



Gimnazija Kranj
Koroška cesta 13
4000 Kranj

Raziskovalna naloga na področju biologije

Učenje stegovanja jezička kranjskih čebel iz prezimovalne gruč

Avtorja:

Kaja Kurent in Mark Porenta

Mentorja:

univ. dipl. bio. Urša Petrič (Gimnazija Kranj)

**prof. dr. Janko Božič (Biotehniška fakulteta,
oddelek za biologijo)**

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujema svoji mentorici profesorici biologije Urši Petrič, ki naju je spodbujala, nama svetovala in nudila strokovno pomoč pri raziskovalni nalogi.

Zahvaljujema se tudi dr. Janku Božiču, ki nama je predstavil temo in naju seznanil z metodami dela v laboratoriju in metodami obdelave podatkov. Zahvaljujema se tudi za čebele, ki nama jih je priskrbel, in pa gostoljubje.

S pomočjo mentorjev nama je uspelo raziskovalno nalogo izpiliti v končno celoto, za kar sva jima izredno hvaležna.



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

KAZALO

1. UVOD.....	7
1.1. NAMEN.....	7
1.2. TEORETIČNO OZADJE.....	7
1.2.1. RAZISKOVALNI OBJEKT: ČEBELE.....	7
1.2.2. UČENJE ČEBEL.....	9
1.2.3. NOSEMAVOST.....	11
1.3. RAZISKOVALNO VPRAŠANJE.....	14
1.4. HIPOTEZE.....	14
2. RAZISKAVA.....	15
2.1. METODA DELA.....	15
2.1.1. PRIPOMOČKI.....	15
2.1.1.1. PRIPRAVA ČEBEL.....	15
2.1.1.2. UČENJE ČEBEL.....	15
2.1.1.3. PREGLED NOSEMAVOSTI.....	15
2.1.2. OPIS DELA.....	16
2.1.2.1. PRIPRAVA ČEBEL.....	16
2.1.2.2. UČENJE ČEBEL.....	17
2.1.2.3. PREGLED NOSEMAVOSTI.....	18
2.2. MERITVE.....	19
2.2.1. REZULTATI.....	19
2.2.1.1. TABELE UČENJA.....	19
2.2.1.2. GRAFI UČENJA.....	23
2.2.1.3. TABELE ŠTETJA NOSEME.....	25
2.2.1.4. FISHERJEV EKSAKTNI TEST.....	27
3. RAZPRAVA.....	28
3.1. UČENJE ČEBEL.....	28
3.2. VPLIV NOSEME NA UČENJE ČEBEL.....	28
4. ZAKLJUČEK.....	30
5. VIRI.....	31

KAZALO SLIK

Slika 1: Kranjska čebela (<i>Apis mellifera carnica</i>)	2
Slika 2: Prikaz CS in US na čebeli.....	9
Slika 3: Graf Menzla in Bittermana.....	10
Slika 4: Prisotnost noseve v vzorcu pod mikroskopom pri 400-kratni povečavi.....	11
Slika 5: Prebavni trakt okužene in neokužene čebele	13
Slika 6: Čebela v tulcu	16
Slika 7: Čebela v tulcu od zadaj	16
Slika 8: Stimuliranje čebele z dišavo.....	17
Slika 9: Čebelo sva s pinceto prijela za želo in povlekla ven celotno črevo.....	18
Slika 10: Vzorec brez prisotnosti noseve pod mikroskopom pri 400-kratni povečavi	18
Slika 11: Prisotnost noseve v vzorcu pod mikroskopom pri 400-kratni povečavi.....	18

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Učenje čebel v 1. skupini	23
Graf 2: Učenje v 2. skupini	23
Graf 3: Učenje v 3. skupini	24
Graf 4: Učenje v 3. skupini, primerjava med nenosemavimi in nosestavimi čebelami	24

KAZALO TABEL

Tabela 1: Tabela učenja 1. skupine	19
Tabela 2: Tabela učenja 2. skupine	20
Tabela 3: Tabela učenja 3. skupine	21
Tabela 4: Rezultati štetja noseve 1. skupine čebel	25
Tabela 5: Rezultati štetja noseve 2. skupine čebel	25
Tabela 6: Rezultati štetja noseve 3. skupine čebel	26
Tabela 7: Prikaz Fisherjevega eksaktnega testa pri vseh čebelah	27
Tabela 8: Prikaz Fisherjevega eksaktnega testa pri čebelah 3. skupine	27

POVZETEK

Cilj te raziskovalne naloge je primerjanje uspešnosti učenja z zdravstvenim stanjem čebele. V čebelah smo iskali prisotnost pogoste glivne okužbe noseme. Prisotnost smo opazovali z mikroskopiranjem črevesja čebele. Za štetje spor noseme smo uporabili hemocitometer.

Pričakovali smo, da bodo čebele iz oslavljenih družin in s prisotnostjo povzročiteljev bolezni imele večje težave pri učenju. Naše rezultate smo primerjali z znanstvenimi objavami o učenju čebel, ki so bile prizadete zaradi različnih obolenj, kakor tudi strupi, ki se pojavljajo v okolju ali v panju. Ocenjuje se, da je vzajemno delovanje različnih negativnih dejavnikov v okolju razlog za povečana odmiranja čebel. Zima je kritično obdobje in v tem času je narejeno relativno malo raziskav. Z raziskavo si želimo dodati kamenček v mozaiku razumevanja vzrokov za odmiranje čebeljih družin.

Kranjska čebela (*Apis mellifera carnica*) je avtohtona čebelja pasma na območju zahodnega dela Balkanskega polotoka. Čebele se že od začetka 20. stoletja uporabljajo za raziskovanje učenja, spomina in pašnega vedenja. Lahko se učijo o značilnostih rastlin, kot so barva, vonj, tekstura in elektrostatični naboj, in kažejo zapletene vzorce učenja.

Med pašo čebel se odvija učni proces, zapomnijo si značilnosti rastlin, kot so lokacija, oblika, barva in vonj, in to povežejo z nagrado hrane. Pomembno vlogo pri prepoznavanju učinkovitih pašnih območij igra vonj rastlin. Učenje in spomin sta kritični funkciji, ki omogočata žuželkam opraševalkam, da učinkovito najdejo vire hrane.

Čebela je lahko v laboratoriju naučena, da iztegne jeziček s tem, da poveže določeno vonjavo z nagrado, ki jo predstavlja sladka hrana. Ta pojav imenujemo pogojevanje nagonskega iztegovanja jezička (proboscis extension reflex - PER). Na zmožnost učenja in pomnenja vplivajo različni dejavniki. Poslabšajo jo lahko različni zajedavci, bolezni, zdravstveno stanje čebele, moč družine...

Zanimalo nas je, kako so čebele sposobne razlikovati dve različni vonjavi v procesu pogojevanja PER. Opazovali smo nagonsko iztegovanje jezička kot vedenjski odziv čebele, ki ga lahko merimo.

Čebele uporabljene za poskus so bile iz prezimovalne gruč prenesene v laboratorij in nameščene v tulce. Čebele so bile pri ponovitvah ali izpostavljene eni vonjavi in nahranjene ali drugi vonjavi in ne nahranjene. Pri menjavanju vonjav smo uporabili navidezno naključno zaporedje. Čeprav se spremenljivki pojavljata v zaporedju, je to prezapleteno, da bi se ga čebela posebej naučila. Da je čebela naučena nagonskega iztegovanja jezička ob vonjavi, smo šteli, ko je dvakrat zapored iztegnila jeziček, preden je dobila hrano.

SUMMARY

The goal of this assignment is comparing the degree of success of bee learning with its health condition. We tried to confirm the presence of *Nosema apis*. We observed it by microscoping the middle intestine of the bee. For counting spores of *Nosema apis* we used a hemocytometer.

We expected that the bees from affected families would not be as successful as the ones from healthy families. We compared our results with scientific articles about learning in bees defected by various diseases or poisons. It is believed that a reciprocal activity of various negative effects in the environment is the cause of increased dying of bees. Winter is a critical season and relatively few researches have been done in this era. With our research we want to add a pebble to the mosaic of the understanding of why bee colonies collapse.

The Carniolian honey bee (*Apis mellifera carnica*) is native to the western part of the Balkan peninsula. Honey bees have been used for the researching of learning and memorizing since the beginning of the 20th century. They can learn about the features of plants, like colour, odor, texture and electrostatic discharge. They show complicated patterns of learning.

During bee foraging a learning process takes place. They memorize the features of a plant, such as location, shape, colour and odor, so they connect that to the reward – sweet food. The odor plays a significant role in recognizing efficient foraging areas. Learning and memorizing are crucial functions which help pollinating insects find a source of food efficiently.

In a laboratory a bee can be taught to extend its proboscis by connecting certain odor with a reward – sweet food. This phenomenon is called proboscis extension reflex – PER. Various factors affect the ability to learn and memorize. It can be made worse by parasites, illnesses, health condition of a bee, the strength of the family...

We were interested in how the bees are capable to differentiate between two different odors in the PER conditioning. We observed PER as a behavioral response which can be measured.

Bees used for the experiment were transferred from a wintering cluster to a laboratory and harnessed in small tubes. Bees were either exposed to one odor and fed or exposed to the other odor and not fed. We used a seemingly random sequence when switching odor. This sequence is too complicated for the bee to recognize it. The bee is considered to have learned PER when it extended its proboscis twice in a row before being stimulated by the sweet food.

1. UVOD

1.1. NAMEN

V letošnjem šolskem letu sva se odločila, da spoznava biologijo tudi z drugega zornega kota in ne le s šolskih klopi. Ker sva naravoslovca po duši, naju zanima tudi raziskovalno delo. Najbolj izmed vseh področij biologije naju zanima zoologija. Proučevanje čebel se nama je zdela prava izbira, saj sva vedela, da so čebele kljub svoji majhnosti privlačne za raziskovalce že vrsto desetletij. Želela sva izvedeti, kaj je na njih tako interesantnega.

Pestrost življenja čebel nama je predstavil dr. Janko Božič, ki je profesor na biotehniški fakulteti v Ljubljani, katedra za biologijo. Predstavil nama je široko področje s te tematike, ki ga je mogoče raziskovati. Navdušilo naju je dejstvo, česa so se čebele vse zmožne naučiti, zato sva se odločila to temo malo bolj raziskati. Raziskovalna tema nama je bila še toliko bolj zanimiva, ker se zavedava kritičnega položaja, v katerem so čebele in njihove pomembnosti za naš planet.

1.2. TEORETIČNO OZADJE

1.2.1. RAZISKOVALNI OBJEKT: ČEBELE

Kranjska čebela (znanstveno ime *Apis mellifera carnica*, Pollmann 1879) je avtohtona čebelja rasa, ki je nastala na območju Balkanskega polotoka, iz zgodovinskih vzrokov pa je za njeno domovino priznana Gorenjska, zaradi česar je svojevrsten slovenski ponos. Najdemo jo tudi na ozemlju širše Koroške in Štajerske v Avstriji, na Madžarskem, v Romuniji, Hrvaški, Bosni in Hercegovini, Srbiji, zlasti umetno naseljeno pa še v Nemčiji ter ponekod drugod. Od slovenskih avtohtonih domačih živalskih pasem je geografsko najbolj razširjena, saj z njo čebelarji na prav vseh kontinentih. Trenutno je za italijansko čebelo druga najbolj razširjena čebelja pasma na svetu, ki se veliko uporablja v čebelarstvu (Wikipedia, n.d.).

Kranjska čebela je zelo cenjena med čebelarji, saj je znana po nabiralni vnemi in zato prednjači po količini nabranega medu. Odlikuje se tudi po pridnosti, krotkosti, mirnosti, odpornosti proti boleznim in ostremu podnebjju, varčnosti s hrano in naglem spomladanskem razvoju. Zelo je rojiva, to pa ji zagotavlja obstanek tudi v zdajšnjih vedno bolj ogroženih razmerah. (Ruttner, 1988). Ni napadalna, zato je delo z njo lažje kot z drugimi pasmami. Čebelarjenje je tako mogoče v bližini doma in v naseljih, kjer bi druge pasme lahko povzročale nevšečnosti. Ima tudi izredno razvit čut za orientacijo. Njen občutek za smer se bolj odziva na obliko kot na barvo okolice. V tem pogledu daleč prekaša italijansko in nemško črno čebelo. Veliko hitreje najde lokacijo gozdnega medenja kot druge rase čebel, tako da je izredno prilagojena za pašo

na iglavcih. Ker seže z jezičkom bolj globoko v cvet, ima prednost tudi pri nabiranju cvetličnega medu.

V normalno razviti čebelji družini živi ena matica, približno do 1000 troto in največ do 75000 čebel delavk. Delavke so neplodne samice in v družini najmanjše. Opravljajo vsa dela v panju in zunaj njega. Delitev dela poteka glede na starost čebele, velja načelo zaporedja opravil od čiščenja celice do paše. Čebela delavka je srednje velika, vitka, splošna barva je siva, njene noge so dolge. Njen rilček je dolg 6,4–6,8 mm. Ima zašiljen in temen zadek, na katerem se na prvem širokem obročku bočno lahko pojavljajo usnjeno rjave pike ali lise. (Aleš Gregorc, 2002) Njeni hitinasti obročki na zadku so temni, s svetlo sivimi dlačicami. Med evropskimi pasmami je najbolj siva in ji zato pravijo tudi kranjska sivka.

Troto pozimi ni, število delavk pa se zmanjša na 10 000. Matica živi do 5 let. Troti spomladi živijo 21–32 dni, poleti ob boljši hrani pa do 90 dni. Čebele delavke pomladi in poleti živijo 20–40 dni, odvisno od intenzivnosti nabiranja medicne. Zimske čebele pa preživijo do 140 dni in pomladi vzgojijo nov zarod. (Danilo Bevk, 2013)

Kranjska čebela je zmožna preživeti dolgotrajno zimsko obdobje. Zimske čebele se od pašnih razlikujejo tako fiziološko kot tudi po vedenjskih značilnostih (Merz in sod., 1979; Crailsheim, 1986). Ustrezna pripravljenost zimskih čebel je življenjskega pomena za čebeljo družino, ker morajo živeti dalj časa kot poletne čebele, kar je omogočeno zaradi fizioloških sprememb v samih čebelah. Spremeni se notranja telesna zgradba in upočasni presnova. Čebele morajo biti sposobne, da zaloge, ki jih imajo v telesu, predelajo v hrano za ličinke ob začetku zaleganja naslednje leto. (Meglič, 2004; Božič, 1998) Čebelja družina se na prezimovanje začne pripravljati v hladnih jesenskih dneh. Pripravlja se tako, da postopno zmanjšuje zalego in premešča hrano v okolico gnezda. Ko se temperatura zniža na 12 °C, se čebele stisnejo v gručo, na robu gruče pa se telesna temperatura čebel ne sme spustiti pod 8 °C. Čebele v središču gruče ustvarjajo toploto, ki se v normalnih razmerah ne zniža na manj kot 18 °C, in lahko presega 33 °C, ki je običajna temperatura gnezda. Toploto ustvarjajo z aktivnostjo krilnih mišic ob zadostnem viru energije, poglavitni vir za ustvarjanje energije pa je med. Prezimovalna gruča se premika za hrano. Občasno se razide in se oblikuje nova. Med spomladanskim zaleganjem čebele ne smejo pregreti gnezda na več kot 35 °C, saj bi to uničilo zalego. (Marija Mlaker – Šumenjak, 2011)

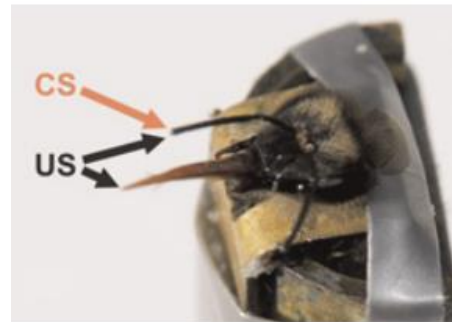
Tudi kranjsko sivko lahko prizadenejo različne bolezni, a je vseeno odpornejša od mnogih drugih čebel. Napadajo jo nekatere bolezni, kot so huda in pohlevna gniloba, pršičavost, nose mavost, varroza in poapnela zalega. Drugi nevarni sovražnik predstavlja varoja destruktor, sladkosnede medved, miši, nekatere ptice, žuželke, pajki in krplja, ter nekatere rastline, kot so navadni negnoj, čemerika, škrbinec in špehek. Največjo nevarnost zanjo pa predstavljajo človekovi posegi v okolje in pretirana uporaba fitofarmaceutskih sredstev v kmetijstvu in sadjarstvu.

Čebelarstvo je pomembna gospodarska panoga, zaradi opraševanja pa je izrednega pomena zlasti za kmetijstvo, sadjarstvo in gojenje semen. (Kastelic, 1976)

1.2.2. UČENJE ČEBEL

Dolgo pred začetkom raziskav o pogojevanju nagonskega iztegovanja jezička je bilo dobro znano dejstvo, da se nagonsko iztegovanje jezička (proboscis extension reflex – PER) lahko spodbudi s stimuliranjem okuševalnih organov, kot na primer tipalnice, s sladko raztopino. PER so odkrili pri čebelah (Frings H. 1944), muhah (Minnich 1926) in metuljih (Minnich 1921), ter ostalih žuželkah.

Kasneje je japonski raziskovalec Matsutaro Kuwabara, ki je delal s Karlom von Frischom, spoznal, da se PER lahko spodbudi tudi z vizualnim stimulantom kot pogojni dražljaj - CS (Kuwabara 1957). Kuwabara je kot CS uporabil obarvane luči, kot US pa raztopino saharoze s katero je vzdražil stopalca. Karl von Frisch je PER pri različnih vrstah žuželk omenjal v svoji knjigi: *The dance language and orientation of bees* (von Frisch 1967).



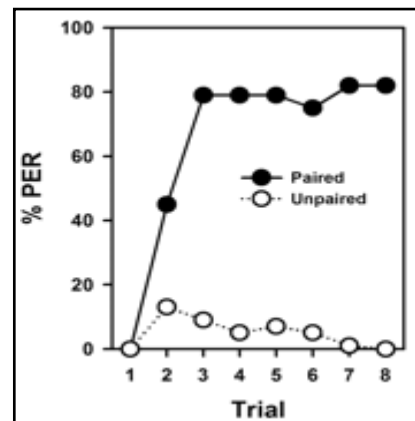
Slika 2: Prikaz CS in US na čebeli

Kubawara je zapisal, da so pri njegovem eksperimentu čebele začele iztegovati jeziček še preden je raztopina saharoze dosegla tipalnice ali okolico ust. Ta učinek ni bil zaželen, saj bi moral US izzvati PER le ob kontaktu. Kubawara je sklepal, da je do tega prišlo zaradi prisotnosti higroreceptorjev na tipalnicah, ki zaznavajo približujoči se sladkor na žlički. Odločil se je, da bo čebelam odstranil tipalnice in se s tem izognil problemu ter izzval odgovor s stimuliranjem stopalc s saharozo. Vendar čebele brez tipalnic niso tisto kar bi eksperimentator želel. Poškodovana žival je verjetno manj odzivna od nepoškodovane. Nizka vrednost opažena pri čebelah brez tipalnic je kljub dolgemu času učenja lahko povezana s tem dejstvom (Hori 2006, 2007). Nedavno je bilo dokazano, da odsotnost tipalnic zmanjša odzivnost na sladkor pri stimulaciji stopalc (de Brito Sanchez 2008), kar verjetno privede do zmanjšanja vrednosti US in pridobitve ter ohranitve zmogljivosti.

Ni znano ali so bile te kritike vzrok, da je Takeda za CS uporabil vonjave (Takeda 1961), saj je le redko omenjal delo Kubaware. Takeda je čebele pripel za krila in jim vonjave dovajal po kapilarah, ki so bile nameščene blizu čebeljih tipalnic. S sladkorno raztopino je stimuliral stopalca da je izzval PER in jo nato približal jezičku, da je čebela raztopino lahko pila. Danes vemo, da stimulacija stopalc ni bila najboljša izbira, saj je občutljivost na saharozo na tipalnicah dosti večja kot na stopalcih (de Brito Sanchez 2008). Tudi to, da so bile čebele imobilizirane le za krila ni bilo najboljšo, saj so bile verjetno v stalnem gibanju in je bila dostava saharoze otežena. To je bilo kasneje izboljšano tako, da je bilo celotno telo čebele znotraj tulca in je bila prosta le glava. To metodo je predstavil Vareschi (1971).

Ko je Takeda govoril o svojem delu je izpostavil dve pomembni dejstvi, ki bi postali temeljni za več generacij raziskovalcev: (1) nujnost raziskovanja fenomena učenja pri celotni vrsti in (2) dejstvo, da naj bi bile čebele obdarjene s spominom, saj so bile informacije pridobljene z učenjem lahko priklicane celo dva dni po učenju (Takeda 1961).

Vareschi se je zanimal za vohalno diskriminacijo in generalizacijo pri čebelah. Uporabljal je pogojevanje PER, da je opazoval podobnosti in razlike med pogojevalnimi dišavami in ostalimi dišavami (Vareschi 1971). Vareschi je naredil pomembne spremembe pri Takedinem protokolu, kot je postavitve čebel v posamezne tulce. Kljub vsemu pa je bila seminarska naloga, katere avtorja sta bila med drugimi Randolph Menzel in Jeff Bitterman, tista, ki je postavila pogojevanje PER kot standardni protokol za proučevanje učenja in procesov pomnjenja pri čebelah (Bitterman 1983). V tej nalogi avtorja nista le zagotovila standardnega kontroliranega protokola za eksperimente o pogojevanje PER, temveč tudi uskladila ta pristop s trenutno najmodernejšimi metodami v domeni eksperimentalne psihologije. Prvič je



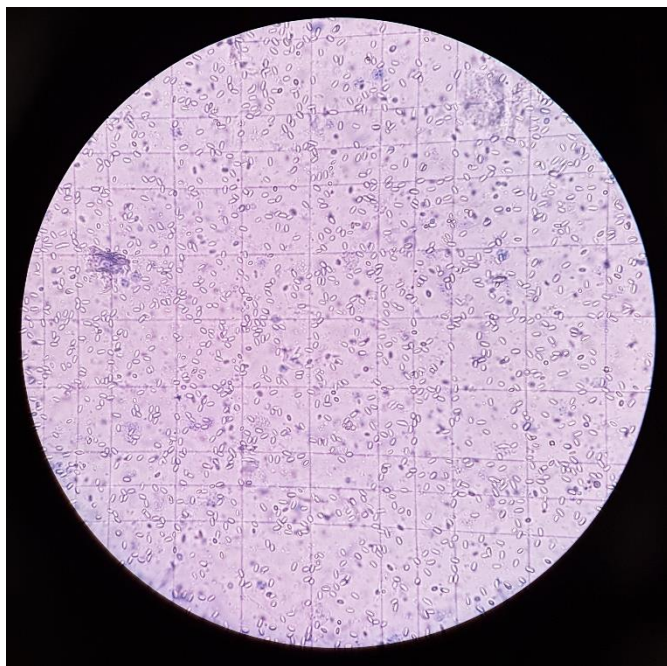
Slika 3: Graf Menzla in Bittermana: prikaz kvalitete učenja, kadar sta CS in US predstavljena v bližjem časovnem okviru (paired group), proti kadar sta predstavljena posebej (unpaired group)

eksperiment z ustrezno vzorčno velikostjo vključeval vse potrebne kontrolirane vrednosti, podprte z ustreznimi statističnimi testi, kar zagotavlja, da je to pogojevanje asociativno v naravi. Pokazala sta tudi, da je CS-US združenje oblikovano le, ko sta CS in US predstavljena v bližjem časovnem okviru (paired group) in ne ko sta predstavljena posebej (unpaired group).

Opravila sta tudi izpustitveni poskus, s katerim sta dokazala, da uspešnost podpira CS-US povezava in ne formacija operantne povezave med odzivom samim (PER) in nagrado. Poskus je pokazal, da tudi, ko je bila nagrada izpuščena, je bilo pogojevanje prisotno, ko je čebela iztegnila jeziček, kot odziv na vonj CS. Tako sta dokazala, da je PER pogojevanje odvisno od CS-US povezave, prepoznavni znak klasičnega pogojevanja.

Randolf Menzel je verjetno raziskovalec, ki je z uporabo vohalnega PER pogojevanja (Menzel 1999) doprinesel najbogatejši vpogled v biologijo učenja in pomnjenja pri čebelah.

1.2.3. NOSEMAVOST



Slika 4: Prisotnost noseme v vzorcu pod mikroskopom pri 400-kratni povečavi

Nosemavost je kronična bolezen odraslih čebel, ki lahko zaradi različnih vplivov postane akutna. To je zajedavsko obolenje črevesja odraslih čebel, ki ob sočasnem delovanju negativnih dejavnikov, kot so dolga in vlažna zima, težko prebavljivi medovi in šibkost, povzročijo odmrtnost čebelje družine. V tej obliki povzroča čebelarstvu veliko gospodarsko škodo, ne samo s tem, da umirajo družine, temveč obolele družine hitreje izgubljajo čebele nabiralke, kar se kaže v manjšem donosu in slabšem preskrbovanju čebelje zalege. Poleg tega imajo okužene čebele slabše razvito faringealno žlezo ter s tem manjšo in slabšo kakovost matičnega mlečka, zato so ličinke dovzetne za razne bolezni. Pri prvem spomladanskem pregledu čebel v takšnih panjih najdemo satnike onesnažene z iztrebki čebel. Mrtvic ni veliko, ker bolne čebele izletavajo in se ne vračajo v panj (Vlado Auguštin, 2006).

Povzročitelj nosestavosti je mikrosporidija *Nosema apis*, ki pripada skupini praživali ali protozoa. Ovalna telesca v srednjem črevesju odrasle čebele je prvi odkril Donhoff leta 1857 v Nemčiji. Zander pa je leta 1909 identificiral spore praživali *Nosema apis*. Danes je pogostejša invazivna vrsta *Nosema ceranae*, ki je prešla iz vzhodne čebele na medonosno čebelo. Morfološko ju težko ločimo.

Spore povzročitelja nosestavosti naseljujejo srednje črevo odraslih čebel, matice in trotoev. Troti so občutljivi za okužbo z nosemo, vendar redkeje obolevajo kot delavke.

Razvojni krog *Noseme apis* je kompleksen. Začetni in končni razvojni krog predstavlja ovalna spora, dolga 5,0 do 6,0 in široka 2,5 do 3,0 mikrometre. V ugodnih razmerah se razvije v odraslo žival. Najugodnejša temperatura za razmnoževanje *Noseme apis* je 30 do 35 °C. Pri nižji ali višji temperaturi pa se razvoj upočasni. V srednjem črevesu čebele spora počiva pod

vplivom črevesne vsebine in sproži polarno nit. Iz spore izstopi ameboidna klica, ki se imenuje planont. Ta prodre v epitelne celice, se razvija, deli in spremeni v meront. Meronti se razmnožujejo na račun gostiteljeve celične citoplazme. Napadene epitelne celice so izpolnjene z razvojnimi oblikami zajedavca, ki se spremenijo v sporonte in sporoblaste. Ko postanejo življenjske razmere neugodne, se le-ti spremenijo v trajno invazijsko obliko – sporo. Celoten razvoj je sorazmeroma kratek in traja 5 do 6 dni.

Del spor, sproščen iz celice, se pomeša med iztrebke in tako izloči iz čebeljega organizma. Preostali del se ponovno aktivira pod vplivom črevesnih sokov in povzroči samookužbo.

Zaradi neprepustne hitinske ovojnice, ki spore obdaja, so te zelo odporne proti temperaturnim spremembam in razkužilom. Na sobni temperaturi preživi spora mesec dni. V mrtvicah čebel spora preživi 5 do 6 tednov v zmerno toplem poletju in jeseni. Temperatura 60 °C uniči spore v vodi ali medu v 10 minutah.

Čebele se okužijo skozi usta. Okužba ni nikoli neposredna, temveč vedno posredna. Glavni izvor bolezni so iztrebki okuženih čebel. Bolezen se najpogosteje širi z okuženim satjem, čebelami, medom, s čebelarskim orodjem, z ropom in na okuženih napajališčih. Na večje razdalje se prenaša s prevozom okuženih čebeljih družin, prodajo okuženih matic in njenih spremljevalk. V panju se mlade čebele okužijo s čiščenjem iztrebkov bolnih čebel.

Posebno nevarna je matica, saj se edina iztreblja v panju; njeni iztrebki so sladki in čebele jih zelo rade ližejo. Matica tako okužuje satje in čebele. Ker se matica lahko okuži v plemenilniku, je pomembna tehnologija vzreje matic.

Za akutni izbruh bolezni štejemo, če čebele niso več sposobne leteti in se iztrebljajo po satju in panjski bradi, saj se čebele v normalnih razmerah ne iztrebljajo v panjih. (Mira Jenko Rogelj, 1998) Negativni vplivi se kažejo kot zmanjšano izločanje prebavnih encimov in absorpcija hranil zaradi poškodb črevesnega epitela, prezgodnji prehod mlade delavke v pašno dejavnost ter zmanjšana sposobnost orientacije in slabša zmožnost vračanja v panj (Mateja Soklič, 2014). Čeprav povzročitelj bolezni napada epitelne celice srednjega črevesa, negativno vpliva tudi na druge organe: jajčniki se degenerirajo, pozneje lahko matica preneha zalegati. Poleg prebavnih težav imajo obolele čebele slabše razvito mlečno žlezo. Patološke spremembe v mlečni žlezi zaradi invadiranosti z *Nosema apis* preprečujejo izločanje matičnega mlečka in s tem pomanjkljivo hranjenje mlade nepokrite zalege. Hemolimfa okužene čebele vsebuje manjšo količino aminokislin, kar se izraža v zmanjšani presnovni dejavnosti.

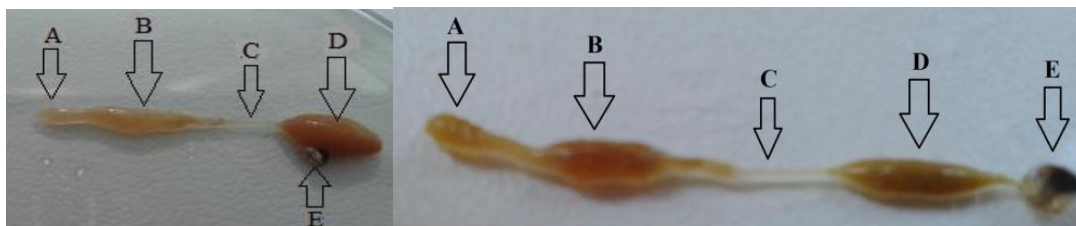
Življenje okužene čebele je krajše od življenja zdrave čebele, zato se občutno zmanjša pridelek medu in drugih čebeljih pridelkov. Prek zime odmre večje število čebel kot v zdravih družinah, zato pogosteje propadejo manj številne družine. (Aleš Gregorc, 1989)

Klinična znamenja nosestavosti je zelo težko odkriti. V prvi fazi lahko opazimo zmanjšano število čebel. Čeprav *Nosema apis* napada srednje črevo čebel, so znamenja opazna pri celi družini. Čebele so nemirne, begajo sem ter tja in se čezmerno hranijo. Med okuženimi čebelarni opazimo posamezne čebele, ki ne morejo leteti in imajo odebeljen, povečan zadek.

Mlade okužene dojlje izločajo manj matičnega mlečka, zato se začno porajati manj odporne in manjše čebele s krajšo življenjsko dobo. V hujših primerih bolezni nihajo zimske izgube čebel od 20 do 80%. Poruši se razmerje med zalego in odraslimi čebelami. Bolezen postane očitna, če se pridružijo še drugi, za družino neugodni dejavniki; v tem primeru lahko družina propade.

Bolezen ugotavljamo z navzočnostjo spor *Noseme apis* pri mikroskopskem pregledu vsebine črevesja. Material za preiskavo so mrtvice čebel, ki jih nabereмо na podnici panja, ali obolele čebele z izraženimi bolezenskimi znamenji.

Na bolezen posumimo tudi na podlagi pregleda prebavnih organov, ki jih izvlečemo iz čebele. Zdravo črevo je temnorumeno ali rjavo in z dobro izraženimi mišičnimi zožitvami. Bolno črevo je razširjeno, mlečno bele ali svetlorumene barve, s tanko steno in skoraj brez mišičnih zožitev.



Slika 5: Prebavni trakt okužene in neokužene čebele

A=medni želodček, B=srednje črevo, C=tanko črevo, D=rektum, E=del želnega aparata

K zatiranju bolezni pripomoremo tako, da redno pregledujemo čebelje družine, zamenjujemo staro satje z novim, skrbimo za red in čistočo v čebelnjaku, namestimo higienski napajalnik za vodo. (Mira Jenko Rogelj, 1998)

1.3. RAZISKOVALNO VPRAŠANJE

Asociativno učenje poteka tako, da je čebela izpostavljena dvema različnima vonjavama – sivki in rožmarinu. Ko je izpostavljena sivki, dobi hrano, ko pa je izpostavljena rožmarinu, ne dobi ničesar.

Zanima nas, ali so čebele skozi proces asociativnega učenja z dvema različnima vonjavama sposobne nagonsko iztegniti jeziček le ob prisotnosti vonjave brez stimulacije s hrano.

Ali prisotnost zajedavca noseča vpliva na sposobnost učenja čebele.

1.4. HIPOTEZE

Čebele bodo skozi proces asociativnega učenja sposobne vonj sivke povezati s hrano in bodo tako že samo ob prisotnosti sivke nagonsko iztegnile jeziček še preden bodo vzdražene s hrano.

Čebele skozi proces asociativnega učenja vonja rožmarina ne bodo povezovala s hrano, zato se na dišavo ne bodo odzivale z iztegovanjem jezička.

Prisotnost zajedavca noseča bo zmanjšala sposobnost učenja čebel.

2. RAZISKAVA

2.1. METODA DELA

2.1.1. PRIPOMOČKI

2.1.1.1. PRIPRAVA ČEBEL

- Kletka za čebele
- Led
- 32 tulcev
- Lepilni trak
- Skalpel
- Filtrirni papir
- Steklена palčka

2.1.1.2. UČENJE ČEBEL

- Koncentrat dišav sivke in rožmarina: Samson Kamnik d.o.o.
- 2 večji injekciji

2.1.1.3. PREGLED NOSEMAVOSTI

- 16 standardnih laboratorijskih plastičnih "epic" volumna 1,5 mL
- Pinceta
- Barvilo: metilen modro, Merck KGaA Darmstadt, Germany
- Urno stekelce
- Kapalka
- Hemocitometer: Bürker-Türk, Fein-Optik, Bad Blankenburg, narejeno v DDR
- Mikroskop: OLYMPUS CX21FS2, Olympus Corporation Tokio, Japan

2.1.2. OPIS DELA

2.1.2.1. PRIPRAVA ČEBEL

Čebele delavke iz prezimovalne gruč iz panja sva naložila popoldne pred eksperimentom. Čebelnjak je bil predhodno prestavljen v neogrevan prostor, kjer temperatura ni padla v času vzorčenja pod 5 °C, ker pa so bile v tem času še zimske razmere, temperatura v prostoru ni presegala 12 °C, da čebele niso hibernirale. Čebele sva naložila v kletko in jih odnesla v prostor, kjer sva jih pripravila za poskus v naslednjem dnevu.

Najprej sva čebele dala na led, da se niso premikale in s tem zagotovila, da sva jih lahko lažje pritrdila v tulce in da niso porabljale energije po nepotrebnem. Paziti sva morala, da čebele niso bile predolgo na ledu, saj bi lahko utrpeli možganske poškodbe ali pa celo umrle.

Po trenutni standardizirani verziji postopka (Falsenberg, 2011) morajo biti čebele delavke individualno pritrjene v tulec tako, da jih s koščkom lepilnega traku nežno pričvrstimo čez vrat in je tako prosta le glava. Pri tem moramo biti pozorni, da ima čebela prost jeziček in tipalnice. Pritrjene čebele morajo počivati 2-12 ur ali pa čez noč, da se privadijo eksperimentalnim pogojem, s tem pa se poveča tudi motivacija za hranjenje. Če čebele pustimo počivati čez noč, jih moramo nahraniti dovolj, da lahko preživijo noč - za hrano uporabljamo raztopino sladkorja (48 g sladkorja raztopljenega v 100 mL vode). Biti morajo v temnem prostoru s sobno temperaturo. V takšnih pogojih lačne pritrjene čebele iztegnejo jeziček (PER), če so njihove tipalnice vzdružene s sladko raztopino (US). Sladko raztopino lahko dovajamo s pipeto ali zobotrebcom, midva pa sva uporabljala filtrirni papir.

Naslednji dan dopoldan sva pregledala koliko čebel je primernih za eksperiment, saj so bile nekatere prešibke, da bi preživele noč ali pa so bile naslednji dan premalo odzivne. Za eksperiment sva potrebovala 16 zdravih in odzivnih čebel. Odzivnost sva preverila tako, da sva jih malo nahranila.



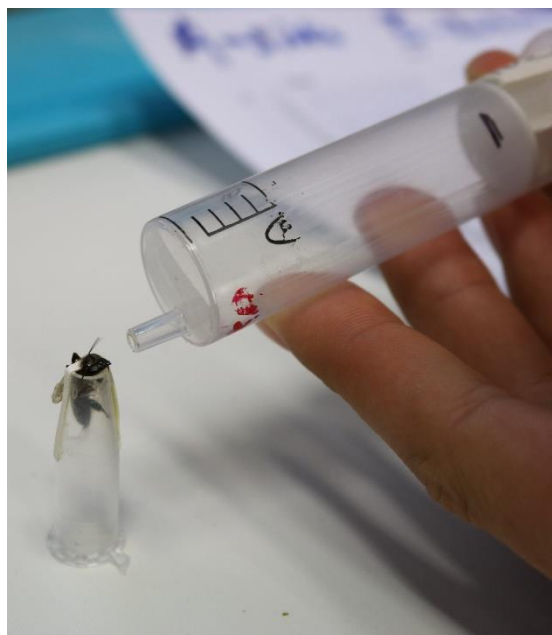
Slika 6: Čebela v tulcu



Slika 7: Čebela v tulcu od zadaj

2.1.2.2. UČENJE ČEBEL

Eksperiment sva opravila tako, da sva čebelo izpostavila dvema različnima vonjavama, ob tem pa jo pri eni vonjavi preko filtrirnega papirja hranila s sladkorno raztopino, pri drugi pa ne. Izbrani vonjavi sta bili rožmarin in sivka. Čebele sva razdelila v dve enako številčni skupini (8+8). V obeh skupinah so čebele prejemale hrano ob isti vonjavi (sivka, pozitivni pogojni dražljaj), le vrstni red prejemanja le te je bil ravno obraten. Pri rožmarinu niso dobile hrane (negativni pogojni dražljaj). Vrstni red, ki sva ga uporabljala je navidezno naključno zaporedje. Čeprav se spremenljivki pojavljata v zaporedju, je le to prezapleteno, da bi se ga žival zavedala. Če bi bilo zaporedje le ABAB bi si živali morda lahko zapomnile in ne bi šlo za učenje glede na vonj. Za dovajanje vonjave sva uporabljala večjo injekcijo v kateri je bil filtrirni papir prepojen s tremi kapljicami koncentrata vonjave. Odišavljen zrak, volumna 30mL, sva iz injekcije pihala počasi (6-7 sekund), hrano pa sva dala čebeli v zadnji četrtini izpostavljanja vonjavi. Pozorna sva morala biti, da sva vsaki čebeli pihnila isto količino odišavljenega zraka in da sva prostor zračila, da se dišave niso zadrževale in mešale, pri tem pa sva pazila tudi na temperaturo prostora (21°C). Poskus je zajemal 32 korakov, ki so si sledili po prej omenjenem zaporedju. Časovni premor med posameznimi koraki je moral biti vsaj 5 minut, da čebele niso mešale vonjav. S tem menjavanjem vonjav se čebele naučijo povezati pravilni vonj (pozitivni pogojni dražljaj) in tako posledično nagonsko iztegnejo jeziček (PER) že ob zaznavanju vonjave same.



Slika 8: Stimuliranje čebele z dišavo

Ko je bilo učenje čebel zaključeno, sva dala čebele v zamrzovalnik. Nato sva mrtve čebele odstranila iz tulcev in jih dala v označene 'epice', saj sva jih potrebovala še v drugem delu eksperimenta.

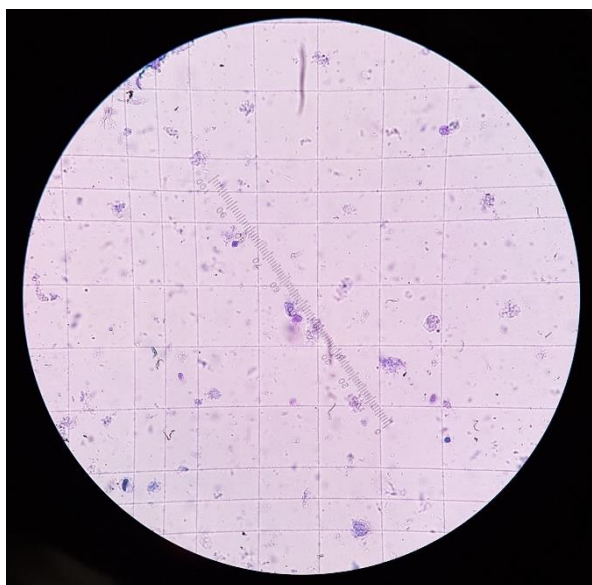
2.1.2.3. PREGLED NOSEMAVOSTI

V drugem delu eksperimenta sva ugotavljala ali so v srednjem črevesju čebele prisotni zajedavci imenovani nosema in ali prisotnost tega zajedavca vpliva na uspešnost učenja čebele.

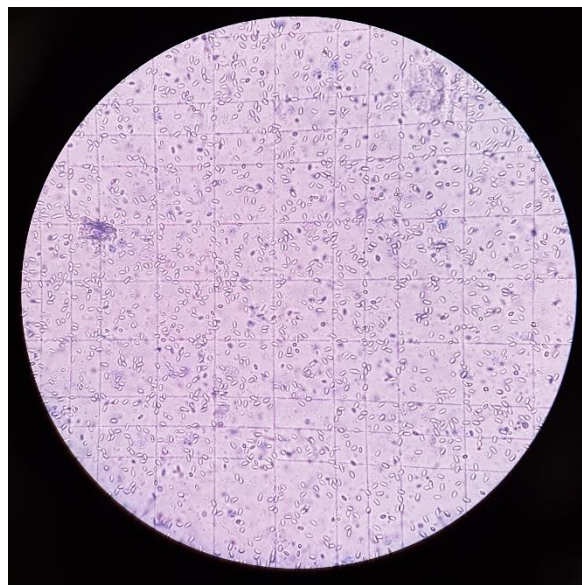


Slika 9: Čebelo sva s pinceto prijela za želo in povlekla ven celotno črevo

Čebelo sva s pinceto prijela za želo in povlekla ven celotno črevo. Ko sva izolirala srednje črevo, sva ga s pinceto dala na rob 'epice'. V 'epico' sva s kapalko dala 1 mL raztopljenega barvila metilen modro ($200\ \mu\text{L}$ raztopljenega v $10\ \text{mL}$ vode). Nato sva s stekleno palčko zmečkala srednje črevo in celotno vsebino dobro pretresla. 2-3 kapljice te vsebine sva s kapalko nanesla na hemocitometer in pokrila s krovnim stekelcem. Preparat sva gledala pod mikroskopom pri 400 – kratni povečavi. Najti sva morala mrežo s šestnajstimi kvadrati, ki je najmanjša osnovna enota hemocitometra. Če so bile prisotne spore noseme, sva jih v teh kvadratih preštela in nato izračunala njihovo število v eni čebeli.



Slika 10: Vzorec brez prisotnosti noseme pod mikroskopom pri 400-kratni povečavi



Slika 11: Prisotnost noseme v vzorcu pod mikroskopom pri 400-kratni povečavi

2.2. MERITVE

2.2.1. REZULTATI

2.2.1.1. TABELE UČENJA

		1	4	5	6	9	11	16	18	20	21	24	17	28	29	30	31	
1	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
2	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	A
3	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
4	A	0/1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
5	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	A
6	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	1	0/1	0/1	1	1	1	A
7	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
8	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0/1	0/1	0/1	0/1	1	A
9	A	1	1	0/1	1	1	0/1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
10	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	1	1	1	1	1	0/1	A
11	A	1	1	0/1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	B
12	A	0/1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
13	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	A
14	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	A
15	A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	B
16	B	0	0	0	0	0	/	0	0	1	1	1	1	1	0/1	1	1	A
17	B	0	0	0	0	0	/	0	0	1	1	1	1	1	0/1	1	1	A
18	A	0/1	1	1	1	1	/	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
19	A	0/1	1	1	1	1	/	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
20	B	0	0	0	0	0	/	0	0	1	0/1	1	0/1	1	1	0/1	1	A
21	B	0	0	0	0	0	/	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	A
22	A	1	1	1	1	1	/	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
23	B	0	0	0	0	0	/	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	A
24	A	0/1	1	1	1	1	/	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
25	B	0	0	0	0	0	/	0	0	1	0/1	1	1	1	1	1	1	A
26	A	1	1	0/1	1	1	/	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	B
27	A	1	1	1	1	1	/	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
28	B	0	0	0	0	0	/	0	0	1	1	1	0/1	1	1	1	1	A
29	B	0	0	0	0	0	/	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	A
30	A	1	1	1	1	1	/	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
31	B	0	0	0	0	0	/	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	A
32	B	0	0	0	0	0	/	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	A

Tabela 1: Tabela učenja 1. skupine, datum učenja: 25.1.2017

		5	9	3	12	14	16	19	20	23	24	25	26	27	29	30	32	
1	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
2	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	A
3	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
4	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
5	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1	0/1	A
6	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1	0/1	A
7	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
8	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	1	0/1	1	0/1	A
9	A	0/1	1	0/1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
10	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	1	1	1	0/1	A
11	A	0/1	0/1	1	1	1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
12	A	0/1	0/1	1	1	1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
13	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	0/1	0/1	1	0/1	1	0/1	A
14	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	1	0/1	1	1	A
15	A	0/1	0/1	1	1	1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
16	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	0/1	1	1	1	1	1	A
17	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1	1	A
18	A	0/1	0/1	1	1	1	0/1	0/1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
19	A	0/1	0/1	1	1	1	0/1	0/1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
20	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0/1	1	1	A
21	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	0/1	0/1	0/1	1	1	1	A
22	A	0/1	0/1	0/1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
23	B	0	0	0	0	0	0	0	1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0/1	1	1	A
24	A	0/1	0/1	1	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
25	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	0/1	0/1	1	1	1	1	A
26	A	0/1	0/1	1	1	1	1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
27	A	0/1	0/1	1	1	1	1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
28	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0/1	1	1	A
29	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	0/1	1	1	0/1	1	1	A
30	A	0/1	0/1	1	1	1	1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
31	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	0/1	1	1	1	1	1	A
32	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0/1	1	0/1	1	1	0/1	1	1	A

Tabela 2: Tabela učenja 2. skupine, datum učenja: 27.1.2017

		1	5	6	7	8	11	14	17	18	23	24	26	28	29	30	31	
1	A	0/1	1	0/1	1	0/1	0/1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
2	B	0	0	0	1	0	0	1	0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	A
3	A	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	1	1	0	0	0	B
4	A	1	0/1	1	1	0/1	1	1	0/1	0	0	0	0	1	0	0	0	B
5	B	1	0	1	1	0	1	1	0	0/1	0/1	0/1	1	1	0/1	0/1	0/1	A
6	B	1	0	1	1	0	1	1	0	0/1	0/1	0/1	1	1	0/1	0/1	0/1	A
7	A	0/1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
8	B	1	0	1	1	0	0	0	0	0/1	0/1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0/1	A
9	A	0/1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
10	B	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0/1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	A
11	A	0/1	0/1	0/1	0/1	1	1	1	0/1	0	0	0	0	1	0	0	0	B
12	A	1	1	1	1	1	1	1	0/1	0	0	0	0	1	0	0	0	B
13	B	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0/1	1	1	0/1	0/1	1	A
14	B	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	1	A
15	A	1	1	1	1	1	0/1	1	0/1	0	0	0	0	1	0	0	0	B
16	B	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	1	A
17	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	1	A
18	A	1	1	1	1	1	0/1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
19	A	1	0/1	0/1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
20	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0/1	1	0/1	0/1	0/1	1	A
21	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0/1	0/1	0	0/1	0/1	1	A
22	A	1	1	0	0	1	0/1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
23	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0/1	0/1	1	A
24	A	1	1	0	0	1	0/1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
25	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0/1	0/1	0/1	1	A
26	A	1	1	0/1	0/1	1	0/1	1	0/1	0	0	0	1	0	0	0	0	B
27	A	1	1	1	1	1	0/1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
28	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0/1	0/1	1	A
29	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0/1	0/1	0/1	1	A
30	A	1	1	1	1	1	0/1	1	0/1	0	0	0	0	0	0	0	0	B
31	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0/1	0/1	1	A
32	B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0/1	0/1	0/1	1	A

Tabela 3: Tabela učenja 3. skupine, datum učenja: 1.2.2017

Legenda znakov:

A – sivka in hrana

B – rožmarin brez hrane

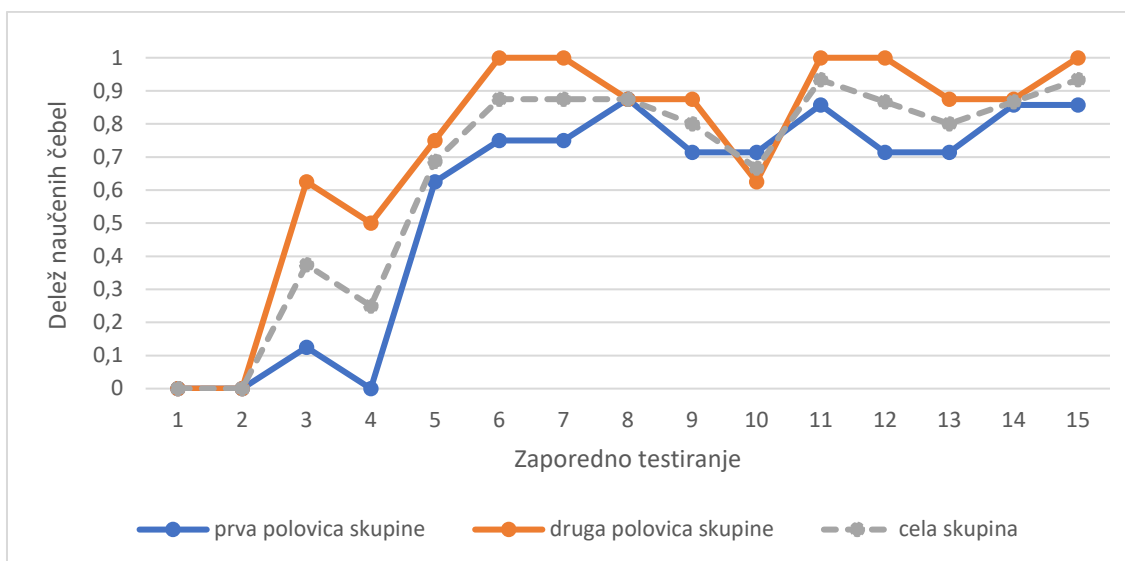
0 – čebela jezička ni iztegnila

0/1 – čebela je jeziček iztegnila ob stimulaciji s sladkorjem

1 – čebela je jeziček iztegnila že ob stimulaciji z vonjavo

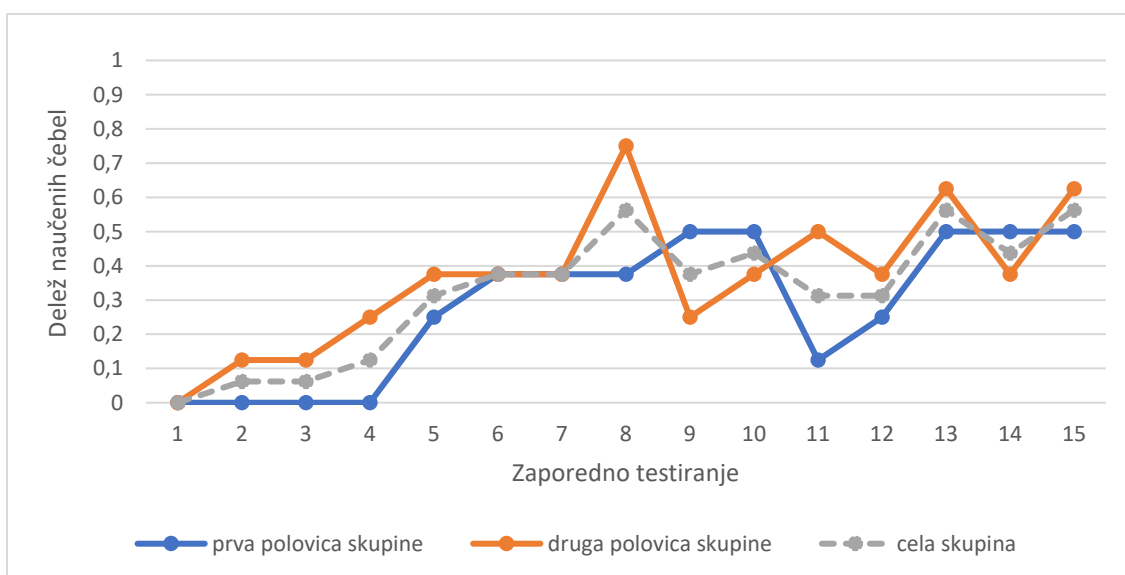
V zgornji vrsti so navedene številke čebel, uporabljenih v eksperimentu. Čebele, pri katerih je pisava v stolpcu obarvana rdeče, so nosečnice.

2.2.1.2. GRAFI UČENJA



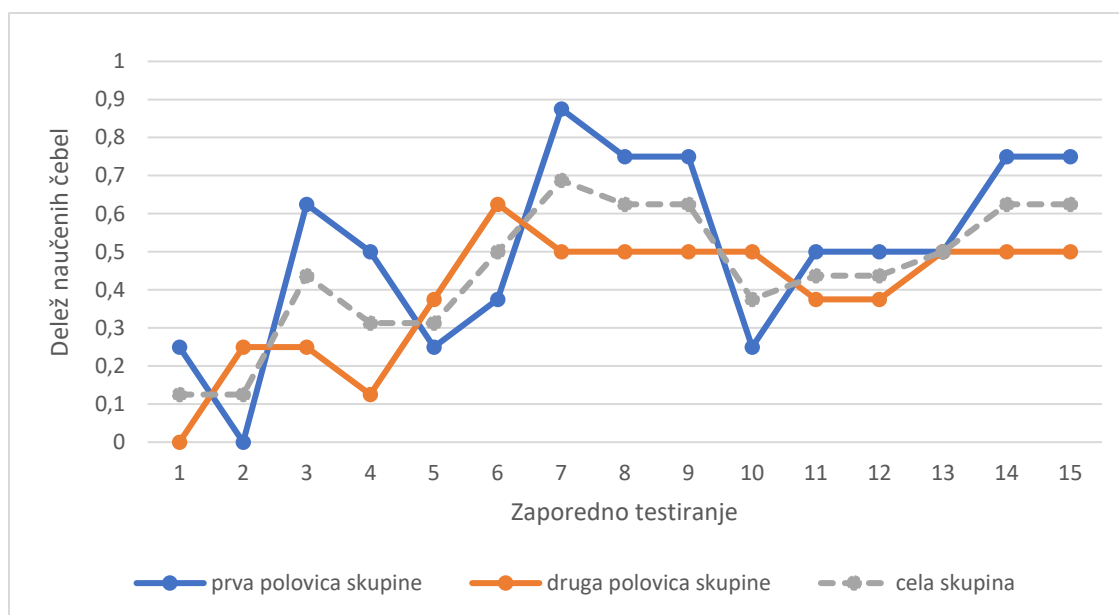
Graf 1: Učenje čebel v 1. skupini:

v prvi polovici so bile čebele 1, 4, 5, 6, 9, 11, 16, 18, v drugi pa čebele 20, 21, 24, 17, 28, 29, 30, 31



Graf 2: Učenje v 2. skupini:

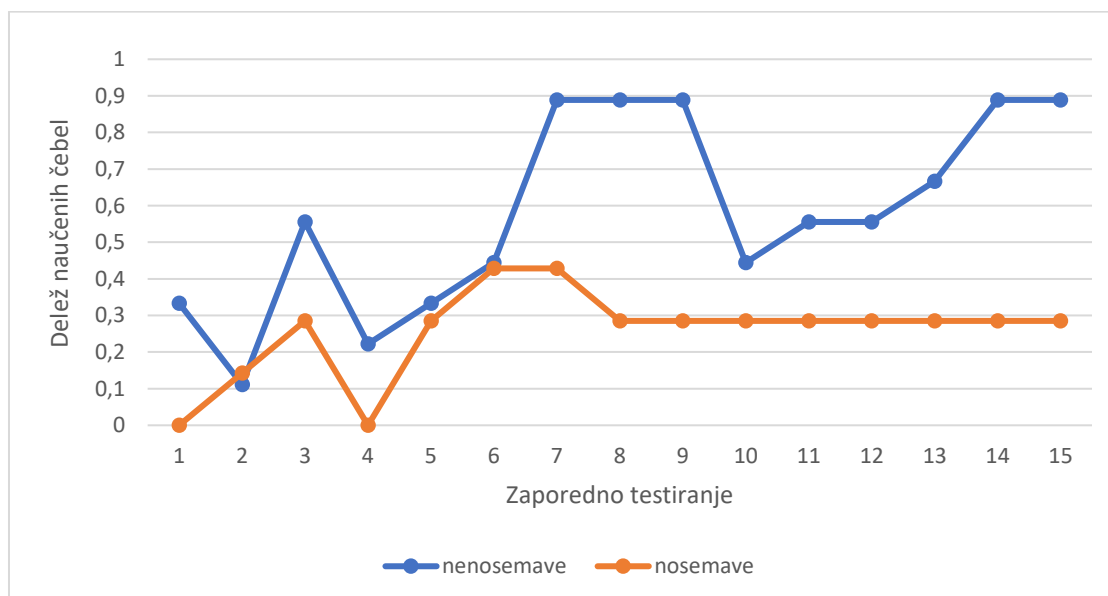
v prvi polovici so bile čebele 5, 9, 3, 12, 14, 16, 19, 20, v drugi pa čebele 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 32



Graf 3: Učenje v 3. skupini:

v prvi polovici so bile čebele 1, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 17, v drugi pa čebele 18, 23, 24, 26, 28, 29, 30, 31

Grafi zgoraj prikazujejo delež naučenih čebel v odvisnosti od zaporednega testiranja. Prva in druga polovica pri vsaki skupini sta ločeni, ker sva čebele vsake polovice testirala po drugem zaporedju – druga polovica skupine je imela obratno zaporedje kot prva polovica.



Graf 4: Učenje v 3. skupini, primerjava med nenosemavimi in nosemavimi čebelami:

nenosemave so bile čebele 1, 5, 6, 7, 8, 14, 17, 18, 26, nosemave pa čebele 11, 23, 24, 28, 29, 30, 31

Graf 4 prikazuje primerjavo deleža naučenih nenosemavih in nosemavih čebel v odvisnosti od zaporednega testiranja v tretji skupini.

2.2.1.3. TABELE ŠTETJA NOSEME

čebela	štetje 1	štetje 2	štetje 3	povprečje	velikost rektuma	število spor noseve v celotnem srednjem črevesju [v milijonih]
1	0	0	0	0	majhen	0
4	0	0	0	0	srednje velik	0
5	189	209	228	208,67	velik	6,52
6	0	0	0	0	velik	0
9	332	321	250	301	majhen	10,31
11	0	0	0	0	srednje velik	0
16	420	357	322	366,33	srednje velik	11,45
18	0	0	0	0	srednje velik	0
20	0	0	0	0	srednje velik	0
21	0	0	0	0	srednje velik	0
24	0	0	0	0	srednje velik	0
17	151	126	172	149,67	srednje velik	4,68
28	0	0	0	0	majhen	0
29	0	0	0	0	velik	0
30	0	0	0	0	majhen	0
31	0	0	0	0	srednje velik	0

Tabela 4: Rezultati štetja noseve 1. skupine čebel

čebela	štetje 1	štetje 2	štetje 3	povprečje	velikost rektuma	število spor noseve v celotnem srednjem črevesju [v milijonih]
5	0	0	0	0	velik	0
9	0	0	0	0	srednje velik	0
3	0	0	0	0	majhen	0
12	0	0	0	0	srednje velik	0
14	100	117	106	107,67	srednje velik	6,73
16	0	0	0	0	majhen	0
19	157	135	109	133,67	srednje velik	8,35
20	0	0	0	0	majhen	0
23	0	0	0	0	srednje velik	0
24	79	78	86	81	srednje velik	5,06
25	0	0	0	0	velik	0
26	0	0	0	0	srednje velik	0
27	0	0	0	0	majhen	0
29	80	85	78	81	srednje velik	5,06
30	0	0	0	0	majhen	0
32	0	0	0	0	srednje velik	0

Tabela 5: Rezultati štetja noseve 2. skupine čebel

čebela	štetje 1	štetje 2	štetje 3	povprečje	velikost rektuma	število spor noseme v celotnem srednjem črevesju [v milijonih]
1	0	0	0	0	majhen	0
5	0	0	0	0	majhen	0
6	0	0	0	0	majhen	0
7	0	0	0	0	majhen	0
8	0	0	0	0	srednje velik	0
11	230	242	244	238,67	srednje velik	14,92
14	0	0	0	0	srednje velik	0
17	0	0	0	0	srednje velik	0
18	0	0	0	0	srednje velik	0
23	24	11	14	16,33	srednje velik	1,02
24	26	31	29	28,67	majhen	1,79
26	0	0	0	0	srednje velik	0
28	48	53	52	51	srednje velik	3,19
29	63	62	75	66,67	velik	4,17
30	101	94	89	94,67	srednje velik	5,92
31	150	196	173	173	majhen	10,91

Tabela 6: Rezultati štetja noseme 3. skupine čebel

V tabeli so zapisana tri štetja (1, 2, 3) spor noseme, iz katerih sva izračunala povprečje, ki sva ga uporabila za nadaljnje računanje. Spore sva štela v 16 najmanjših kvadratkih hemocitometra. Prostornina enega kvadrata je $0,001\text{mm}^3$ ali $0,001\mu\text{L}$. Torej je skupna prostornina $0,016\mu\text{L}$. Vsebino srednjega črevesja sva razredčila pri prvi skupini v $0,5\text{mL}$ ali $500\mu\text{L}$. To prostornino sva delila s prostornino 16 kvadratkov in dobila faktor 31250. Pri drugi in tretji skupini sva vsebino srednjega črevesja razredčila v $1,0\text{mL}$ ali $1000\mu\text{L}$ in je zato faktor 62500. S tem faktorjem sva množila povprečje prešteti spor noseme in dobila število spor noseme v celotnem srednjem črevesju čebele.

2.2.1.4. FISHERJEV EKSAKTNI TEST

	nosemave	nenosemave	skupno vrstice
so se učile	8	27	35
se niso učile	7	6	13
skupno stolpci	15	33	48

Tabela 7: Prikaz Fisherjevega eksaktnega testa pri vseh čebelah

P=0,077

	nosemave	nenosemave	skupno vrstice
se se učile	2	8	10
se niso učile	5	1	6
skupno stolpci	7	9	16

Tabela 8: Prikaz Fisherjevega eksaktnega testa pri čebelah 3. skupine

P=0,035

Fisherjev eksaktni test nam pomaga izračunati kolikšna je verjetnost kombinacije v tabeli, ali še ekstremnejše kombinacije. Dobili smo dvosmerno p vrednost, ki je manjša od 0,05. To je kriterij za določanje, če obstaja povezava med vrednostmi iz stolpcem in vrednostmi iz vrstic. Tu so bile štete čebele, ki so uspele povezati pogojni dražljaj do konca testiranja.

3. RAZPRAVA

3.1. UČENJE ČEBEL

Graf 1 prikazuje delež naučenih čebel prve skupine. Vidimo, da je asociativno učenje uspelo pri vseh 16 čebelah prve skupine. Vrednost deleža naučenih čebel na koncu ni 1, ker je ena čebela postala neodzivna, vendar se je že pred tem naučila. Iz grafa 2 je razvidno, da je asociativno učenje uspelo pri 9 od 16 čebelah te skupine. Iz grafa 3 pa vidimo, da je bilo asociativno učenje uspešno pri 10 od 16 čebelah te skupine. Torej je bilo 35 od 48 čebel sposobnih povezati vonj sivke s hrano in so tako že ob vonjavi sami nagonsko iztegnile jeziček še preden so bile vzdražene s hrano. Torej je bil proces asociativnega učenja uspešen pri 73% čebel.

Čebele, ki niso povezale vonja sivke in učenja so bile bodisi okužene z nosečo, katere vpliv bova razložila kasneje, bodisi so bili za neuspešnost učenja krivi drugi moteči dejavniki, na primer poškodbe možganov ob podhladitvi, poškodbe tipalnic, prehuda lakota ali sitost...

To potrjuje najino hipotezo, da bodo čebele skozi proces asociativnega učenja sposobne povezati sivko s hrano in bodo tako že samo ob prisotnosti sivke nagonsko iztegnile jeziček še preden bodo vzdražene s hrano.

V tabelah 1, 2 in 3, ki prikazujejo učenje čebel po posameznih testiranjih, vidimo, da se čebele pri vonju rožmarina niso odzivale z iztegovanjem jezička. V 3. skupini so čebele 1, 6, 7, 11, 14 in 28 na začetku iztegovale jeziček pri vonjavi rožmarina ali celo pri obeh. To pripisujeva preveliki lakoti po prenočitvi brez hrane. Tudi te čebele so se v nadaljnjem procesu asociativnega učenja naučile, da ob vonjavi rožmarina ni hrane in se tako nanj niso več odzivale z iztegovanjem jezička.

To potrjuje najino hipotezo, da čebele skozi proces asociativnega učenja vonj rožmarina ne bodo povezale s hrano in se zato ne bodo odzivale z iztegovanjem jezička.

3.2. VPLIV NOSEME NA UČENJE ČEBEL

Graf 4 prikazuje delež naučenih nosečih in nenosečih čebel pri 3. skupini. Dobro je vidno, da so se nenoseče čebele učile uspešneje kot noseče čebele, saj je modra črta, ki predstavlja delež naučenih nenosečih čebel vedno nad oranžno črto, ki predstavlja delež naučenih nosečih čebel.

Od vseh čebel se jih 13 do konca eksperimenta ni naučilo povezati vonj sivke s hrano. Več kot polovica teh 13 čebel je bilo okuženih z nosečo, čeprav je bilo od vseh 48 čebel nosečih le 13.

S Fisherjevim eksaktnim poskusom sva pokazala tudi, da obstaja zanesljiva povezanost med okuženostjo in zmožnostjo učenja. Da so se z nosemo okužene čebele učile slabše, je razvidno tudi iz grafa 4: Učenje v 3. skupini, primerjava med nenosemavimi in nosemavimi čebelami. Tako je potrjena tudi hipoteza, da bo prisotnost zajedavca nosema zmanjšala sposobnost učenja čebel.

Za vse podatke skupaj ne moremo zanesljivo trditi, da so je bil delež nosemavih čebel, ki so se učile manjši kot pa pri nenosemavih, čeprav je razlika kar velika. Pri tretji skupini pa je razlika očitna, saj se kar 5 od 7 nosemavih čebel ni moglo naučiti povezave, med tem kot med nenosemavimi pa le 1 od 9 čebel.

Opazila sva tudi, da je bila po daljšem obdobju brez izletnih dni povečana težava z nosemavostjo, s tem pa tudi njen učinek na učenje.

4. ZAKLJUČEK

Tekom tega šolskega leta sva se pri izdelovanju raziskovalne naloge naučila marsičesa novega. Natančno sva se podučila o znanstveni raziskovalni metodi dela. Spoznala sva delo na terenu in v laboratoriju. Ugotovila sva, da je samostojno raziskovalno delo res veliko bolj poučno in zabavno od osvajanja teoretičnih znanj. Poznavanje novih metod praktičnega biološkega dela nama bo koristilo pri najinem nadaljnjem študiju na fakulteti.

Čebela kot raziskovalni objekt naju ni razočarala. Med drugim sva spoznala, da so čebele izjemno učeča in iznajdljiva bitja, saj so zmožne asociativnega učenja, tega prej nisva vedela.

Biologija res velja za teoretično, bazično znanost, vendar nama je najina raziskovalna naloga pokazala njeno aplikativno, praktično vrednost. Med delanjem raziskovalne naloge nama je biologija še bolj prirasla k srcu, saj je bilo delo res zanimivo. Vedno znova so se porajala nova vprašanja, na katera je bilo resnično zanimivo odgovarjati skozi ves proces dela.

Spoznala sva, da so čebele veliko bolj ogrožene, kot sva sprva mislila. Poleg raznih pesticidov in ostalih škodljivih vplivov v okolju, jih ogrožajo številne bolezni, kot na primer nosema, ki sva jo spoznala midva.

Na področju raziskovanja učenja čebel je mogoče izvesti še mnogo nadaljnjih raziskav. Zanimivo bi bilo primerjati učenje čebel iz prezimovalne gruč in učenje poletnih čebel. Lahko bi preverila tudi vpliv drugih zajedavcev ali bolezni na učenje čebel.

5. VIRI

1. Menzel, R. in Erber, J., 1978. Learning and Memory in Bees. Scientific American, številka zvezka, str. 2
2. Hammer, M. in Menzel, R., 1998. Multiple Sites of Associative Odor Learning as Revealed by Local Brain Microinjections of Octopamine in Honeybees. Learning & Memory, 5, str. 146 in 147
3. Menzel, R., 1993. Associative learning in honey bees. Apidologie, 24, str. 157 in 158
4. Giurfa, M., in Sandoz, J., 2012. Invertebrate learning and memory: Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. Learning & Memory, 19, str. 54–57
5. Gronenberg, M., Raikhelkar, A., Abshire, E., Stevens, J., Epstein, E., Loyola, K., Rauscher, M. in Buchmann, S., 2014. Honeybees (*Apis mellifera*) learn to discriminate the smell of organic compounds from their respective deuterated isotopomers. The royal society, 10
6. Mlaker-Šumenjak, M., 2011. Učbenik za ljubitelje čebel: Čebela se predstavi. Lukovica: Čebelarska zveza Slovenije
7. Irawan, M., 2012. The Superior Carniolan Bees. The Honey Beekeeper, 1
8. The Carniolan Honey Bee Characteristics and recommendations. Apiexpert. (online) 2014, dostopno na: <http://apiexpert.eu/carniolan-honey-bee/> (27.12.2016)
9. Gregorc, A., Gregori, J., Šmerc, F. in Šivic, F., 2008. Slovenija - domovina kranjske čebele : vzrejno delo in vzrejevalci. Lukovica : Čebelarska zveza Slovenije
10. Gregori, J., Poklukar, J. in Mihelič, J., 2003. Kranjska čebela (*Apis mellifera carnica*) v Sloveniji. Ljubljana: Čebelarska zveza Slovenije
11. Rajbar, A., 2015. Sladkorji v hemolimfi pri čebelah (*Apis mellifera carnica*) v zimski gruč. Diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
12. Kozmus, P., Božič, J., Pislak Ocepek, M., Noč, B., Jaklič, D., Lipič Berlec, L. in Kadunc, D., 2011. Nacionalni program zaščite kranjske čebele (*Apis mellifera carnica*, Pollman, 1879) v Sloveniji. Ljubljana : Nacionalni program
13. Rogelj, M. J., Nosemavost. Čebelarska zveza Slovenije. (online) dostopno na: <http://www.czs.si/content/C31> (6.1.2017)
14. Gregorc, A., Medonosna čebela. Čebelarska zveza Slovenije. (online) dostopno na: <http://www.czs.si/content/D51> (27.12.2016)
15. Kranjska čebela. Wikipedia. (online) datum zadnje posodobitve: 6.1.2016, dostopno na: https://sl.wikipedia.org/wiki/Kranjska_%C4%8Debela (27.12.2016)

5.1. VIRI SLIK

Slika 1: <http://www.glasdezele.si/articles/2012/nacionalni-program-za%C5%A1%C4%8Dite-kranjske-%C4%8Debele> (11.2.2017)

Sliki 2 in 3: <http://learnmem.cshlp.org/content/19/2/54.full.pdf+html> (10.2.2017)

Slika 5: Rajbar, A., 2015. Sladkorji v hemolimfi pri čebelah (*Apis mellifera carnica*) v zimski gruč. Diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo. Str. 38

Slike 4, 6, 7, 8, 9, 10 in 11: avtorske