nižjo molarnostjo, verjetno zato, ker dalj časa ni našla nobene kapljice z raztopino višje molarnosti.

Tri čebele v tej poskusni skupini (čebela 2, 5 in 27) niso popile niti ene kapljice 0,5 M raztopine saharoze. Zaporedje popitih in zavrženih kapljic čebela 27 je prikazano na sliki 4.



Slika 4: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 27.

Za 14 čebel nismo ugotovili statistično značilnih preferenc za raztopino saharoze višje molarnosti. Štiri od teh so tekom poskusa pile vse kapljice, tistih z nižjo molarnostjo torej niso niti enkrat zavrnila. Tri od teh pripadajo skupini čebel, ki so popile manj kot 10 kapljic. Preostalih 10 čebel je začelo zavračati kapljice 0,5 M raztopine saharoze šele proti koncu poskusa. Takrat so bile frekvence popitih kapljic obeh raztopin saharoze že precej velike in podobne in so zato vplivale na rezultat statističnega testa. Takšen primer je čebela 18. Na sliki 5 lahko vidimo, da je zaporedno pila kapljice raztopin obeh molarnosti in je šele po 14. popiti kapljici prvič zavrnila kapljico 0,5 M raztopine saharoze. Za tem je spila le še 3 kapljice 1 M raztopine saharoze. Pri tej čebeli lahko tudi vidimo zavračanje kapljic ob koncu poskusa, čeprav so te višje molarnosti. Podobno sta čebeli 28 in 27 (slika 3 in 4) ob koncu poskusa zavrnila kapljice raztopine z nižjo molarnostjo.



Slika 5: Zaporedje popitih in zavrnjenih kapljic čebele 18.

Po Wilcoxonovem testu se v tej poskusni skupini število popitih kapljic 1 M raztopine saharoze statistično značilno razlikuje od števila popitih kapljic 0,5 M raztopine saharoze ( $p < 0,001$ ,  $Z = 4,929$ ,  $n = 33$ ).

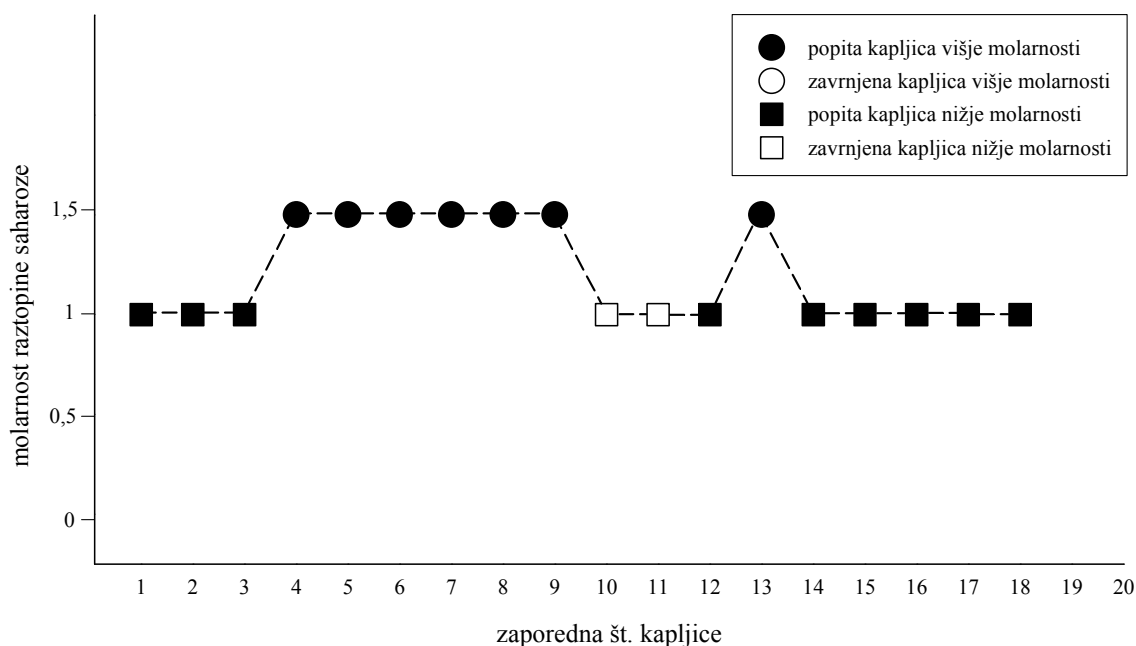
#### 4.1.2 Poskusi s kapljicami 1 M in 1,5 M raztopine saharoze

V to poskusno skupino smo vključili 34 čebel. Čebele 33a, 46a, 49a in 57a so v poskusu popile manj kot deset kapljic. Fisherjev test za večino čebel ni pokazal statistično značilnih razlik med številom popitih kapljic ene in druge raztopine. Rezultati so prikazani v preglednici 3. Izjema je čebela 60, pri kateri je zaporedje popitih kapljic vplivalo na izid testa, saj je med pitjem brez zavračanja kapljic zaporedno našla več kapljic 1 M raztopine saharoze. Fisherjev test je tako pokazal statistično značilno razliko med popitimi in nepopitimi kapljicami 1 M in 1,5 M raztopine saharoze, čeprav čebela ni kazala vedenjskih znakov izbiranja. Rezultati Fisherjevega testa za posamezne čebele je prikazan v preglednici 3.

Preglednica 3: Rezultati Fisherjevega testa za čebele, ki so izbirale med kapljicami 1 M in 1,5 M raztopine saharoze. Verjetnosti manjše od 0,05 so statistično značilne in so zapisane odebeljeno.

oznaka čebele	verjetnosti (p)	verjetnosti (p)
	(rezultati testa za popite in nepopite kapljice 1 M in 1,5 M raztopine saharoze)	(rezultati testa za popite in zavrnjene kapljice 1 M in 1,5 M raztopine saharoze)
31	0,710	
32	1	
33	1	1
33a	1	1
34	0,462	
35	0,462	0,444
36	0,715	0,497
37	0,065	0,353
38	0,466	
39	1	
40	1	
41	1	
42	1	
43	1	
44	0,450	
45	0,710	
46	1	
46a	0,714	
47	0,466	
48	0,494	
49	0,700	
49a	1	
50	0,301	
51	1	
52	0,710	
53	1	
54	1	
55	1	
56	1	
57	0,162	
57a	0,713	
58	1	
59	0,700	
60	<b>0,008</b>	
<b>skupaj p&lt;0,05/p≥0,05</b>	<b>1/33</b>	<b>0/5</b>

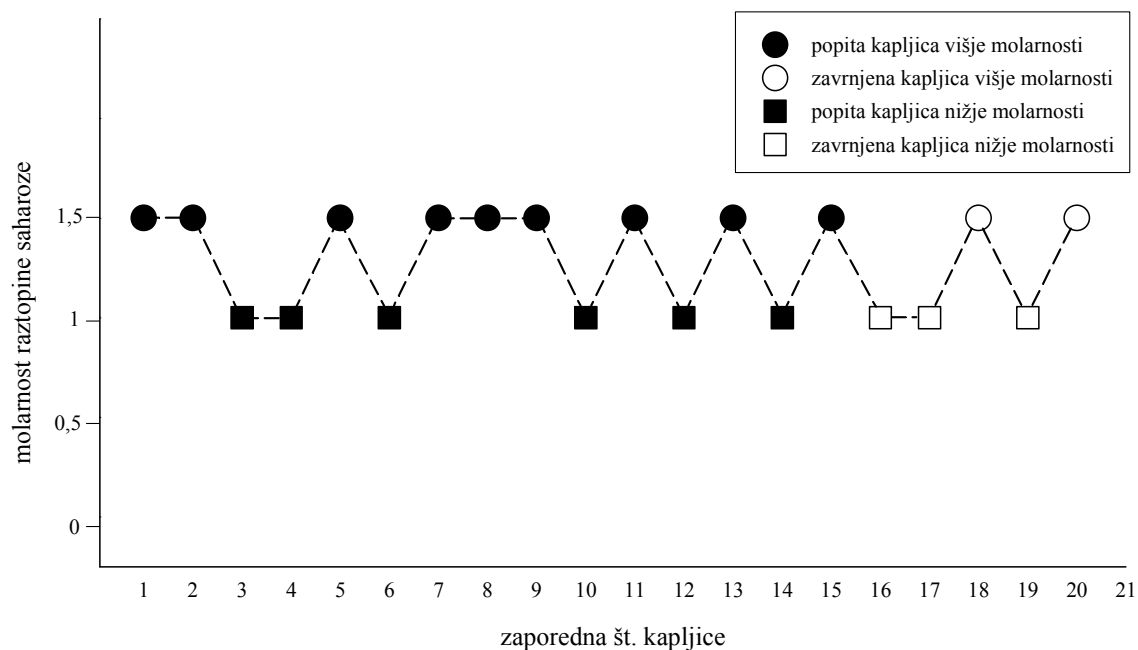
Pet čebel v tej poskusni skupini je zavrnilo eno ali največ dve kapljici 1 M raztopine saharoze tekom hranjenja v poskusni komori. Kapljico so zavrnile večinoma šele proti koncu poskusa. Fisherjev test za te čebele ni pokazal statistično značilnih razlik med številu popitih in zavrnjenih kapljic ene in druge raztopine. Primer je čebela 36 (slika 6), ki je med poskusom zavrnila dve kapljici raztopine nižje molarnosti.



Slika 6: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 36.

Ostale čebele so pile kapljice obeh raztopin in niso kazale preferenc. Primer je čebela 47 (slika 7), ki je popila vse zaporedne kapljice. Ob koncu poskusa je zavračala kapljice ne glede na vsebnost saharoze v njih.

Z Wilcoxonovim testom nismo dokazali statistično značilnih razlik med številom popitih kapljic 1 M in 1,5 M raztopine saharoze ( $p=0,837$ ,  $Z=0,218$ ,  $n=26$ ) v tej poskusni skupini. Število parov ( $n$ ) je 26, saj test pri rangiranju ne upošteva parnih vrednosti, katerih razlika je 0. V tej poskusni skupini je torej 8 čebel popilo enako število kapljic raztopine nižje in višje molarnosti.



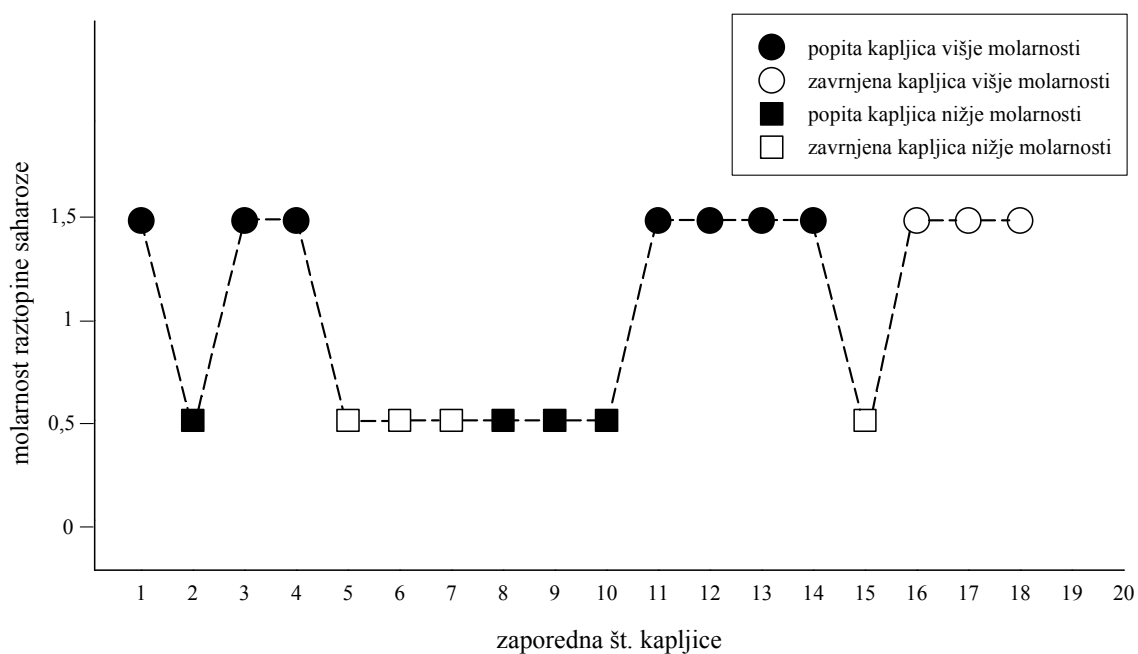
Slika 7: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 47.

#### 4.1.3 Poskusi s kapljicami 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze

14 čebel v tej poskusni skupini je začelo zavračati kapljice z nižjo molarnostjo takoj po tem, ko so popile prvo kapljico ali serijo kapljic višje molarnosti.

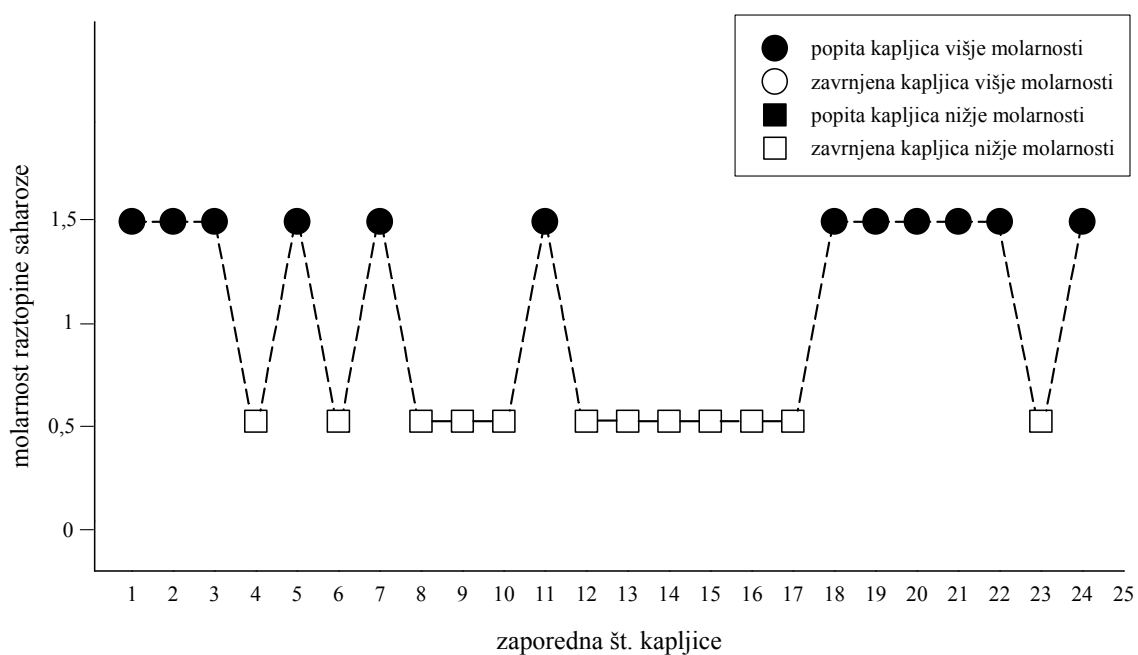
Za 4 čebele v tej poskusni skupini (63a, 64a, 71 in 78) s Fisherjevim testom nismo mogli dokazati statistično značilnih razlik med popitimi in nepopitimi oziroma med popitimi in zavrjenimi kapljicami obeh raztopin. Čebeli 64a in 71 tekom poskusa nista zavrnila niti ene kapljice nižje molarnosti. Čebela 63a je popila manj kot 10 kapljic, čebela 78 pa je po treh zavrjenih kapljicah ponovno začela piti kapljice 0,5 M raztopine saharoze (slika 8).





Slika 8: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 78.

V tej poskusni skupini štiri čebele niso spile niti ene kapljice 0,5 M raztopine saharoze. Primer je čebela 74 (slika 9).



Slika 9: Zaporedje popitih in zavrjenih kapljic čebele 74.

Za 29 od skupno 33 čebel je Fisherjev test pokazal statistično značilno preferenco za kapljice 1,5 M raztopine saharoze. Izračunane verjetnosti so prikazane v preglednici 4.

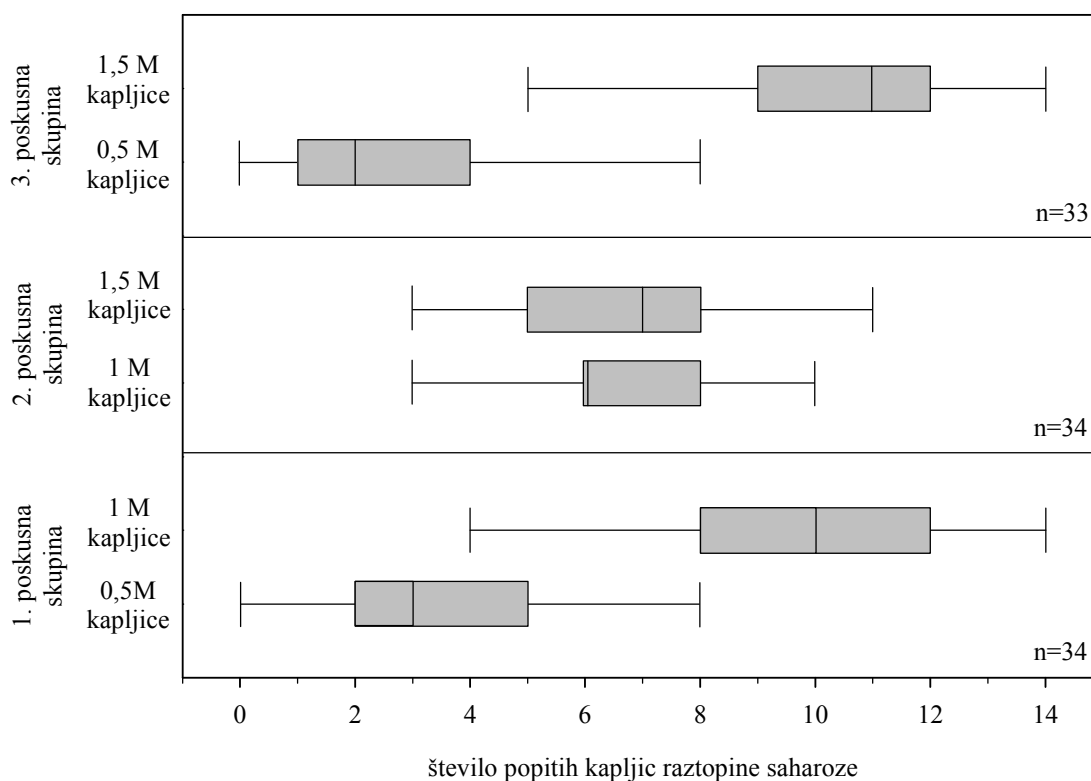
Preglednica 4: Rezultati Fisherjevega testa za čebele, ki so izbirale med kapljicami 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze. Verjetnosti manjše od 0,05 so statistično značilne in so zapisane odebeljeno.

oznaka čebele	verjetnosti (p)	
	(rezultati testa za popite in nepopite kapljice 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze)	(rezultati testa za popite in zavrnjene kapljice 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze)
61	1	<b>0,006</b>
62	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
63	<b>0,021</b>	<b>0,002</b>
63a	0,651	0,429
63b	<b>0,042</b>	
64	<b>0,008</b>	<b>&lt;0,001</b>
64a	0,714	
65	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
66	0,050	<b>0,001</b>
67	<b>0,021</b>	<b>&lt;0,001</b>
68	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
69	<b>0,009</b>	<b>0,001</b>
70	0,139	<b>0,035</b>
71	0,715	
72	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>
73	<b>0,002</b>	<b>&lt;0,001</b>
74	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
75	<b>0,009</b>	<b>&lt;0,001</b>
76	0,139	<b>0,011</b>
77	<b>0,009</b>	<b>&lt;0,001</b>
78	0,450	0,192
79	<b>0,021</b>	<b>&lt;0,001</b>
80	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
81	<b>0,027</b>	0,110
82	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
83	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
84	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
85	<b>0,025</b>	<b>&lt;0,001</b>
86	<b>0,003</b>	<b>&lt;0,001</b>
87	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
88	<b>0,002</b>	<b>0,004</b>
89	<b>0,021</b>	<b>&lt;0,001</b>
90	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>skupaj <math>p &lt; 0,05 / p \geq 0,05</math></b>	<b>25/8</b>	<b>27/3</b>

Wilcoxonov test je pokazal statistično značilno razliko med popitimi kapljicami 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze za to poskusno skupino čebel ( $p < 0,001$ ,  $Z = 4,903$ ,  $n = 33$ ).

#### 4.1.4 Primerjava popitih kapljic med poskusnimi skupinami

Primerjali smo mediane in kvartile popitih kapljic raztopin saharoze nižje in višje molarnosti vseh treh poskusnih skupin čebel. Vrednosti smo prikazali na vretenastem diagramu (ang. box-whiskers plot) (slika 10).

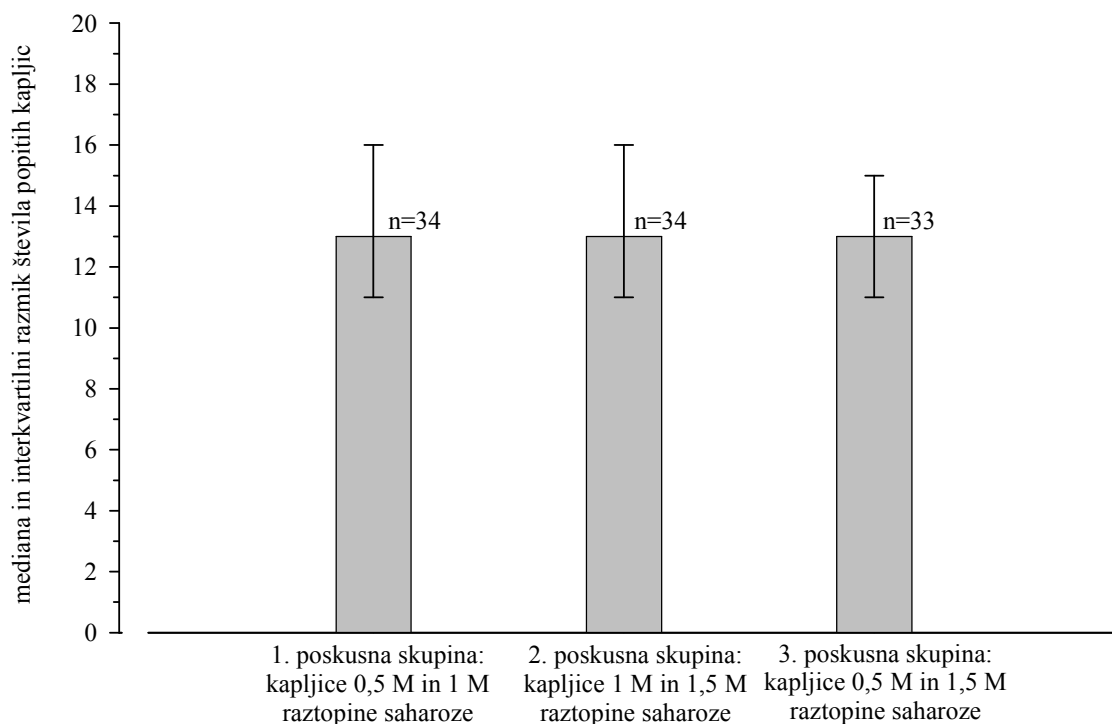


Slika 10: Vretenast diagram števila popitih kapljic raztopine saharoze nižje in višje molarnosti v vseh treh poskusnih skupinah. Na grafu so izrisani mediana, interkvartilni razmik in dejanski razpon vrednosti. Črka n označuje število čebel, ki so bile vključene v poskus.

V drugi poskusni skupini so čebele lahko izbirale med 1 M in 1,5 M kapljicami saharoze. Ker niso kazale preference za eno od obeh raztopin, sta kvartilna razmika popitih kapljic raztopin ene in druge molarnosti precej podobna. V prvi in tretji poskusni skupini so čebele raje pile kapljice raztopine saharoze z višjo molarnostjo, zato se znotraj poskusne skupine kvartilni razmik popitih kapljic višje molarnosti precej razlikuje od kvartilnega razmika popitih kapljic nižje molarnosti. Kvartilna razmika popitih kapljic raztopine višje

molarnosti prve in tretje poskusne skupine sta precej podobna, enako velja tudi za kvartilna razmika popitih kapljic nižje molarnosti.

Na sliki 11 so prikazani mediana, prvi in tretji kvartil za skupno število popitih kapljic v posameznih poskusnih skupinah. Mediane popitih kapljic vseh treh poskusnih skupin so enake, prav tako so si precej podobni tudi kvartilni razmiki.



Slika 11: Stolpični graf mediane in interkvartilnega razmika vseh popitih kapljic v treh poskusnih skupinah čebel. Višina stolpca predstavlja mediano popitih kapljic v posamezni poskusni skupini, interkvartilni razmik je označen z navpično črto. Črka n označuje število čebel, ki so bile vključene v poskus.

Število vseh popitih kapljic v treh poskusnih skupinah smo primerjali s Kruskal-Wallisovim testom, ki ni pokazal statistično značilnih razlik ( $H=0,292$ ,  $p=0,864$ , d.f.=2,  $N=101$ ). Tudi po Mann-Whitneyem testu med medianami popitih kapljic ni statistično značilnih razlik ( $P=0,882$  za 1. in 2. poskusno skupino;  $P=0,582$  za 2. in 3. poskusno skupino;  $P=0,748$  za 1. in 3. poskusno skupino).

## 4.2 KONTROLNI POSKUSI

### 4.2.1 Kontrolni poskus s kapljicami vode in 0,5 M raztopine saharoze

Na ploščo smo nanegli 15 kapljic vode in 15 kapljic 0,5 M raztopine saharoze. Od enajstih poskusnih čebel ni niti ena pila kapljic vode. Kapljice so sicer poskušale, a so jih vedno zavrnile. S tem smo želeli pokazati, da čebele tekom poskusa nimajo preferenc za pitje vode in da v poskusih nabirajo samo hranljive kapljice. Čebela 107a je spila samo 4 kapljice raztopine saharoze, zato je verjetnost po Fisherjevem testu nekoliko višja. Rezultati Fisherjevega testa so zbrani v preglednici 5.

Preglednica 5: Rezultati Fisherjevega testa za čebele, ki so izbirale med kapljicami vode in kapljicami 0,5 M raztopine saharoze. Verjetnosti manjše od 0,05 so statistično značilne in so zapisane odebelfjeno.

oznaka čebele	verjetnosti (p)	verjetnosti (p)
	(rezultati testa za popite in nepopite kapljice vode in 0,5 M raztopine saharoze)	(rezultati testa za popite in zavrnjene kapljice vode in 0,5 M raztopine saharoze)
101	<0,001	<0,001
102	0,003	<0,001
103	<0,001	<0,001
104	<0,001	<0,001
105	<0,001	<0,001
106	<0,001	<0,001
107	<0,001	<0,001
107a	0,030	0,0996
108	<0,001	<0,001
109	<0,001	<0,001
110	<0,001	<0,001
<b>skupaj</b>	<b>p&lt;0,05/p≥0,05</b>	<b>11/0</b>
		<b>10/1</b>

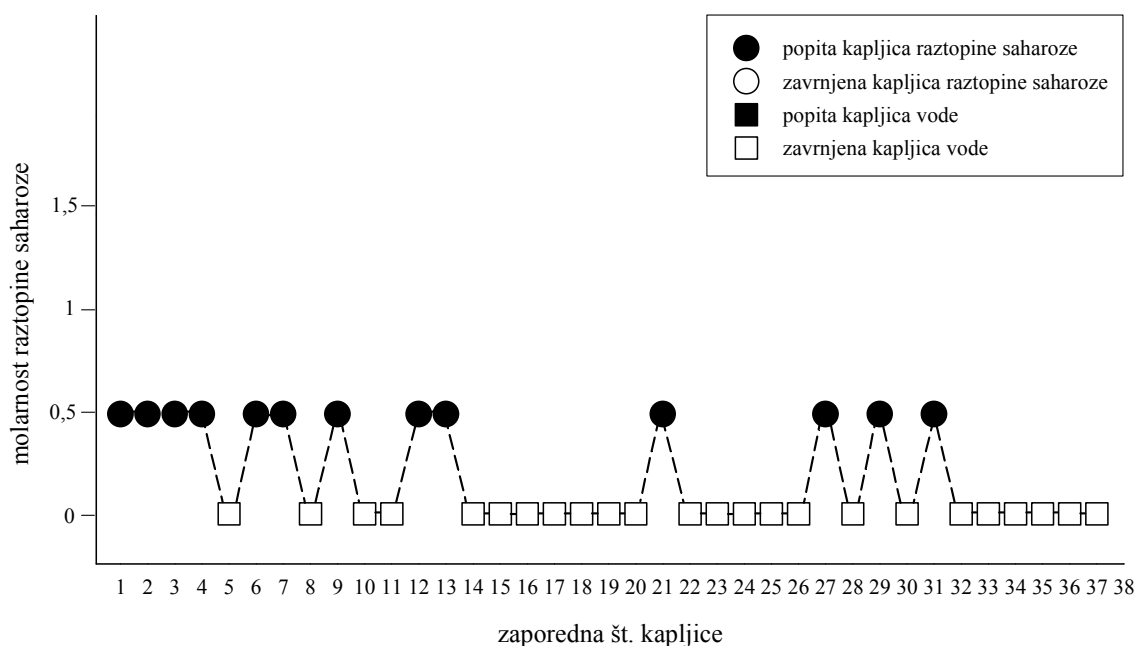
Potrebno je omeniti, da je postavitev tega kontrolnega poskusa precej drugačna od ostalih kontrolnih poskusov in poskusov z izbiro, saj je na plošči le 15 kapljic, ki čebeli predstavljajo hrano. Če bi na ploščo nanegli 30 kapljic raztopine saharoze in dodatnih 30 kapljic vode, bi bil ta kontrolni poskus primerljiv z ostalimi. Z vsako kapljico, ki jo čebela popije, se precej zmanjša verjetnost, da bo našla tudi naslednjo kapljico hrane. Manjše število kapljic raztopine saharoze je v večini primerov umetno prekinilo poskus. Čebele so sicer spile 10 do 13 sladkih kapljic, vendar niso našle še preostalih kapljic raztopine saharoze med množico nezanimivih kapljic vode in so iz tega razloga prenehale s

hranjenjem v poskusni komori. Mediana (10) popitih kapljic posameznih čebel v tej kontrolni skupini poskusov je tako precej manjša (preglednica 6).

Preglednica 6: Mediana, prvi in tretji kvartil popitih in zavrženih kapljic čebel, ki so izbirale med kapljicami vode in kapljicami 0,5 M raztopine saharoze.

	Q <sub>1</sub> (P=0,25)	Q <sub>2</sub> (P=0,5)	Q <sub>3</sub> (P=0,75)
popite kapljice vode	0	0	0
zavrjene kapljice vode	8	14	17
popite kapljice 0,5 M raztopine saharoze	10	10	13
zavrjene kapljice 0,5 M raztopine saharoze	0	0	0

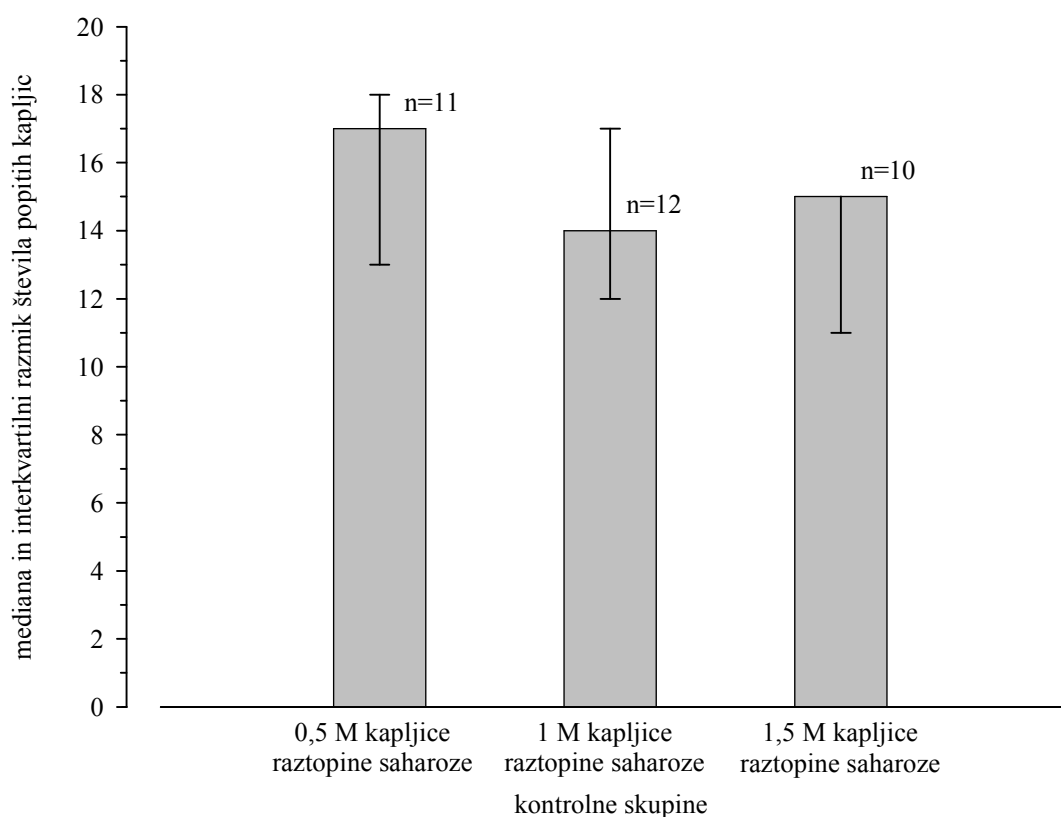
Na sliki 12 je prikazano zaporedje popitih in zavrženih kapljic iz poskusa s čebelo 106. Po 13. popiti kapljici raztopine saharoze je čebela še vedno iskala kapljice s saharozo. Ker jih ni našla, je odletela proti izhodu iz komore.



Slika 12: Zaporedje popitih in zavrženih kapljic čebele 106.

#### 4.2.2 Kontrolni poskusi s kapljicami raztopine saharoze enake molarnosti

V teh treh sklopih kontrolnih poskusov smo na ploščo nanесли 30 kapljic raztopine saharoze enake molarnosti. S tem smo želeli pokazati, da čebele pijejo kapljice raztopine določene molarnosti, čeprav jih v poskusih z izbiro zaradi prisotnosti raztopin z večjo vsebnostjo saharoze zavračajo. Izračunali smo mediano ter prvi in tretji kvartil popitih kapljic za vse tri sklope kontrolnih poskusov (slika 13).



Slika 13: Stolpični graf mediane in interkvartilnega razmika vseh popitih kapljic v treh kontrolnih skupinah čebel. Višina stolpca predstavlja mediano v posamezni poskusni skupini, interkvartilni razmik je označen z navpično črto. Črka n označuje število čebel, ki so bile vključene v poskus.

V kontrolne poskuse z 0,5 M kapljicami raztopine saharoze smo vključili 11 čebel, 12 v 1 M kontrolne poskuse in 10 v 1,5 M kontrolne poskuse. S Kruskal-Wallisovim testom smo testirali števila popitih kapljic v vseh treh kontrolnih skupinah čebel. Test ni pokazal statistično značilnih razlik med skupinami ( $H=3,267$ ,  $p=0,195$ ,  $d.f.=2$ ,  $N=33$ ). Prav tako

Mann-Whitneyev test ni pokazal statistično značilnih razlik med medianami števila popitih kapljic ( $P=0,088$  za 0,5 M in 1 M kontrolno skupino;  $P=0,947$  za 1 M in 1,5 M kontrolno skupino;  $P=0,188$  za 0,5 M in 1,5 M kontrolno skupino).

Če smo v Kruskal-Wallisov test vključili še kontrolo s kapljicami vode in 0,5 M raztopine saharoze, je pokazal statistično značilno razliko med temi štirimi skupinami ( $H=12,515$ ,  $p=0,006$ , d.f.=3,  $N=44$ ). Vzrok tega je v manjšem razpoložljivem številu kapljic hrane (samo 15 kapljic raztopine saharoze) v kontrolnem poskusu z vodo. Po Mann-Whitneyevem testu se tudi mediana števila popitih kapljic v kontroli s kapljicami vode statistično značilno razlikuje od median števila popitih kapljic v ostalih treh kontrolnih skupinah ( $P<0,05$  za vse tri primerjane pare).

S Kruskal-Wallisovim testom smo primerjali tudi števila vseh popitih kapljic čebel v treh poskusnih skupinah in treh kontrolnih skupinah. Kontrolne skupine z vodo nismo vključili. Test ni pokazal statistično značilnih razlik med popitimi kapljicami v šestih poskusnih skupinah ( $H=6,384$ ,  $p=0,271$ , d.f.=5,  $N=134$ ). Mann-Whitneyev test je pokazal statistično značilne razlike le med mediano popitih kapljic 0,5 M kontrolne skupine in medianami popitih kapljic v poskusih z izbiro ( $P<0,05$  za vse tri primerjane pare).



### 4.3 HPLC ANALIZA VZORCEV RAZTOPIN SAHAROZE

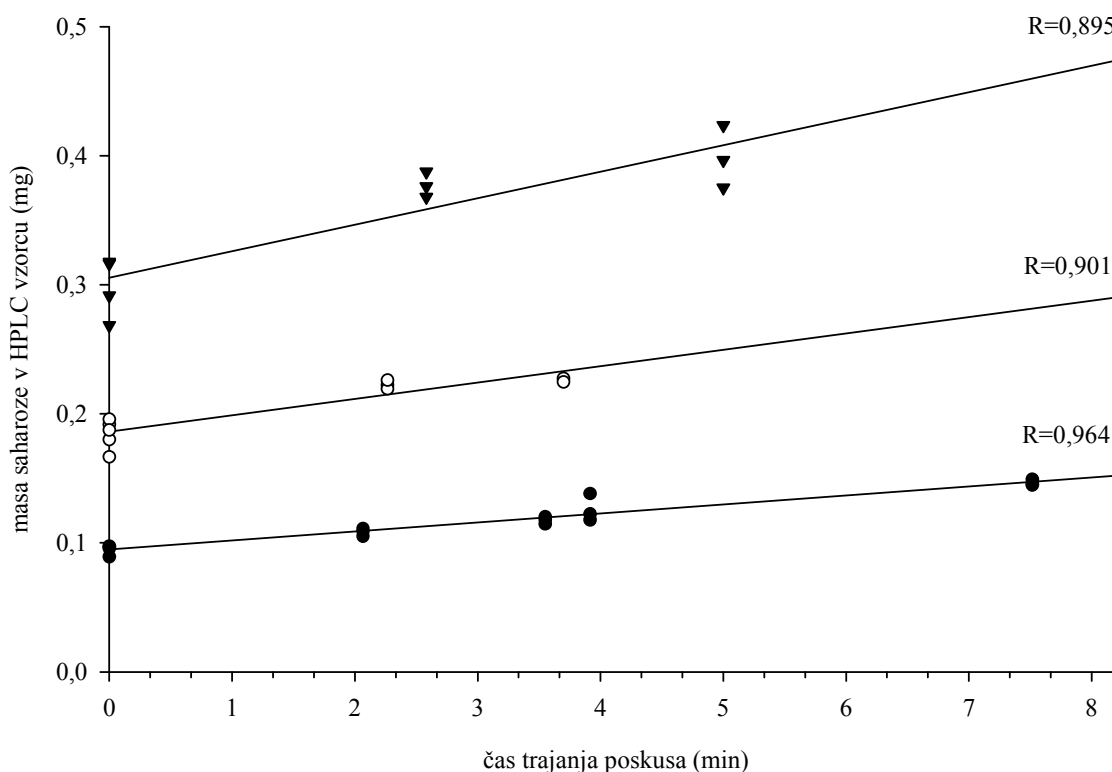
Po končanih poskusih smo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) analizirali vsebnosti saharoze v 1  $\mu\text{L}$  vzorcih kapljic raztopine saharoze iz poskusov ter v 1  $\mu\text{L}$  vzorcih kontrolnih (začetnih) raztopinah. Iz umeritvene krivulje smo odčitali dejanske vsebnosti saharoze v HPLC vzorcih. Glede na volumen analizirane raztopine (40  $\mu\text{L}$ ) smo izračunali koncentracijo saharoze v naših vzorcih. Vrednosti koncentracij saharoze v začetnih (kontrolnih) raztopinah so bile precej previsoke, glede na to, da poznamo njihove dejanske koncentracije (171 g/L, 342 g/L in 513 g/L). Zato smo pri statističnih analizah uporabljali le maso saharoze v HPLC vzorcih, ki smo jih odčitali iz umeritvene krivulje, in ne preračunanih vrednosti koncentracij saharoze. Rezultati HPLC analize so zbrani v prilogi C.

Rezultati HPLC analize kontrolnih raztopin so bili precej variabilni. Iz nadaljne statistične analize smo izločili dva podatka, ki sta po Grubbsovem testu statistično značilno odstopala od ostalih. F-test varianc med 0,5 M in 1,5 M ter med 1 M in 1,5 M kontrolnimi raztopinami je pokazal statistično značilne razlike ( $P < 0,001$ ,  $F = 10,820$ , d.f.n.=13, d.f.d.=13;  $P = 0,007$ ,  $F = 4,547$ , d.f.n.=13, d.f.d.=12). Studentov t-test za statistično značilno različne variance je pokazal statistično značilne razlike med povprečnimi vrednostmi v obeh skupinah ( $P < 0,001$ ,  $t = 27,674$ , d.f.=15;  $P < 0,001$ ,  $t = 12,316$ , d.f.=18). Variance 0,5 M in 1 M kontrolnih raztopin po F-testu niso statistično značilno različne ( $P = 0,068$ ,  $F = 2,380$ , d.f.n.=12, d.f.d.=13), povprečji se po Studentovem t-testu statistično značilno razlikujeta ( $P < 0,001$ ,  $t = 26,960$ , d.f.=25).

Eden od možnih razlogov za previsoke vrednosti koncentracij saharoze v začetnih kontrolnih raztopinah je, da je HPLC naprava dejansko analizirala več kot 40  $\mu\text{L}$  od 100  $\mu\text{L}$  vzorca. Dobljene vsebnosti saharoze v vzorcih po HPLC analizi smo delili z vrednostmi, ki bi jih pričakovali po analizi vzorca z volumnom 40  $\mu\text{L}$ . Tako smo dobili faktorje, ki nam povedo, za koliko so dobljene vrednosti vsebnosti saharoze previsoke. Te faktorje smo analizirali s F-testom ter Studentovim t-testom, ki sta pokazala, da med variancami in povprečji faktorjev ni statistično značilnih razlik. Pri 0,5 M začetnih

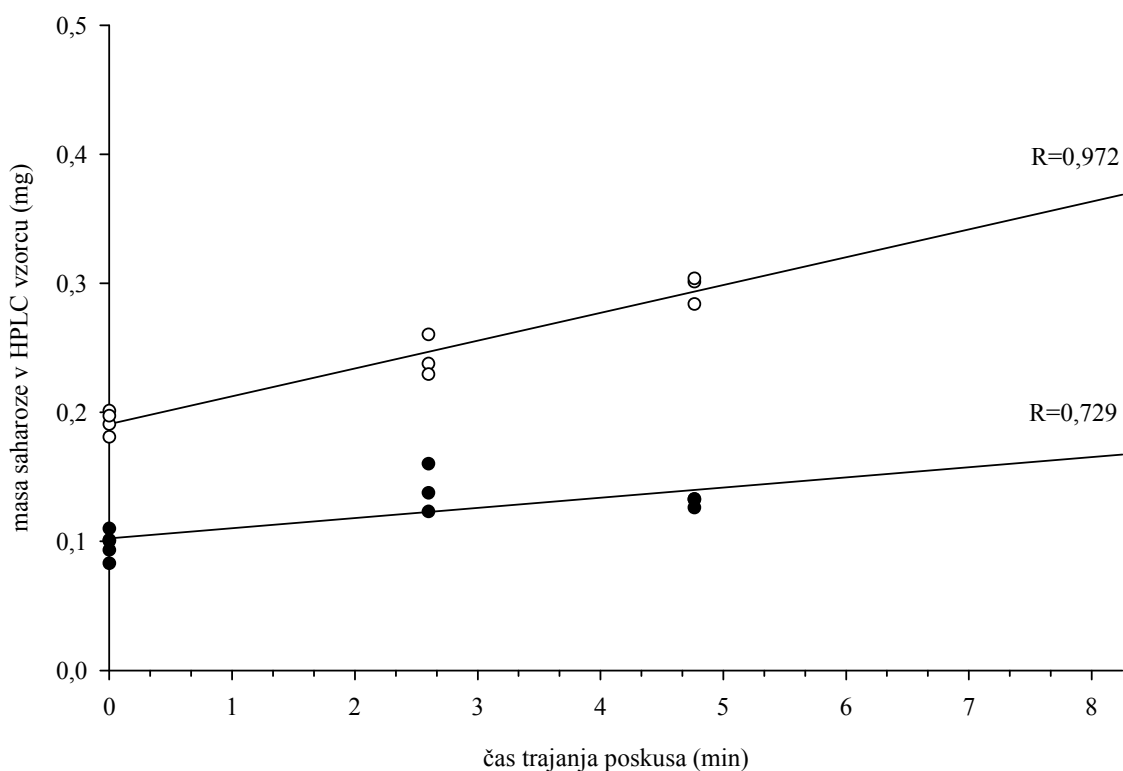
raztopinah so bile dobljene vrednosti po HPLC analizi previsoke za faktor  $1,39 \pm 0,10$ , pri 1 M za faktor  $1,38 \pm 0,08$ , pri 1,5 M začetnih kontrolnih raztopinah pa za faktor  $1,33 \pm 0,11$ .

Kljub previsokim rezultatom HPLC analize smo primerjali maso saharoze v analiziranih vzorcih, saj nam vseeno lahko prikaže trend spreminjanja koncentracij raztopin v kapljicah. Slika 14 prikazuje trend spreminjanja mase saharoze v analiziranih vzorcih iz treh kontrolnih skupin v času. Začetne (kontrolne) raztopine saharoze koncentracije imajo  $t=0$ , vzorci iz poskusov pa čas izhlapevanja enak dolžini poskusa.



Slika 14: Masa saharoze v HPLC vzorcih iz kontrolnih poskusov. Začetne raztopine saharoze imajo čas izhlapevanja  $t=0$ , vzorci kapljic iz poskusov pa čas izhlapevanja enak dolžini poskusa. S polnimi krogi je označena masa saharoze v vzorcih iz kontrolnih poskusov z 0,5 M raztopino saharoze (čebele 112, 104, 111, 103) in njihove pripadajoče začetne raztopine. Prazni krogi predstavljajo maso saharoze v vzorcih iz 1 M poskusov (čebeli 126 in 125), trikotniki iz kontrolnih poskusov z 1,5 M raztopino saharoze (čebeli 133 in 139). Črte predstavljajo regresijske premice teh vrednosti. Njihove formule so  $y=0,00699x+0,0947$  za 0,5 M kapljice,  $y=0,0127x+0,186$  za 1 M ter  $y=0,0205x+0,305$  za kapljice 1,5 M raztopine saharoze. Nad premicami so izpisani pripadajoči korelacijski koeficienti R.

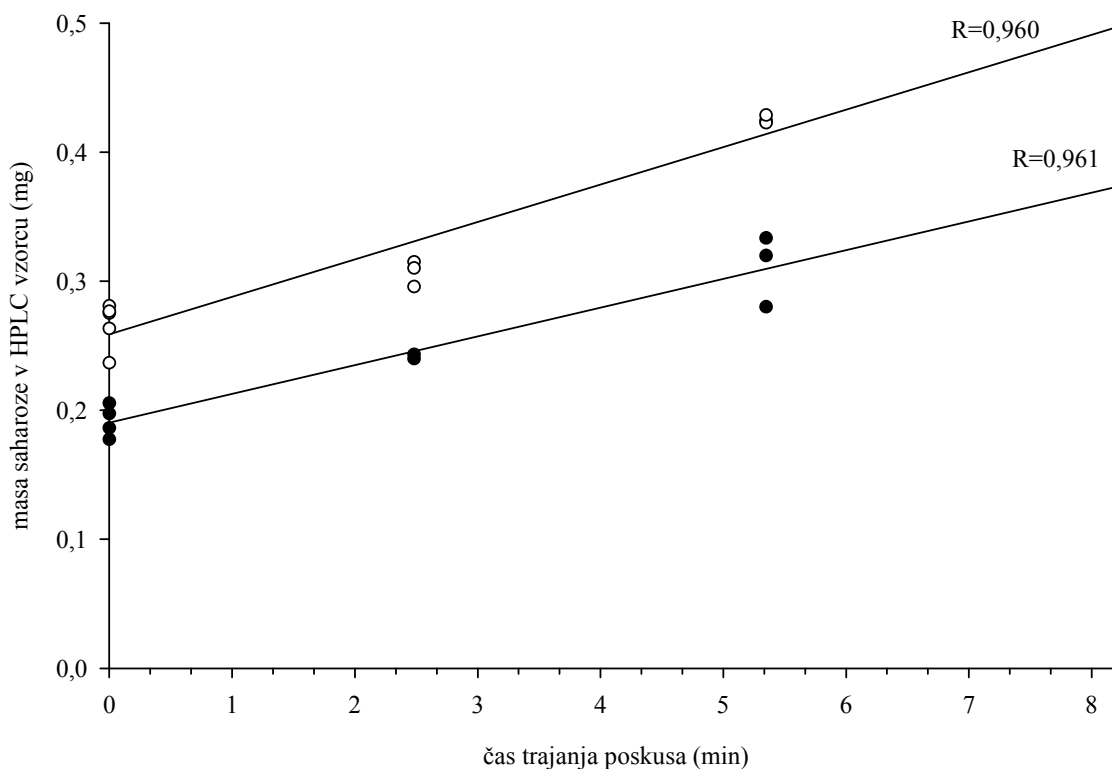
Poudariti moramo, da so to vzorci kapljic iz različnih poskusov, ki so potekali v različnih pogojih (različna temperatura in relativna zračna vlaga) in jih iz tega razloga ne smemo neposredno primerjati. Spremembi koncentracij raztopine saharoze kapljic v enakih pogojih, torej znotraj enega poskusa na posamezni čebeli, lahko vidimo v sledečih grafih (slika 15, 16 in 17).



Slika 15: Masa saharoze v HPLC vzorcih iz poskusa s čebelo 8 ( $t=2:36$ ,  $T=29^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RZV}=57\%$ ) in čebelo 29 ( $t=4:46$ ,  $T=29^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RZV}=58\%$ ). Začetne raztopine saharoze imajo čas izhlapevanja  $t=0$ , vzorci kapljic iz poskusov pa čas izhlapevanja enak dolžini poskusa. S polnimi krogi je označena masa saharoze v vzorcih iz 0,5 M kapljic in njihovih pripadajočih začetnih raztopin. Prazni krogi označujejo maso saharoze v vzorcih 1 M kapljic. Črti predstavljata regresijski premici teh vrednosti. Njuni formuli sta  $y=0,00791x+0,102$  za 0,5 M kapljice ter  $y=0,0216x+0,191$  za 1 M kapljice. Nad premicama sta izpisana pripadajoča korelacijska koeficienta R.

Iz slik 14 in 15 je razvidno, da je naraščanje mase saharoze hitrejše v kapljicah z višjo začetno koncentracijo saharoze in počasnejše v kapljicah z nižjo začetno koncentracijo

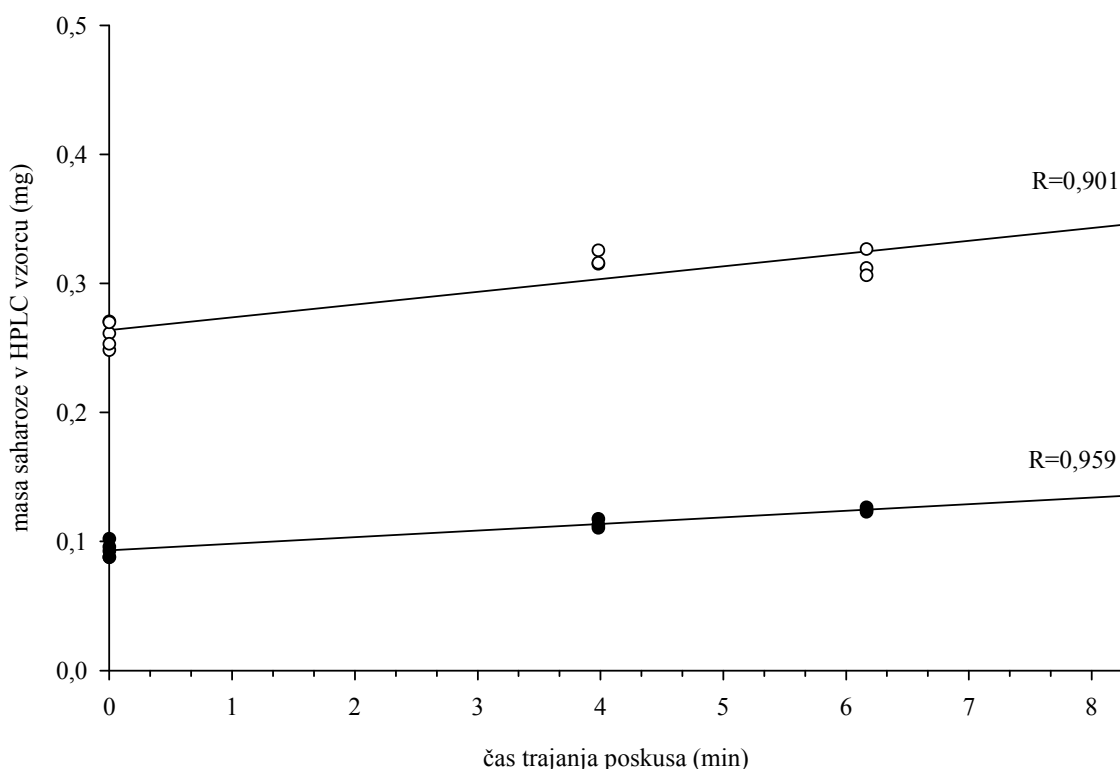
raztopine saharoze. To pomeni, da se absolutna razlika med koncentracijama kapljic dveh raztopin saharoze med poskusom še povečuje.



Slika 16: Masa saharoze v HPLC vzorcih iz poskusa s čebelo 60 ( $t=2:29$ ,  $T=28^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RZV}=49\%$ ) in čebelo 38 ( $t=5:21$ ,  $T=29^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RZV}=37\%$ ). Začetne raztopine saharoze imajo čas izhlapevanja  $t=0$ , vzorci kapljic iz poskusov pa čas izhlapevanja enak dolžini poskusa. S polnimi krogi je označena masa saharoze v vzorcih iz 1 M kapljic in njihovih pripadajočih začetnih raztopin. Prazni krogi predstavljajo maso saharoze v vzorcih 1,5 M kapljic. Črti predstavljata regresijski premici teh vrednosti. Njuni formuli sta  $y=0,022x+0,189$  za 1 M kapljice ter  $y=0,0279x+0,258$  za 1,5 M kapljice. Nad premicama sta izpisana pripadajoča korelacijska koeficienta R.

Naraščanje mase saharoze v vzorcih 1 M kapljic je precej podobno v poskusih s čebelama 60 in 38 (slika 16) ter v poskusih s čebelama 8 in 29 (slika 15), saj so bili pogoji v komori precej podobni. V poskusih s čebelama 126 in 125 pa je temperatura veliko nižja ( $T=25$  in  $24^{\circ}\text{C}$ ) in relativna zračna vlaga precej višja (61 in 64%), zato lahko vidimo, da masa saharoze narašča počasneje.

Podoben vpliv temperature in relativne zračne vlage na povečevanje mase saharoze v 1  $\mu\text{L}$  vzorcih iz kapljic lahko vidimo v poskusih s čebelama 8 in 29 (slika 15), kjer je masa saharoze v vzorcih 0,5 M kapljic naraščala veliko hitreje kot v poskusih s čebelama 71 in 76 (slika 17). Enako velja za povečevanje mase saharoze v vzorcih 1,5 M kapljic. V poskusih s čebelama 60 in 38 (slika 16), kjer sta bili temperaturi zelo visoki (28 in 29°C), relativna zračna vlaga pa izrazito nizka (49 in 37%), je bilo naraščanje mase saharoze v 1  $\mu\text{L}$  vzorcih iz 1,5 M kapljic najhitrejše.



Slika 17: Masa saharoze v HPLC vzorcih iz poskusa s čebelo 71 ( $t=3:59$ ,  $T=26^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RZV}=61\%$ ) in čebelo 76 ( $t=6:10$ ,  $T=27^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{RZV}=63\%$ ). Začetne raztopine saharoze imajo čas izhlapevanja  $t=0$ , vzorci kapljic iz poskusov pa čas izhlapevanja enak dolžini poskusa. S polnimi krogi je označena masa saharoze v vzorcih iz 0,5 M kapljic in njihovih pripadajočih začetnih raztopin. Prazni krogi predstavljajo maso saharoze v vzorcih 1,5 M kapljic. Črti predstavljata regresijski premici teh vrednosti. Njuni formuli sta  $y=0,00511x+0,0931$  za 0,5 M kapljice ter  $y=0,0099x+0,264$  za 1,5 M kapljice. Nad premicama sta izpisana pripadajoča korelacijska koeficienta R.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V poskusih s kapljicami 0,5 M in 1 M raztopine saharoze (1. poskusna skupina) ter v poskusih s kapljicami 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze (3. poskusna skupina) je večina poskusnih čebel raje pila kapljice z višjo vsebnostjo saharoze. Preferenca za kapljice z višjo vsebnostjo sladkorja se je kazala v zavračanju kapljic saharoze z nižjo molarnostjo in iskanju kapljic z višjo molarnostjo na poskusni plošči. Čebela je vsako kapljico, ki jo je našla na plošči, poskusila in sicer tako, da je vanjo pomočila rilček (proboscis). Če je bila kapljica višje molarnosti, jo je spila. Zavrnjene kapljice je čebela najprej poskusila in jih nato pustila.

Le nekaj čebel je začelo zavračati kapljice z manjšo vsebnostjo saharoze takoj, ko so prvič popile eno ali več zaporednih kapljic saharoze višje molarnosti. Ostale čebele so začele zavračati kapljice šele kasneje. Eden od možnih razlogov je količina kapljic, ki so jih te čebele predhodno popile. Na začetku hranjenja na plošči so čebele lačne in so jim vse kapljice dovolj dobre. Ko so do določene mere site, začnejo zavračati kapljice z manjšo vsebnostjo saharoze, da bi do konca hranjenja s pitjem kapljic privzele čim več saharoze. Že Page in sod. (1998) so opazovali, da se sita oziroma predhodno hranjena čebela odziva s PER pri višjih koncentracijah raztopine saharoze, kot če je lačna. Lačne čebele imajo tako večjo odzivnost na saharozo in pijejo tudi nižje koncentracije sladkih raztopin.

Poleg zavračanja kapljic raztopine saharoze z nižjo molarnostjo med hranjenjem smo pri večini čebel v vseh poskusnih skupinah lahko opazovali tudi zavračanje kapljic pred koncem poskusa. Po zadnji popiti kapljici so hodile po plošči in poskušale kapljice obeh raztopin, nato pa so odletele proti izhodu iz komore. Te čebele so najbrž bile še vedno motivirane za iskanje in poskušanje kapljic, čeprav so že bile site. Lahko da so čebele s tem preverjale razpoložljivost hrane na krmišču. Na to sta opozarjala že Menzel in Greggers (1992), ki trdita, da čebele na paši ne nabirajo samo hrane, torej energije, ampak tudi informacije o razmerah in razpoložljivosti hrane na paši. Za konec poskusa smo tako določili zadnjo popito kapljico in v statistično obdelavo nismo vključili kapljic, ki jih je

čebela pred odhodom le poskušala. Zavračanje kapljic pred koncem poskusa smo opazili tudi pri kontrolnih poskusih, v katerih so čebele pile kapljice raztopine saharoze enake molarnosti. Te čebele so poskusile eno do največ dve kapljici. V poskusih z izbiro pa so čebele po zadnji popiti kapljici največkrat poskusile še eno ali dve kapljici, največ 7 kapljic.

Čebele so med pitjem kapljic večinoma hodile po plošči. Če po več poskušanih kapljicah niso našle kapljic, ki bi bile zanimive, so odletele na drugo stran plošče in tam nadaljevale z iskanjem kapljic. Pri nekaterih čebelah smo opazili še letenje na krajšo razdaljo. Te čebele so se za krajši čas dvignile nad ploščo, ponovno pristale le kakšen centimeter proč in nadaljevale s pitjem kapljic. Vendar so popile le še nekaj kapljic in nato odletele proti izhodu iz komore. Med hranjenjem na plošči so si čebele večkrat čistile tipalnice in rilček. Nekaj čebel je ob prihodu v komoro "označevalo" mesto hranjenja. Te čebele so stale na mestu, v vhodnem tunelu ali ob stekleni plošči s kapljicami, z dvignjenim zadkom in zamahovale s krili. Ta pojav je opisoval že von Frisch (1965) na umetnih krmiščih. Čebele na ta način izločajo vonjave iz vonjalne žleze na zadku in s tem privabljajo ostale pašne čebele na krmišče.

V prvi poskusni skupini štiri čebele niso niti enkrat tekom hranjenja zavrnilo kapljice 0,5M raztopine saharoze, v tretji poskusni skupini le dve čebeli. Te čebele so večinoma popile tudi zelo majhno število kapljic. Ostale čebele so začele zavračati kapljice nižje molarnosti že na začetku poskusa ali šele ob koncu poskusa. Tako lahko vidimo, da se čebele različno odzivajo na razmere na krmišču. Nekaterim sta obe raztopini dovolj dobri, večina čebel pa zavrača kapljice z manjšo vsebnostjo saharoze, ene bolj in druge manj izrazito.

S Fisherjevim testom smo ugotavljali statistično značilne razlike med številom popitih in nepopitih kapljic raztopine saharoze višje in nižje molarnosti. Za analizo smo lahko po končanem poskusu preprosto prešteli kapljice, ki so po hranjenju ostale na plošči. V prvi poskusni skupini čebel z 0,5 M in 1 M kapljicami raztopine saharoze smo pokazali statistično značilne razlike med popitimi in nepopitimi kapljicami obeh raztopin pri 17 čebelah, v tretji poskusni skupini z 0,5 M in 1,5 M kapljicami pa pri 25 čebelah. Čebele, pri katerih test ni pokazal statistično značilnih razlik, a so tekom poskusa zavračale

kapljice nižje molarnosti, smo ponovno testirali. Uporabili smo frekvence popitih in poskušanih (zavrjenih) kapljic nižje in višje molarnosti. V prvi poskusni skupini smo s tem testom pokazali statistično značilne razlike še pri treh čebelah, v tretji poskusni skupini še pri štirih čebelah.

V poskusni skupini s kapljicami 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze torej kaže izrazito preferenco za raztopino višje molarnosti več čebel (29), kot v poskusni skupini s kapljicami 0,5 M in 1 M raztopine saharoze (20). Večja kot je torej absolutna razlika med vsebnostima saharoze v kapljicah, izrazitejša in bolj očitne so preference posameznih čebel za kapljice z višjo vsebnostjo saharoze.

Testa nista pokazala statistično značilnih razlik pri čebelah, ki so popile premajhno število kapljic (manj kot 10). Večina teh čebel tekom hranjenja tudi ni zavračala kapljic z nižjo molarnostjo ali pa so pred zadnjo popito kapljico zavrnilo eno do največ dve kapljici. Statistično značilnih razlik prav tako nismo mogli pokazati pri nekaterih čebelah, ki so začele zavračati kapljice z nižjo molarnostjo šele proti koncu poskusa. Števili popitih kapljic obeh raztopin sta pred začetkom zavračanja kapljic precej podobni in tako nekaj zavrjenih kapljic ob koncu poskusa ne spremeni rezultata statističnega testa.

Večina čebel v poskusih s kapljicami 1 M in 1,5 M raztopine saharoze ni zavračala kapljic nižje molarnosti. Očitno sta bili obe raztopini saharoze za njih dovolj dobri. Le 5 čebel v tej poskusni skupini je tekom poskusa zavrnilo eno ali največ dve kapljici 1M raztopine saharoze. Na podlagi vedenja čebel na krmišču v komori lahko sklepamo, da v tej poskusni skupini čebele niso kazale preferenc za raztopino z višjo vsebnostjo saharoze. Fisherjev test prav tako ni pokazal statistično značilnih razlik med popitimi in nepopitimi kapljicami ene in druge raztopine.

Z Wilcoxonovim testom za parne meritve smo pokazali, da v poskusih s kapljicami 1 M in 1,5 M raztopine saharoze ni statistično značilnih razlik med popitimi kapljicami višje in nižje molarnosti. V ostalih dveh poskusnih skupinah, kjer so čebele kazale preferenco za kapljice višje molarnosti, se števili popitih kapljic raztopine saharoze višje in nižje molarnosti po Wilcoxonovem testu statistično značilno razlikujeta.



Čebele dobro razlikujejo med koncentracijami sladkornih raztopin, ki smo jih uporabljali v poskusih. S kontrolnimi poskusi smo pokazali, da so bile vse tri raztopine saharoze, ki smo jih uporabljali v poskusih, dovolj dobre za pašo čebel v trenutnih razmerah. V kontrolnih poskusih z 0,5 M raztopino saharoze čebele niso zavračale kapljic, čeprav jih zavračajo, kadar imajo na voljo še kapljice z višjo vsebnostjo saharoze (poskusi z izbiro). Na umetnem krmišču pred laboratorijem, ki so ga čebele množično obiskovale, smo uporabljali raztopino sladkorja s koncentracijo 110 g/L. Vse te raztopine so očitno zadovoljevale trenutne pašne potrebe čebel.

Pomembno je poudariti, da opazovane preference pri poskusnih čebelah niso stalne. Če bi poskuse izvajali v drugem obdobju leta, bi najbrž opazili drugačne preference. Prav tako bi lahko nanje vplivale tudi spremembe v pašnih in vremenskih pogojih ter spremembe v panju (npr. potrebe čebelje družine). V obdobju treh tednov izvajanja poskusov bi se lahko pojavile zunanje (vremenski pogoji, pašni pogoji) in notranje spremembe (potrebe čebelje družine), ki bi vplivale na motiviranost čebel in s tem spremenile preferenco čebel za določene koncentracije sladkorjev. Predvidevamo, da bi sprememba motiviranosti čebel lahko vplivala tudi na količino popite raztopine oziroma število popitih kapljic posamezne čebele. Iz tega razloga smo testirali morebitne razlike v številih popitih kapljic vseh poskusnih skupin čebel.

Prva dva sklopa poskusov z izbiro smo izvedli na začetku, tretji sklop poskusov z izbiro pa šele po treh tednih. V vseh treh poskusnih skupinah čebel je mediana popitih kapljic 13, kar pomeni, da je večina čebel popila približno 52  $\mu$ L raztopine. Največ kapljic je popila čebela 67 in sicer 19 (skupen volumen 76  $\mu$ L). To so seveda teoretični volumni, saj tekom poskusa kapljice izhlapevajo in se njihov volumen nekoliko zmanjša. Kruskal-Wallisov test in Mann-Whitneyev test nista pokazala statistično značilnih razlik v številu vseh popitih kapljic med tremi poskusnimi skupinami.

V kontrolnih poskusih s kapljicami raztopine saharoze enake molarnosti smo testirali manjše število čebel, pa vendar so mediane popitih kapljic precej podobne. Kruskal-Wallisov test in Mann-Whitneyev test nista pokazala statistično značilnih razlik med števili popitih kapljic v vseh treh kontrolnih skupinah. Le mediana popitih kapljic v kontrolnem

poskusu z 0,5 M raztopino saharoze se statistično značilno razlikuje od median popitih kapljic v poskusih z izbiro.

Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da v obdobju treh tednov izvajanja poskusov ni prišlo do sprememb v motiviranosti čebel, ki bi vplivala na količino popitih kapljic raztopine saharoze oziroma na spremembe preferenc za določene koncentracije sladkornih raztopin.

V sušnih poletnih mesecih lahko pride do značilnega pomanjkanja razpoložljive vode v naravi. Zato smo na umetno krmišče na okenski polici postavili še dodaten krmilnik z vodo. Čebele potrebujejo vodo za ohranjanje primerne fiziološkega stanja, kot tudi za ohranjanje primerne temperature v panju (von Frisch, 1965). Predvidevali smo, da bi lahko pomanjkanje vode pri čebelah vplivalo na hranjenje čebel v poskusni komori in njihove preference za sladkorne raztopine. Žejne čebele bi najbrž raje pile kapljice, ki vsebujejo več vode (kapljice z manjšo vsebnostjo saharoze). Zato smo izvedli poskuse še z eno kontrolno skupino čebel, ki so imele na plošči na voljo 15 kapljic vode in 15 kapljic 0,5 M raztopine saharoze. Čebele so pile le kapljice s saharozo, ne pa tudi kapljic vode. S tem smo pokazali, da čebele, ki priletijo v umetno komoro, nabirajo le hranljive kapljice, kapljice vode pa jih ne zanimajo.

Med poskusom se koncentracija saharoze v kapljicah spreminja zaradi izhlapevanja vode. Na izhlapevanje kapljic vpliva oblika kapljic, temperatura, relativna zračna vlaga, pretok zraka ter čas izhlapevanja. Zanimalo nas je, do kakšne mere se spremeni koncentracija saharoze v kapljicah in kako to spremeni razmerje med dvema koncentracijama kapljic na plošči. Spremembe koncentracij raztopine saharoze med poskusom ne vplivajo na izbiranje pri čebelah, saj tekom poskusov nismo opazili, da bi čebele ponovno pile kapljice, ki so jih na začetku poskusov zavračale.

Koncentracija raztopine saharoze v kapljicah z višjo vsebnostjo saharoze se je v primerjavi s kapljicami z nižjo vsebnostjo saharoze hitreje višala. Tekom poskusa sta se torej absolutni razliki oziroma razmerje med obema koncentracijama raztopine saharoze na plošči še povečevali. To je morda eden od razlogov, da nekatere čebele začnejo zavračati

kapljice z manjšo vsebnostjo saharoze šele ob koncu poskusa. Hitrejše naraščanje koncentracij saharoze v kapljicah z višjo vsebnostjo saharoze lahko razložimo s tem, da iz vsake kapljice, ne glede na njeno koncentracijo, izhlapi enaka količina vode. V kapljicah z nižjo vsebnostjo saharoze je delež vode večji kot v kapljicah z višjo vsebnostjo saharoze. Pri odvzemu enakega volumna vode iz kapljic se torej koncentracija v kapljicah z višjo vsebnostjo saharoze bolj poveča kot koncentracija saharoze v kapljicah z nižjo vsebnostjo saharoze.

Vzrok za previsoke izračunane vrednosti koncentracij saharoze v začetnih (kontrolnih) raztopinah po HPLC analizi je najbrž v volumnu analiziranega vzorca. Glede na rezultate predvidevamo, da so previsoke vrednosti lahko posledica napake v injicirnem sistemu HPLC naprave ali napake pipete, s katero smo vzeli vzorce iz kontrolnih raztopin. Posledica načina pipetiranja, napake pipete ali napake HPLC naprave so najbrž tudi velike variance med posameznimi vzorci iste kontrolne raztopine.

## 5.2 UPORABNOST METODE ZA NADALJNE RAZISKAVE

V poskusih smo ugotovili značilno spreminjanje koncentracij raztopine saharoze v kapljicah zaradi izhlapevanja. Ena od možnih rešitev za zmanjšanje razlik v izhlapevanju med poskusi bi bila uporaba komore s stalno temperaturo in relativno zračno vlago.

Namesto steklenih plošč z ugreznitvami bi lahko uporabljali tudi titrske plošče. Primerno bi bilo povečati število kapljic na plošči (npr. 48 kapljic raztopine saharoze, 24 nižje in 24 višje koncentracije) in obenem zmanjšati volumen kapljic na 3  $\mu$ L. Tako bi čebele med posameznim poskusom popile več kapljic, kar bi povečalo razliko med popitimi in zavrnenimi (poskušenimi) kapljicami in povečalo občutljivost statističnega testa.

Štetje popitih in nepopitih kapljic na plošči po končanem poskusu se je izkazalo za primerno metodo, saj ni bistvenih razlik med rezultati statističnega testa popitih in poskušenih kapljic ter med rezultati testa popitih in nepopitih kapljicami.

S tako izpopolnjeno metodo bi lahko raziskovali vpliv primesi v hrani na pašne čebele. Uporabljali bi lahko kapljice 0,5 M in 1 M ali pa 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze, ki bi ji primešali testne snovi. Na ta način bi lahko opazovali njihov vpliv na pašno aktivnost in preference pri prvem obisku krmišča in/ali spremembe v pašni aktivnosti ter preferencah v več zaporednih obiskih. Takšen test bi bil primeren za testiranje subletalnih učinkov pesticidov, s katerimi se čebele pogostokrat srečujejo na paši.

### 5.3 SKLEPI

Preferenca posamezne čebele za raztopino saharoze višje molarnosti se kaže z zavračanjem kapljic nižje molarnosti in iskanjem kapljic z višjo vsebnostjo saharoze na poskusni plošči. Če čebela pri iskanju dalj časa ne najde nobene kapljice višje molarnosti, začne spet piti kapljice raztopine saharoze nižje molarnosti. Hranjenje brez zavračanja kapljic nam nakazuje, da čebela nima preferenc za eno od obeh raztopin.

Čebele izbirajo med kapljicami 0,5 M in 1 M raztopine saharoze. Če razliko med koncentracijama na krmišču povečamo (poskusi s kapljicami 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze), kaže preferenco za raztopino višje molarnosti več čebel.

Nekatere čebele začnejo zavračati kapljice saharoze nižje molarnosti takoj za tem, ko prvič popijejo kapljico ali serijo kapljic višje molarnosti, ostale čebele pa začnejo zavračati kapljice šele kasneje v poskusu.

Čebele ne izbirajo med kapljicami 1 M in 1,5 M raztopine saharoze. Očitno obe raztopini zadostujeta potrebam čebel v trenutnih razmerah. Izbiranje med dvema raztopinama saharoze z nižjima vsebnostima saharoze se torej razlikuje od izbiranja med dvema raztopinama saharoze z višjima vsebnostima saharoze.

Koncentracija raztopine saharoze se tekom poskusa spreminja glede na čas trajanja poskusa, temperaturo in relativno zračno vlago v komori med poskusom. Koncentracije naraščajo hitreje pri višji temperaturi in pri nižji relativni zračni vlagi. Koncentracija kapljic raztopine z višjo vsebnostjo saharoze narašča hitreje kot koncentracija kapljic raztopine z nižjo vsebnostjo saharoze.

Metoda je uporabna za nadaljne študije vplivov pesticidov in ostalih strupov na pašno aktivnost čebel ter na spremembe v preferencah za različne raztopine v več zaporednih obiskih.

## 6 POVZETEK

Pašne čebele nabirajo sladke tekočine, cvetni prah in vodo ter s tem zadovoljujejo potrebe celotne družine po hrani. Glavna vira sladkih tekočin sta medicina ali nektar (nektarna paša) in manine kapljice (manina paša). Manine kapljice so izločki žuželk, ki se prehranjujejo z rastlinskimi sokovi dreves. Izločke teh žuželk čebele nabirajo na iglicah in listih dreves ter na podrastih pod drevesi. Različne koncentracije sladkorjev v maninih kapljicah so posledica različno koncentriranih izločkov proizvajalcev mane, kot tudi izhlapevanja vode iz kapljic. Koncentracija sladkorjev v maninih kapljicah je eden od možnih vzrokov za spremembe v pašni aktivnosti čebel. Preučevali smo vpliv prisotnosti dveh različnih koncentracij saharoze na krmišču na vedenje pašnih čebel ter preference čebel za različne koncentracije saharoze.

Poskuse s čebelami smo izvedli v brezpašnem obdobju čebel. Vsak poskus je bil izveden na čebeli, ki se je prvič srečala s prisotnostjo kapljic raztopine saharoze dveh različnih molarnosti na krmišču. Poskusne čebele so se hranile v poskusni komori na stekleni plošči, na katero smo nanесли 30 kapljic raztopine saharoze z volumnom 4  $\mu\text{L}$ , 15 kapljic z višjo in 15 kapljic z nižjo molarnostjo. Kapljice so bile razporejene naključno in so imele pri vsaki poskusni čebeli drugačno razporeditev. V kontrolnih poskusih smo opazovali vedenje čebel na plošči s kapljicami raztopine saharoze enake molarnosti. Poskuse smo snemali z video kamero Sharp C670 in programom FDS Imaging Software (FDS Research, Slovenija) ter spremljali temperaturo in relativno zračno vlago v komori tekom poskusa.

Preferenco posamezne čebele za raztopino saharoze višje molarnosti smo lahko opazovali z zavračanjem kapljic raztopine nižje molarnosti. Zavrnjene kapljice je čebela poskusila in jih ni popila. Site čebele so ob koncu poskusa zavračale kapljice obeh raztopin.

V prvi poskusni skupini so čebele ( $n=34$ ) izbirale med kapljicami 0,5 M in 1 M raztopine saharoze. Za 20 čebel smo ugotovili statistično značilno preferenco za kapljice 1 M raztopine saharoze. 12 od teh jih je začelo zavračati kapljice z nižjo molarnostjo takoj za tem, ko so popile prvo kapljico ali serijo kapljic višje molarnosti. V drugem poskusnem sklopu so čebele ( $n=34$ ) pile kapljice 1 M in 1,5 M kapljice saharoze. Te čebele niso

zavračale kapljic raztopine z nižjo molarostjo. Čebelje izbiranje med dvema različnima koncentracijama raztopin pri nižjih vsebnostih saharoze se torej razlikuje od izbiranja med dvema absolutno enako različnima koncentracijama pri višjih vsebnostih saharoze. Pri večji absolutni razliki med koncentracijama obeh raztopin kaže preferenco za raztopino z višjo koncentracijo saharoze več čebel. To smo pokazali v tretji poskusni skupini, kjer so čebele (n=33) izbirale med kapljicami 0,5 M in 1,5 M raztopine saharoze. Za 29 čebel smo pokazali statistično značilno preferenco za kapljice višje molarosti. 14 od teh jih je začelo zavračati kapljice z nižjo molarostjo takoj po tem, ko so popile prvo kapljico ali serijo kapljic višje molarosti.

V kontrolnih poskusih s kapljicami raztopine saharoze enake molarosti so čebele pile vse kapljice brez zavračanja. S tem smo pokazali, da so vse tri raztopine saharoze, ki smo jih uporabljali v poskusih, dovolj dobre za pašo čebel v trenutnih razmerah. S kontrolnim poskusom s kapljicami vode in 0,5M raztopine saharoze smo pokazali, da čebele na krmišču iščejo le hranljive kapljice in ne vodo.

V treh poskusnih skupinah se mediane (13) števila popitih kapljic obeh raztopin posameznih čebel ne razlikujejo. Pri kontrolnih poskusih je nekoliko višja le mediana števila popitih kapljic v poskusih z 0,5 M raztopino saharoze (17).

HPLC analiza vzorcev iz začetnih raztopin in kapljic po končanih poskusih je pokazala, da med poskusom koncentracija saharoze zaradi izhlapevanja narašča v odvisnosti od časa trajanja poskusa. Hitrosti naraščanja koncentracij raztopin se razlikujejo med poskusi zaradi različnih pogojev (temperatura in relativna zračna vlaga) v komori med poskusom. Znotraj posameznega poskusa absolutna razlika med koncentracijama obeh raztopin zaradi izhlapevanja narašča, saj se koncentracija kapljic z višjo vsebnostjo saharoze povečuje hitreje kot koncentracija kapljic z nižjo vsebnostjo saharoze.

## 7 LITERATURA

### 7.1 CITIRANI VIRI

- Bateson M. 2004. Mechanisms of decision-making and the interpretation of choice tests. *Animal Welfare*, 13:115-120
- Božič J. 1998. Življenje čebel, V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 70-94
- Božnar A., Senegačnik J. 1998. Čebelji pridelki: med, V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 376-413
- Cnaani J., Thomson J.D., Papaj D.R. 2006. Flower choice and learning in foraging bumblebees: effects of variation in nectar volume and concentration. *Ethology*, 112:278-285
- Giurfa M. 1993. The repellent scent-mark of the honeybee *Apis mellifera ligustica* and its role as communication cue during foraging. *Insect Soc* 40:59-67
- Haupt S.S. 2004. Antennal sucrose perception in the honey bee (*Apis mellifera* L.): behaviour and electrophysiology. *J Comp Physiol A* 190:735-745
- Keasar T., Rashkovich E., Cohen D., Shmida A. 2002. Bees in two-armed bandit situations: foraging choices and possible decision mechanisms. *Behav Ecol*, 13:757-765
- Kolmes S.A. 1985a. A quantitative study of the division of labour among worker honey bees. *Z Tierpsychol.* 68:287-302
- Kolmes S.A. 1985b. An information-theory analysis of task specialization among worker honey bees performing hive duties. *Anim Behav*, 33:181-187
- Menzel R., Greggers U. 1992. Temporal dynamics and foraging behaviour in honeybees. V: *Biology and Evolution of Social Insects*. Billen J. (ed.). Leuven, Leuven University Press: 303-318
- Naug D., Arathi H.S. 2007. Sampling and decision rules used by honey bees in a foraging arena. *Anim Cogn*, 10:117-124
- 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.). *J Comp Physiol A*, 182:489-500



- Pankiw T., Page R.E. 1999. The effect of genotype, age, sex and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A*, 185:207-213
- Pankiw T., Page R.E. 2000. Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. *Behav Ecol Sociobiol*, 47:265-267
- Pankiw T., Waddington K.D., Page R.E. 2001. Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera* L.): influence of genotype, feeding and foraging experience. *J Comp Physiol A*, 187:293-301
- Pankiw T. 2003. Directional change in a suite of foraging behaviors in tropical and temperate evolved honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol Sociobiol*, 119:458-464
- Poklukar J., Kovač M., Titovšek J., Cunder T., Čuhalev I., Božič J., 1997. Medonosnost gozdov in mejnih kmetijskih zemljišč v Sloveniji: zaključno poročilo o rezultatih opravljenega znanstveno-raziskovalnega dela na področju aplikativnega raziskovanja (KIS – Poročila o raziskovalnih nalogah, 150). Ljubljana, Kmetijski inštitut
- Rihar J. 2003. Mana iglavcev, napovedovanje gozdnega medenja. Ljubljana, Pansan: 136 str.
- Scheiner R., Barnert 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
- Shafir S. 1994. Intransitivity of preferences in honey bees: support for 'comparative' evaluation of foraging options. *Anim Behav*, 48:55-67
- Shafir S., Waite T.A., Smith B.H. 2002. Context-dependent violations of rational choice in honeybees (*Apis mellifera*) and gray jays (*Perisoreus canadensis*). *Behav Ecol Sociobiol*, 51:180-187
- Stark J. 1998. Klasifikacija čebel, V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 18-23
- Šivic F. 1998. Manine paše, V: Od čebele do medu. Poklukar J. (ur.). Ljubljana, Kmečki glas: 162-177
- von Frisch K. 1965. Tanzsprache und Orientierung der Bienen. Berlin – Heidelberg, Springer Verlag: 578 str.
- Whitehead A.T., Larsen J.R. 1976a. Ultrastructure of the contact chemoreceptors of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Int J Insect Morphol Embryol*, 5:301-315

Whitehead A.T., Larsen J.R. 1976b. Electrophysiological responses of galeal contact chemoreceptors of *Apis mellifera* to selected sugars and electrolytes. *J Insect Physiol*, 22:1609-1616

Whitehead A.T. 1978. Electrophysiological responses of honey bee labial palp contact chemoreceptors to sugars and electrolytes. *Physiol Entomol*, 3:241-248

Winston M.L. 1987. *The Biology of Honeybee*. Cambridge, Massachusetts, London: Harvard University Press: 281 str.

Žaberl M. 2000. Vedenje kranjske čebele na umetnem krmišču s kapljicami sladkorne raztopine različnih koncentracij. Dipl. delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

## 7.2 DRUGI VIRI

- Hallem E.A., Dahanukar A., Carlson J.R. 2006. Insect odor and taste receptors, *Annu Rev Entomol.* 51:113-135
- Hammer M., Menzel R. 1995. Learning and memory in the honeybee. *J Neurosci*, 15:1617-1630
- Haupt S.S. 2007. Central gustatory projections and side-specificity of operant antennal muscle conditioning in the honeybee. *J Comp Physiol A*  
<http://www.springerlink.com/content/215853840646p637/> (30. mar. 2007)
- Lehner P.N. 1979. Handbook of ethological methods. New York, Garland STPM Press: 403 str.
- Mitchell B.K., Itagaki H., Rivet M.P. 1999. Peripheral and central structures involved in insect gustation. *Microsc Res Tech*, 47:401-415
- Rehder V. 1989. Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the subesophageal ganglion of the honey bee. *J Comp Neurol*, 279:499-513
- Scheiner R. 2004. Responsiveness to sucrose and habituation of the proboscis extension response in honey bees. *J Comp Physiol A*, 190:727-733
- Scheiner R., Page R.E., Erber J. 2004. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 35:133-142
- Schröter U., Malun D., Menzel R. 2007. Innervation pattern of subesophageal ventral unpaired median neurons in the honeybee brain. *Cell Tissue Res*, 327:647-667
- Šivic F. 1974. Gozdno medenje in proizvajalci mane. Ljubljana, Zveza čebelarskih društev Slovenije: 31 str.
- Zacharuk R.Y., Shields V.D. 1991. Sensilla of immature insects. *Ann Rev Entomol* 36:331-354
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozal.: 154 str.
- Arhiv vremenskih podatkov Ljubljana Koseze  
<http://www.krtina.com/vreme/ArhivPod.asp> (2. sept. 2006)

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju **doc. dr. Janku Božiču**  
za vse dobre ideje in napotke ter temeljit pregled diplomske naloge.

Hvala **doc. dr. Rudiju Verovniku** in **prof. dr. Tinetu Valentičiču**  
za sodelovanje pri zaključnem dejanju moje študijske poti.

Iz srca se zahvaljujem **dr. Adriani Gonzales**  
za vso velikodušno pomoč pri HPLC analizi.

Res 1000x hvala...

Posebna zahvala je namenjena najboljši ekipi na svetu: **Kaji, Niki** in **Juretu**.  
Hvala vam za vso tehnično in moralno podporo, za debate in čvekanje, kave in kavice...  
Hvala vam, da ste me vzeli k sebi, ne le kot 'sodelavko' ampak tudi kot prijateljico.

Hvala sponzorjem za ves prispevan material:  
**stricu Linotu** za polikarbonatne plošče, **Sandiju** za unikatne steklene plošče, **Damjanu** za  
stiropor ter **Primožu** za vse lesene dodatke.

Hvala tebi, **dragi Elvir**,  
za vso pomoč, ljubezen in požrtvovalnost, praktične inserte in nasploh, ker se ti da prenašat  
moje muhe in slone.

Nenazadnje gre ogromna zahvala tudi mojima **staršema**, **omiki** in pokojnemu **dediju**, **teti**  
**Boženi** in **stricu Linotu** ter ostalim članom moje družine za vso skrb, podporo, vzpodbudo  
in prijetno druženje...

Hvala vam, ker verjamete vame.

## PRILOGA A

### Zbrani podatki iz poskusov s čebelami

oznaka čebele	datum izvedbe poskusa	kapljice razt. saharoze nižje molarnosti (M)	kapljice razt. saharoze višje molarnosti (M)	št. popitih kapljic nižje molarnosti	št. zavrnjenih kapljic nižje molarnosti	št. popitih kapljic višje molarnosti	št. zavrnjenih kapljic višje molarnosti	št. vseh popitih kapljic	čas trajanja poskusa (mm:ss)	T (°C)	RZV (%)
1	27.7.2006	0,5	1	2	4	12	0	14	1:58	29	59
2	27.7.2006	0,5	1	0	16	12	0	12	2:13	33	50
3	27.7.2006	0,5	1	8	2	11	0	19	2:42	33	47
4	27.7.2006	0,5	1	5	13	11	0	16	2:30	34	46
5	27.7.2006	0,5	1	0	16	12	0	12	1:44	28	49
6	27.7.2006	0,5	1	7	1	9	0	16	2:36	29	45
7	28.7.2006	0,5	1	3	4	9	0	12	1:50	29	56
8	28.7.2006	0,5	1	7	3	12	0	19	2:36	29	57
9	28.7.2006	0,5	1	3	2	8	0	11	1:50	29	56
10	28.7.2006	0,5	1	2	3	11	0	13	1:27	29	55
11	28.7.2006	0,5	1	5	2	6	0	11	2:06	30	53
12	28.7.2006	0,5	1	2	4	10	0	12	2:28	28	58
13	28.7.2006	0,5	1	5	0	11	0	16	3:40	30	54
14	28.7.2006	0,5	1	3	7	10	0	13	2:12	30	54
15	28.7.2006	0,5	1	4	6	12	0	16	2:30	30	54
16	28.7.2006	0,5	1	4	19	14	0	18	2:43	29	56
16a	28.7.2006	0,5	1	2	0	4	0	6	1:21	29	56
17	28.7.2006	0,5	1	5	2	7	0	12	1:36	29	55
17a	28.7.2006	0,5	1	2	1	6	0	8	1:15	30	55
18	29.7.2006	0,5	1	7	4	10	0	17	2:07	26	63
19	29.7.2006	0,5	1	1	7	10	0	11	2:30	26	63
19a	29.7.2006	0,5	1	3	0	1	0	4	1:02	26	62
19b	29.7.2006	0,5	1	4	0	5	0	9	1:43	27	60
20	29.7.2006	0,5	1	3	13	12	0	15	1:54	27	60
21	29.7.2006	0,5	1	5	7	13	0	18	2:46	27	60
22	29.7.2006	0,5	1	3	19	14	0	17	5:17	28	61
23	29.7.2006	0,5	1	2	9	11	0	13	2:40	28	60
24	29.7.2006	0,5	1	5	5	5	0	10	1:50	28	59
25	29.7.2006	0,5	1	2	9	8	0	10	2:42	28	59
26	29.7.2006	0,5	1	4	11	12	0	16	4:22	29	58
27	29.7.2006	0,5	1	0	14	10	0	10	2:02	28	59
28	29.7.2006	0,5	1	5	12	12	0	17	3:26	28	59
29	29.7.2006	0,5	1	6	4	8	0	14	4:46	29	58
30	29.7.2006	0,5	1	2	12	9	0	11	1:44	29	57
31	31.7.2006	1	1,5	10	0	8	0	18	2:45	27	61
32	31.7.2006	1	1,5	6	0	7	0	13	1:57	27	58
33	31.7.2006	1	1,5	9	1	9	0	18	2:26	28	58
33a	31.7.2006	1	1,5	3	1	3	0	6	1:35	28	58
34	31.7.2006	1	1,5	5	0	8	0	13	2:08	28	58
35	31.7.2006	1	1,5	7	1	10	0	17	2:02	28	58
36	31.7.2006	1	1,5	9	2	7	0	16	1:29	29	57
37	31.7.2006	1	1,5	5	1	11	0	16	2:23	28	58
38	8.8.2006	1	1,5	9	0	6	0	15	5:21	29	37
39	8.8.2006	1	1,5	5	0	6	0	11	3:21	29	38
40	8.8.2006	1	1,5	6	0	6	0	12	1:52	29	37
41	8.8.2006	1	1,5	7	0	7	0	14	1:39	28	39
42	8.8.2006	1	1,5	9	0	9	0	18	2:24	28	40

oznaka čebele	datum izvedbe poskusa	kapljice razt. saharoze nižje molarnosti (M)	kapljice razt. saharoze višje molarnosti (M)	št. popitih kapljic nižje molarnosti	št. zavrnjenih kapljic nižje molarnosti	št. popitih kapljic višje molarnosti	št. zavrnjenih kapljic višje molarnosti	št. vseh popitih kapljic	čas trajanja poskusa (mm:ss)	T (°C)	RZV (%)
43	8.8.2006	1	1,5	8	0	9	0	17	2:35	27	41
44	8.8.2006	1	1,5	4	0	7	0	11	2:02	27	40
45	8.8.2006	1	1,5	7	0	5	0	12	1:58	28	38
46	8.8.2006	1	1,5	6	0	6	0	12	2:18	28	38
46a	9.8.2006	1	1,5	5	0	4	0	9	1:46	25	56
47	9.8.2006	1	1,5	6	0	9	0	15	3:50	25	56
48	9.8.2006	1	1,5	7	0	9	0	16	2:55	25	55
49	9.8.2006	1	1,5	6	0	4	0	10	2:36	25	55
49a	9.8.2006	1	1,5	2	0	3	0	5	0:55	25	53
50	9.8.2006	1	1,5	10	0	7	0	17	3:58	26	52
51	9.8.2006	1	1,5	6	0	5	0	11	1:13	26	52
52	9.8.2006	1	1,5	7	0	5	0	12	2:17	26	53
53	9.8.2006	1	1,5	6	0	6	0	12	1:47	27	52
54	9.8.2006	1	1,5	7	0	8	0	15	2:43	27	51
55	9.8.2006	1	1,5	6	0	7	0	13	1:32	27	51
56	9.8.2006	1	1,5	8	0	8	0	16	2:32	26	51
57	9.8.2006	1	1,5	7	0	11	0	18	2:35	26	51
57a	9.8.2006	1	1,5	5	0	4	0	9	2:03	27	50
58	9.8.2006	1	1,5	6	0	7	0	13	1:39	28	49
59	9.8.2006	1	1,5	6	0	4	0	10	2:56	28	49
60	9.8.2006	1	1,5	9	0	3	0	12	2:29	28	49
61	16.8.2006	0,5	1,5	8	14	7	0	15	6:56	26	55
62	16.8.2006	0,5	1,5	1	21	14	0	15	3:45	26	54
63	16.8.2006	0,5	1,5	2	7	9	0	11	3:30	26	54
63a	16.8.2006	0,5	1,5	2	1	4	0	6	1:31	26	53
63b	16.8.2006	0,5	1,5	0	3	5	0	5	1:47	25	57
64	16.8.2006	0,5	1,5	2	8	10	0	12	2:41	25	56
64a	16.8.2006	0,5	1,5	5	0	4	0	9	2:13	26	54
65	16.8.2006	0,5	1,5	1	17	11	0	12	2:41	27	54
66	16.8.2006	0,5	1,5	2	8	8	0	10	3:21	25	58
67	17.8.2006	0,5	1,5	6	16	13	0	19	6:25	26	60
68	17.8.2006	0,5	1,5	0	10	11	0	11	2:16	27	56
69	17.8.2006	0,5	1,5	4	7	12	0	16	2:38	27	56
70	17.8.2006	0,5	1,5	6	5	11	0	17	3:45	26	62
71	17.8.2006	0,5	1,5	9	0	7	0	16	3:59	26	61
72	17.8.2006	0,5	1,5	3	8	12	0	15	2:31	26	61
73	17.8.2006	0,5	1,5	1	7	10	0	11	5:24	27	63
74	17.8.2006	0,5	1,5	0	12	12	0	12	3:39	27	61
75	17.8.2006	0,5	1,5	3	11	11	0	14	2:45	27	60
76	17.8.2006	0,5	1,5	4	6	9	0	13	6:10	27	63
77	17.8.2006	0,5	1,5	4	10	12	0	16	4:24	27	61
78	17.8.2006	0,5	1,5	4	3	7	0	11	2:38	28	59
79	18.8.2006	0,5	1,5	2	12	9	0	11	4:56	26	67
80	18.8.2006	0,5	1,5	2	11	13	0	15	4:15	26	67
81	18.8.2006	0,5	1,5	4	2	11	0	15	1:52	26	65
82	18.8.2006	0,5	1,5	0	11	13	0	13	2:59	26	65
83	18.8.2006	0,5	1,5	1	10	12	0	13	3:16	27	62
84	18.8.2006	0,5	1,5	2	24	13	0	15	6:11	27	62
85	18.8.2006	0,5	1,5	5	17	12	0	17	4:16	27	60
86	18.8.2006	0,5	1,5	3	10	12	0	15	5:02	27	61
87	18.8.2006	0,5	1,5	1	7	11	0	12	3:41	27	60
88	18.8.2006	0,5	1,5	1	4	10	0	11	3:38	28	58
89	18.8.2006	0,5	1,5	2	9	9	0	11	5:11	28	57

oznaka čebele	datum izvedbe poskusa	kapljice razt. saharoze nižje molarnosti (M)	kapljice razt. saharoze višje molarnosti (M)	št. popitih kapljic nižje molarnosti	št. zavrnjenih kapljic nižje molarnosti	št. popitih kapljic višje molarnosti	št. zavrnjenih kapljic višje molarnosti	št. vseh popitih kapljic	čas trajanja poskusa (mm:ss)	T (°C)	RZV (%)
90	18.8.2006	0,5	1,5	2	8	12	0	14	3:46	29	54
101	10.8.2006	0	0,5	0	16	13	0	13	4:02	25	60
102	10.8.2006	0	0,5	0	3	10	0	10	1:27	25	60
103	10.8.2006	0	0,5	0	16	10	0	10	7:31	26	59
104	10.8.2006	0	0,5	0	11	12	0	12	3:33	26	57
105	10.8.2006	0	0,5	0	14	10	0	10	2:13	25	59
106	10.8.2006	0	0,5	0	18	13	0	13	4:20	25	60
107	10.8.2006	0	0,5	0	19	13	0	13	2:57	26	58
107a	10.8.2006	0	0,5	0	4	4	0	4	0:43	26	57
108	10.8.2006	0	0,5	0	7	10	0	10	1:54	27	55
109	10.8.2006	0	0,5	0	8	10	0	10	3:53	26	58
110	10.8.2006	0	0,5	0	17	12	0	12	2:40	26	58

oznaka čebele	datum izvedbe poskusa	molarnost (M) kapljic razt. saharoze v kontrolnih poskusih	št. popitih kapljic razt. saharoze	št. zavrnjenih kapljic razt. saharoze	čas trajanja poskusa (mm:ss)	T (°C)	RZV (%)
111	10.8.2006	0,5	19	0	3:55	26	58
111a	10.8.2006	0,5	9	0	1:58	26	58
112	10.8.2006	0,5	14	0	2:04	27	55
113	10.8.2006	0,5	19	0	3:32	27	55
114	10.8.2006	0,5	17	0	2:18	27	54
115	14.8.2006	0,5	17	0	1:46	23	64
116	14.8.2006	0,5	18	0	2:31	23	64
117	14.8.2006	0,5	13	0	1:35	24	62
118	14.8.2006	0,5	18	0	2:14	23	63
119	14.8.2006	0,5	15	0	2:49	23	63
120	14.8.2006	0,5	13	0	2:22	24	61
121	15.8.2006	1	15	0	2:20	23	64
122	15.8.2006	1	17	0	2:51	23	64
123	15.8.2006	1	12	0	1:26	24	63
124	15.8.2006	1	17	0	2:27	24	63
125	15.8.2006	1	16	0	3:42	24	64
126	15.8.2006	1	12	0	2:16	25	61
127	15.8.2006	1	13	0	1:36	25	59
127a	15.8.2006	1	9	0	2:38	25	59
128	15.8.2006	1	11	0	2:03	25	57
129	15.8.2006	1	17	0	1:58	24	60
129a	15.8.2006	1	8	0	2:27	25	57
130	15.8.2006	1	16	0	1:43	25	55
131	15.8.2006	1,5	10	0	3:41	26	51
132	15.8.2006	1,5	15	0	2:13	27	49
133	15.8.2006	1,5	13	0	2:35	27	48
134	15.8.2006	1,5	15	2	2:16	26	51
135	15.8.2006	1,5	18	0	3:59	26	50
136	16.8.2006	1,5	15	0	2:35	24	57
137	16.8.2006	1,5	15	0	2:23	25	55
138	16.8.2006	1,5	11	0	1:28	25	55
139	16.8.2006	1,5	16	0	5:00	24	58
140	16.8.2006	1,5	11	0	2:25	24	57











	zaporedna št. kapljice																																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41		
čebela 101	n	V	n	n	n	V	n	n	V	n	n	V	V	n	V	V	V	V	V	n	n	n	n	V	V	n	n	n	V	V	n	n	V	n	n	n	V	n	n	n	V		
čebela 102	n	V	V	n	V	V	V	n	V	V	V	V	V	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
čebela 103	n	n	V	n	V	n	n	n	V	n	n	n	n	n	n	V	V	n	n	V	V	V	n	n	V	V	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
čebela 104	V	n	n	V	V	V	V	V	V	n	n	n	n	n	n	n	n	V	n	V	V	V	V	V	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
čebela 105	V	n	n	V	n	n	V	V	n	V	V	V	n	n	n	V	n	V	n	n	n	n	n	n	V	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
čebela 106	V	V	V	V	n	V	V	n	V	n	n	V	V	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	V	n	n	n	n	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	n	n
čebela 107	n	V	n	V	n	n	V	V	V	n	n	n	n	n	n	V	n	n	n	n	n	n	n	n	V	V	V	V	n	n	V	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	n	n
čebela 107a	V	V	n	n	V	n	n	V	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	
čebela 108	V	n	n	n	V	V	V	V	n	n	V	V	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V
čebela 109	V	V	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	n	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V	n	V
čebela 110	V	V	n	n	n	V	n	V	V	V	V	V	V	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	V	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	V	n	V

## PRILOGA C

### Rezultati HPLC analize raztopin saharoze

HPLC vzorec	začetna molarnost razt. saharoze (M)	kontrolna raztopina	masa saharoze v HPLC vzorcu (mg)
	0,5	/	0,100294502
vzorci kontrolne raztopine saharoze 3 (K <sub>3</sub> )	0,5	/	0,082894087
	0,5	/	0,109836652
	0,5	/	0,093141437
	0,5	/	0,101021984
	0,5	/	0,100294502
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 8)	0,5	K <sub>3</sub> (0,5 M)	0,122921381
	0,5	K <sub>3</sub> (0,5 M)	0,160058775
	0,5	K <sub>3</sub> (0,5 M)	0,137480306
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 29)	0,5	K <sub>3</sub> (0,5 M)	0,132757575
	0,5	K <sub>3</sub> (0,5 M)	0,126050548
	0,5	K <sub>3</sub> (0,5 M)	0,132420559
vzorci kontrolne raztopine saharoze 9 (K <sub>9</sub> )	0,5	/	0,08905507
	0,5	/	0,095794193
	0,5	/	0,097259502
	0,5	/	0,09654661
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 103)	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,145607281
	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,144761094
	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,149103439
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 104)	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,120093154
	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,117890548
	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,114585909
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 111)	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,12230133
	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,117669054
	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,138136034
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 112)	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,110967067
	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,108791518
	0,5	K <sub>9</sub> (0,5 M)	0,105021742
vzorci kontrolne raztopine saharoze 13 (K <sub>13</sub> )	0,5	/	0,095792734
	0,5	/	0,101927722
	0,5	/	0,092456662
	0,5	/	0,087656474
	0,5	/	0,087689765
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 71)	0,5	K <sub>13</sub> (0,5 M)	0,110389193
	0,5	K <sub>13</sub> (0,5 M)	0,11287059
	0,5	K <sub>13</sub> (0,5 M)	0,117293973
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 76)	0,5	K <sub>13</sub> (0,5 M)	0,126388493
	0,5	K <sub>13</sub> (0,5 M)	0,122825356
	0,5	K <sub>13</sub> (0,5 M)	0,124572109

HPLC vzorec	začetna molarnost razt. saharoze (M)	kontrolna raztopina	masa saharoze v HPLC vzorcu (mg)
vzorci kontrolne raztopine saharoze 4 (K <sub>4</sub> )	1	/	0,201190357
	1	/	0,190671378
	1	/	0,282136492
	1	/	0,180785049
	1	/	0,197247232
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 8)	1	K <sub>4</sub> (1 M)	0,237641198
	1	K <sub>4</sub> (1 M)	0,260352491
	1	K <sub>4</sub> (1 M)	0,229461397
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 29)	1	K <sub>4</sub> (1 M)	0,283844153
	1	K <sub>4</sub> (1 M)	0,301045529
	1	K <sub>4</sub> (1 M)	0,303761469
vzorci kontrolne raztopine saharoze 7 (K <sub>7</sub> )	1	/	0,17738306
	1	/	0,19740241
	1	/	0,205343039
	1	/	0,186207012
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 38)	1	K <sub>7</sub> (1 M)	0,319700183
	1	K <sub>7</sub> (1 M)	0,280012669
	1	K <sub>7</sub> (1 M)	0,333419324
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 60)	1	K <sub>7</sub> (1 M)	0,243217637
	1	K <sub>7</sub> (1 M)	0,239778897
vzorci kontrolne raztopine saharoze 11 (K <sub>11</sub> )	1	/	0,191736406
	1	/	0,16654444
	1	/	0,180062209
	1	/	0,195667594
	1	/	0,187352945
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 125)	1	K <sub>11</sub> (1 M)	0,227282761
	1	K <sub>11</sub> (1 M)	0,224651254
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 126)	1	K <sub>11</sub> (1 M)	0,222141281
	1	K <sub>11</sub> (1 M)	0,219273106
	1	K <sub>11</sub> (1 M)	0,225984278
vzorci kontrolne raztopine saharoze 8 (K <sub>8</sub> )	1,5	/	0,23663604
	1,5	/	0,280832728
	1,5	/	0,27524365
	1,5	/	0,263310823
	1,5	/	0,27650232
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 38)	1,5	K <sub>8</sub> (1,5 M)	0,424305433
	1,5	K <sub>8</sub> (1,5 M)	0,422748533
	1,5	K <sub>8</sub> (1,5 M)	0,428644796
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 60)	1,5	K <sub>8</sub> (1,5 M)	0,314922023
	1,5	K <sub>8</sub> (1,5 M)	0,295714714
	1,5	K <sub>8</sub> (1,5 M)	0,31013107

HPLC vzorec	začetna molarnost razt. saharoze (M)	kontrolna raztopina	masa saharoze v HPLC vzorcu (mg)
vzorci kontrolne raztopine saharoze 12 (K <sub>12</sub> )	1,5	/	0,291756232
	1,5	/	0,387118051
	1,5	/	0,317782448
	1,5	/	0,268675754
	1,5	/	0,316416347
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 133)	1,5	K <sub>12</sub> (1,5 M)	0,376096546
	1,5	K <sub>12</sub> (1,5 M)	0,387804638
	1,5	K <sub>12</sub> (1,5 M)	0,368123991
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 139)	1,5	K <sub>12</sub> (1,5 M)	0,375286754
	1,5	K <sub>12</sub> (1,5 M)	0,396515346
	1,5	K <sub>12</sub> (1,5 M)	0,423517388
vzorci kontrolne raztopine saharoze 14 (K <sub>14</sub> )	1,5	/	0,261188724
	1,5	/	0,270437096
	1,5	/	0,248137815
	1,5	/	0,25299079
	1,5	/	0,269720888
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 71)	1,5	K <sub>14</sub> (1,5 M)	0,325442931
	1,5	K <sub>14</sub> (1,5 M)	0,315066583
	1,5	K <sub>14</sub> (1,5 M)	0,315758681
vzorci kapljic raztopine saharoze iz poskusa (čebela 76)	1,5	K <sub>14</sub> (1,5 M)	0,3264395
	1,5	K <sub>14</sub> (1,5 M)	0,311790313
	1,5	K <sub>14</sub> (1,5 M)	0,306142234